

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 077**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01) A61K 38/00	(2006.01)
C07K 14/54	(2006.01) C07K 14/715	(2006.01)
C07K 14/075	(2006.01)	
C12N 15/62	(2006.01)	
A61K 38/17	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61K 38/20	(2006.01)	
C07K 16/18	(2006.01)	
C12N 1/00	(2006.01)	
C12N 5/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2011 E 11827439 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2619229**

54 Título: **Moléculas de fusión solubles multímeras de IL-15 y métodos para elaborar y usar las mismas**

30 Prioridad:

21.09.2010 US 384817 P
26.08.2011 US 201161527911 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.08.2016

73 Titular/es:

ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 North Commerce Parkway
Miramar, Florida 33025, US

72 Inventor/es:

WONG, HING, C.;
RHODE, PETER;
LIU, BAI;
ZHU, XIAOYUN y
HAN, KAI-PING

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 579 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de fusión solubles multímeras de IL-15 y métodos para elaborar y usar las mismas.

Antecedentes

Estudios previos han demostrado la utilidad de crear proteínas dirigidas a una diana multímeras con los propósitos bien de aumentar la afinidad efectiva a través de la formación de moléculas multivalentes o bien de ampliar el espectro de reconocimiento a través de la formación de múltiples moléculas específicas. Se ha empleado una variedad de dominios de interacción proteínica para generar proteínas recombinantes con sitios de unión dímeros y multímeros. Inicialmente, se usaron comúnmente para la dimerización fusiones de los dominios dirigidos a una diana a dominios de cremallera de leucina. En este enfoque, la interacción hidrófoba de dominios de cremallera de leucina está mediada por leucinas regularmente separadas en hélices α paralelas, mientras que el socio de dimerización está determinado por otros aminoácidos inmediatamente fuera del centro hidrófobo, principalmente residuos cargados, que forman puentes salinos (1-3). Esta interacción está ejemplificada por la familia Fos y Jun de proteínas, que forman preferentemente heterodímeros sin interferencia significativa de la especificidad del dominio diana. Este enfoque proporciona un andamiaje versátil para crear complejos multímeros (4, 5). Sin embargo, hay limitaciones que afectan significativamente a la utilidad de este enfoque para el desarrollo de proteínas terapéuticas. Lo más destacadamente, Fos y Jun son proteínas intracelulares que se acumulan casi exclusivamente dentro del núcleo. Así, las fusiones de Fos y Jun solubles y secretadas se producen habitualmente usando el sistema celular de insecto infectado por baculovirus o transformado establemente, un procedimiento de fabricación de rendimiento relativamente bajo y no fácilmente aumentable a escala (6, 7). En un intento de crear moléculas biespecíficas, se produjeron dominios de anticuerpo conectados a Fos-Jun en células bacterianas o de mamífero, pero la principal limitación era la homodimerización de subunidades (8, 9) que complicaba el procedimiento de purificación y reducía el rendimiento global (8, 9). Por otra parte, la diferencia en los patrones de glicosilación de proteínas producidas por células de insecto o bacterianas eleva los problemas de inmunogenicidad potencial de los productos cuando se usan en aplicaciones terapéuticas.

Además de los motivos de cremallera de leucina, se han usado dominios constantes de inmunoglobulina (IgG), péptidos de autodimerización de hélice-vuelta-hélice, subdominios tri- y tetrámeros de colágeno y p53 como andamiajes mediante los cuales crear moléculas multivalentes (8, 10-13). Aparte de los fragmentos de IgG, estos dominios de interacción sirven principalmente como andamiajes moleculares y carecen de otras actividades funcionales de por sí. Por otro lado, las proteínas de fusión que contienen estos dominios a menudo requieren una optimización adicional para promover la formación de multímeros estables y líneas celulares de producción especializadas y métodos de purificación que son tediosos o imponen obstáculos reguladores para el desarrollo terapéutico (10, 12). Muchos de estos andamiajes son derivados bien de dominios proteínicos no humanos o bien de componentes no naturales del plasma que pueden exhibir propiedades farmacocinéticas pobres y plantear el riesgo de respuestas inmunogénicas que podrían limitar su potencial terapéutico.

El documento WO/143794 divulga complejos de proteínas de fusión solubles y variantes de IL-15 que tienen uso terapéutico y diagnóstico.

Sumario de la invención

La invención proporciona complejos de proteínas de fusión solubles que tienen al menos dos proteínas de fusión solubles, en donde la primera proteína de fusión incluye (a) un primer polipéptido biológicamente activo conectado covalentemente a (b) polipéptido de interleucina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo; y la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo péptido biológicamente activo conectado covalentemente a (d) polipéptido de receptor de interleucina-15 α (IL-15R α) soluble o un fragmento funcional del mismo en el que una o ambas de las proteínas de fusión primera y segunda comprenden además un dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo; en donde el dominio de IL-15 de la primera proteína de fusión se une al dominio de IL-15R α soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles y en donde el polipéptido de IL-15 es una variante de IL-15 que tiene una sustitución de N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 natural humana madura y en donde el polipéptido de IL-15R α comprende el dominio sushi de IL-15R α .

En ciertas realizaciones, en los complejos de proteínas de fusión solubles, uno de los polipéptidos biológicamente activos primero y segundo incluye un primer receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) soluble o un fragmento funcional del mismo. En ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de fusión solubles que incluye un primer TCR soluble incluye un segundo TCR soluble como el polipéptido biológicamente activo, creando de ese modo un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con actividad de unión incrementada. En ciertas realizaciones, los TCR en el complejo incluyen al menos dos TCR diferentes. En ciertas realizaciones, todos los TCR son iguales. En ciertas realizaciones, cuando están presentes al menos dos TCR diferentes, los TCR se unen a moléculas diana separadas. En ciertas realizaciones, cuando están presentes al menos dos TCR diferentes, los TCR se unen a epítopos distintos en la misma molécula diana. En ciertas realizaciones, los TCR son específicos para el reconocimiento de un antígeno particular.

En el complejo de fusión soluble de la invención, en ciertas realizaciones, los TCR se seleccionan independientemente de un heterodímero que comprende TCR de cadenas α y β y un polipéptido de TCR monocatenario. En ciertas realizaciones, el TCR monocatenario incluye una cadena V- α de TCR conectada covalentemente a una cadena V- β de TCR mediante una secuencia conectora de péptidos. En ciertas realizaciones, el TCR monocatenario incluye además un fragmento de cadena C β de TCR soluble conectado covalentemente a una cadena V- β de TCR. En ciertas realizaciones, el TCR monocatenario incluye además un fragmento de la cadena C α de TCR soluble conectado covalentemente a una cadena V- α de TCR. En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el primer polipéptido biológicamente activo incluye un polipéptido α de TCR o un fragmento funcional del mismo y el segundo polipéptido biológicamente activo incluye un polipéptido β de TCR o un fragmento funcional del mismo.

En ciertas realizaciones, en un complejo de proteínas de fusión solubles uno o ambos del polipéptido biológicamente activo primero y segundo incluye un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. En ciertas realizaciones, los anticuerpos en el complejo incluyen al menos dos anticuerpos diferentes. En ciertas realizaciones, todos los anticuerpos son iguales. En ciertas realizaciones, cuando están presentes al menos dos anticuerpos diferentes, los anticuerpos se unen a moléculas diana separadas. En ciertas realizaciones, cuando están presentes al menos dos anticuerpos diferentes, los anticuerpos se unen a distintos epítopos en la misma molécula diana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son específicos para el reconocimiento de un antígeno particular.

En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario o Fv monocatenario. En ciertas realizaciones, en anticuerpo monocatenario comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina conectado covalentemente a un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina mediante una secuencia conectora de polipéptidos. En ciertas realizaciones, el primer polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo y el segundo polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

En los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención, el polipéptido de IL-15 es una variante de IL-15 que tiene una sustitución de N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura. El polipéptido de IL-15 humana se denomina en la presente hUL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 silvestre (wt, del inglés wild-type) y similares y se hace referencia a las variantes del mismo usando el aminoácido natural, su posición en la secuencia madura y el aminoácido variante. Por ejemplo, huIL15N72D se refiere a IL-15 humana que comprende una sustitución de N por D en la posición 72.

En ciertas realizaciones de la invención, en el complejo de proteínas de fusión solubles, el dominio Fc o un fragmento funcional del mismo incluye un dominio Fc seleccionado del grupo que consiste en dominio Fc de IgG, dominio Fc de IgG1 humana, dominio Fc de IgG2 humana, dominio Fc de IgG3 humana, dominio Fc de IgG4 humana, dominio Fc de IgA, dominio Fc de IgD, dominio Fc de IgE, dominio Fc de IgM; o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el dominio Fc incluye un cambio de aminoácido que da como resultado un dominio Fc con propiedades alteradas del complemento o de la unión al receptor de Fc. Se conocen en la técnica cambios de aminoácidos para producir un dominio Fc con propiedades alteradas del complemento o de la unión al receptor de Fc. Por ejemplo, una sustitución de residuos de leucina en las posiciones 234 y 235 de la C_H2 de IgG1 (numeración basada en la secuencia de consenso del anticuerpo) (es decir... PELLGG ...(SEQ ID N°: 1)) por residuos de alanina (es decir... PEAAAGG ...(SEQ ID N°: 2)) da como resultado una pérdida de la unión al receptor de Fc y mientras que la sustitución del residuo de lisina en la posición 322 de la C_H2 de IgG1 (numeración basada en la secuencia de consenso del anticuerpo) (es decir... KCKSL ...(SEQ ID N°: 3)) por un residuo de alanina (es decir...KCASL... (SEQ ID N°: 4)) da como resultado una pérdida de la activación del complemento. En ciertas realizaciones, tales mutaciones se pueden combinar.

En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el primer polipéptido biológicamente activo está conectado covalentemente a polipéptido de IL-15 (o un fragmento funcional del mismo) mediante una secuencia conectora de polipéptidos. En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el segundo polipéptido biológicamente activo está conectado covalentemente a polipéptido de IL-15R α (o un fragmento funcional del mismo) mediante una secuencia conectora de polipéptidos. En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el polipéptido de IL-15R α (o un fragmento funcional del mismo) está conectado covalentemente al dominio Fc (o un fragmento funcional del mismo) mediante una secuencia conectora de polipéptidos. Cada secuencia conectora de polipéptidos se puede seleccionar independientemente. En ciertas realizaciones, las secuencias conectoras de polipéptidos son iguales. En ciertas realizaciones, son diferentes.

En ciertas realizaciones, el antígeno para el dominio de TCR incluye un antígeno peptídico presentado en una molécula de MHC o HLA. En ciertas realizaciones, el antígeno peptídico se deriva de (es decir, incluye al menos una secuencia parcial de) un polipéptido asociado a un tumor o un polipéptido codificado por un virus. En ciertas realizaciones, el antígeno para el dominio de anticuerpo comprende un receptor o ligando de la superficie celular.

En ciertas realizaciones, el antígeno para el dominio de anticuerpo es uno o más de un antígeno CD, un receptor o ligando de citocinas o quimiocinas, un receptor o ligando de factores de crecimiento, una molécula de adherencia celular, moléculas de MHC/similares a MHC, un receptor de Fc, un receptor similar a Toll, un receptor de NK, TCR,

BCR, un receptor o ligando coestimulante positivo/negativo, un receptor o ligando de la muerte, un antígeno asociado a un tumor o un antígeno codificado por un virus.

5 En ciertas realizaciones del complejo de proteínas de fusión solubles, el polipéptido de IL-15R α incluye el dominio extracelular del receptor de IL-15 α capaz de unirse a polipéptido de IL-15. Se hace referencia en la presente al polipéptido de IL-15R α humano soluble como hIL-15R α , huIL-15R α , hIL-15R α , huIL-15R α y similares. Según la invención, el polipéptido de IL-15R α incluye el dominio sushi (Su) de IL-15R α .

10 En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención están multimerizados, p. ej., dimerizados, trimerizados o multimerizados de otro modo (p. ej., 4 complejos, 5 complejos, etc.). En ciertas realizaciones, los multímeros son homomultímeros. En ciertas realizaciones, los multímeros son heteromultímeros. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de fusión solubles están ligados mediante enlaces covalentes, p. ej., enlaces disulfuro, agentes de reticulación químicos. En ciertas realizaciones, el enlace disulfuro conecta covalentemente el dominio Fc del segundo polipéptido del primer complejo de proteínas de fusión solubles al dominio Fc del segundo polipéptido del segundo complejo de proteínas de fusión solubles.

15 En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención incluyen un polipéptido de IL-15, una variante de IL-15 o un fragmento funcional de los mismos y un polipéptido de IL-15R α soluble o un fragmento funcional del mismo, en donde uno o ambos de los polipéptidos de IL-15 e IL-15R α incluyen además un dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo.

20 En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención incluyen al menos una de las proteínas de fusión solubles que comprenden una etiqueta detectable. Etiquetas detectables incluyen, pero no se limitan a, biotina, estreptavidina, una enzima o un fragmento catalíticamente activo de la misma, un radionúclido, una nanopartícula, un ion metálico paramagnético o una molécula fluorescente, fosforescente o quimioluminiscente; o cualquier combinación de los mismos.

25 La invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas de fusión de la invención. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico incluye además una o más secuencias de control de la traducción y/o transcripción, p. ej., una secuencia promotora, de señal de inicio de la traducción y líder; conectadas operativamente a la secuencia que codifica la proteína de fusión. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es un vector para la replicación, la expresión o ambas.

La invención proporciona un método para elaborar los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención. El método incluye las etapas de:

- 30 a) introducir en una primera célula hospedadora un vector de ADN con secuencias de control apropiadas que codifican la primera proteína de fusión,
- b) cultivar la primera célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la primera proteína de fusión en la célula o el medio;
- c) purificar la primera proteína de fusión de las células hospedadoras o el medio,
- 35 d) introducir en una segunda célula hospedadora un vector de ADN con secuencias de control apropiadas que codifican la segunda proteína de fusión,
- e) cultivar la segunda célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la segunda proteína de fusión en la célula o el medio; y
- f) purificar la segunda proteína de fusión de las células hospedadoras o el medio, y
- 40 g) mezclar las proteínas de fusión primera y segunda bajo condiciones suficientes para permitir la unión entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles.

45 En ciertas realizaciones, el método incluye además mezclar la proteína de fusión primera y segunda bajo condiciones suficientes para permitir la formación de un enlace disulfuro entre los polipéptidos expresados desde los vectores de expresión.

La invención proporciona métodos para elaborar complejos de proteínas de fusión solubles de la invención, incluyendo los métodos las etapas de:

- 50 a) introducir en una célula hospedadora un vector de ADN con secuencias de control apropiadas que codifican la primera proteína de fusión y un vector de ADN con secuencias de control apropiadas que codifican la segunda proteína de fusión,
- b) cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio

de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles;

c) purificar el complejo de proteínas de fusión solubles de las células hospedadoras o el medio.

5 En ciertas realizaciones, el método incluye además mezclar la primera y la segunda proteína de fusión bajo condiciones suficientes para permitir la formación de un enlace disulfuro entre los polipéptidos expresados a partir de los vectores de expresión.

La invención proporciona métodos para elaborar complejos de proteínas de fusión solubles de la invención, incluyendo los métodos las etapas de:

a) introducir en una célula hospedadora un vector de ADN con secuencias de control apropiadas que codifican las proteínas de fusión primera y segunda,

10 b) cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles, y para permitir la formación de un enlace disulfuro entre los polipéptidos codificados por el ácido nucleico de la reivindicación 46;

15 c) purificar el complejo de proteínas de fusión solubles de las células hospedadoras o el medio.

En ciertas realizaciones, el método incluye además mezclar la primera y la segunda proteína de fusión bajo condiciones suficientes para permitir la formación de un enlace disulfuro entre los polipéptidos expresados a partir de los vectores de expresión.

La invención proporciona métodos in vitro para destruir una célula diana, incluyendo el método las etapas de:

20 a) poner en contacto una pluralidad de células con un complejo de proteínas de fusión solubles de la invención, en donde la pluralidad de células incluye además células inmunitarias que incluyen las cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio de IL-15, o células inmunitarias que incluyen las cadenas del receptor de Fc reconocidas por el dominio Fc, y las células diana que incluyen un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos,

25 b) formar un complejo de unión (puente) específico entre el antígeno sobre la célula diana y las cadenas de IL-15R o receptor de Fc en las células inmunitarias suficiente para unirse a y activar las células inmunitarias; y

c) destruir las células diana mediante las células inmunitarias activadas unidas.

En ciertas realizaciones de los métodos de destrucción, las células diana son células tumorales o células infectadas viralmente.

30 En ciertas realizaciones de los métodos de destrucción, el polipéptido biológicamente activo incluye un TCR.

En ciertas realizaciones de los métodos de destrucción, el antígeno en las células diana incluye un antígeno peptídico tumoral o codificado viralmente presentado en una molécula de MHC o HLA y reconocido por el TCR. Las células inmunitarias son, por ejemplo, células T, células LAK, células NK, macrófagos, monocitos o granulocitos.

35 La invención proporciona el complejo de proteínas de fusión solubles que se divulga anteriormente que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a una enfermedad para el uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a una enfermedad.

40 La invención proporciona una mezcla de células inmunitarias-complejo de proteínas de fusión obtenida al mezclar células inmunitarias que incluyen cadenas de IL-15R o cadenas de receptor de Fc con un complejo de proteínas de fusión solubles como el divulgado anteriormente que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a una enfermedad para el uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a una enfermedad.

45 En ciertas realizaciones del método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a una enfermedad, la enfermedad es cáncer o una infección viral. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a una enfermedad es un complejo péptido/MHC.

La invención proporciona una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión solubles de la invención para el uso en métodos para estimular respuestas inmunitarias en un mamífero.

La invención proporciona una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de la invención para el uso en métodos para suprimir respuestas inmunitarias en un mamífero.

Se divulgan métodos para detectar células o tejido que tienen un antígeno presentado en las células o el tejido, incluyendo el método las etapas de:

- 5 a) poner en contacto las células o el tejido con al menos un complejo de proteínas de fusión solubles de la invención que incluye una etiqueta detectable bajo condiciones que forman un complejo de unión específico entre el antígeno y el polipéptido biológicamente activo del complejo de proteínas de fusión solubles,
- b) lavar las células o el tejido bajo condiciones apropiadas para retirar cualquier complejo de proteínas de fusión solubles no unido al antígeno; y
- c) detectar el complejo de unión específico cuando es indicativo de células o tejido que comprenden el antígeno.

10 En ciertas realizaciones de los métodos de detección, el polipéptido biológicamente activo comprende un TCR y el antígeno comprende un antígeno peptídico presentado en una molécula de MHC o HLA que es reconocido por el TCR. Los métodos de detección proporcionados en la presente son muy sensibles. Por ejemplo, en los métodos, el número de copias del antígeno presente es 1.000 o menos copias por célula. Los métodos de detección proporcionados en la presente se pueden poner en práctica in vivo, in vitro o ex vivo.

15 Se divulgan métodos para incrementar la actividad de unión por molécula de un complejo de proteínas de fusión solubles de la invención al formar un dímero de un primer complejo de proteínas de fusión solubles y un segundo complejo de proteínas de fusión solubles en el que el sitio de unión del primer polipéptido biológicamente activo y el segundo péptido biológicamente activo de cada complejo de proteínas de fusión son iguales o diferentes. En ciertas realizaciones, la unión se incrementa sinérgicamente. Por ejemplo, la actividad de unión por molécula se incrementa en 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más o 70% o más.

20 Se divulga un método para incrementar la actividad de IL-15 por molécula de un complejo de proteínas de fusión solubles de la invención al formar un dímero de un primer complejo de proteínas de fusión solubles y un segundo complejo de proteínas de fusión solubles.

25 Se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión de interleucina-15 (IL-15):receptor de interleucina-15 (IL-15R α), implicando el método introducir en una célula hospedadora (p. ej., una célula de mamífero) un primer vector de ADN que codifica IL-15 (o una variante de IL-15) y un segundo vector de ADN que codifica una proteína de fusión de IL-15R α ; cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la IL-15 (o variante de IL-15) y la proteína de fusión de IL-15R α ; y purificar el complejo de proteínas de fusión IL-15:IL-15R α de la célula hospedadora o el medio.

30 Se describe un método para elaborar un complejo IL-15:IL-15R α que contiene una proteína de fusión IL-15R α /Fc, implicando el método introducir en una célula hospedadora un primer ADN que codifica IL-15 (o variante de IL-15) y un segundo ADN que codifica una proteína de fusión IL-15R α /Fc; cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la IL-15 (o variante de IL-15) y la proteína de fusión IL-15R α /Fc; y purificar el complejo IL-15:IL-15R α /Fc de la célula hospedadora o el medio.

35 Se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión IL-15:IL-15R α que contiene una proteína de fusión IL-15R α /Fc, implicando el método coexpresar IL-15 (o variante de IL-15) y una proteína de fusión IL-15R α /Fc en una célula hospedadora; cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la IL-15 (o variante de IL-15) y la proteína de fusión IL-15R α /Fc; y purifica el complejo de proteínas de fusión IL-15:IL-15R α /Fc de la célula hospedadora o el medio.

40 Se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc que implica coexpresar IL-15N72D y una proteína de fusión IL-15R α Su/Fc en una célula hospedadora; cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la IL-15N72D y la proteína de fusión IL-15R α Su/Fc; y purificar el complejo de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc de la célula hospedadora o el medio, donde ambos sitios de unión a IL-15 del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc están completamente ocupados.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una célula que contiene un primer polinucleótido que codifica IL-15 o una variante de IL-15 y un segundo polinucleótido que codifica una proteína de fusión del receptor de IL-15 según se divulga anteriormente. En una realización, la célula comprende un primer vector de expresión que codifica IL-15N72D y un segundo vector de expresión que codifica una proteína de fusión IL-15R α Su/Fc.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado aislado que contiene una IL-15R α Su/Fc dímera y dos moléculas de IL-15N72D. En una realización, el complejo está al menos 90-95% o más totalmente ocupado purificado; tiene un punto isoeléctrico entre 5,6 y 6,5; tiene un peso molecular de aproximadamente 114 kDa; y/o está glicosilado en cualquiera o ambos de los polipéptidos de IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado aislado producido según cualquier método de expresión y purificación esbozado en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado para el uso en un método para modular (p. ej., incrementar o disminuir) una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado para el uso en un método para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene neoplasia.

- 5 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores o cualquier otro aspecto de la invención esbozado en la presente, la proteína de fusión de IL-15R α comprende IL-15R α soluble conectado covalentemente a un polipéptido biológicamente activo (p. ej., el dominio constante de cadena pesada de IgG, un dominio Fc del dominio constante de cadena pesada de IgG). En otras realizaciones de la invención de los aspectos anteriores, IL-15 comprende IL-15 conectada covalentemente a un segundo polipéptido biológicamente activo. En otras realizaciones, purificar el
- 10 complejo IL-15:IL-15R α de la célula hospedadora o el medio implica capturar el complejo IL-15:IL-15R α en un reactivo de afinidad que se une específicamente al complejo de proteínas de fusión IL-15:IL-15R α . En otras realizaciones, la proteína de fusión de IL-15R α contiene una proteína de fusión IL-15R α /Fc y el reactivo de afinidad se une específicamente al dominio Fc. En otras realizaciones, el reactivo de afinidad es proteína A o proteína G. En otras realizaciones, el reactivo de afinidad es un anticuerpo. En otras realizaciones, purificar el complejo IL-15:IL-15R α de la célula hospedadora o el medio comprende cromatografía de intercambio iónico. En otras realizaciones, purificar el complejo IL-15:IL-15R α de la célula hospedadora o el medio comprende cromatografía de exclusión por tamaño. El IL-15R α comprende IL-15R α Sushi (IL-15R α Su). La IL-15 es una IL-15 variante, es decir IL-15N72D. En otras realizaciones, los sitios de unión a IL-15 del complejo IL-15:IL-15R α están totalmente ocupados. En otras realizaciones, ambos sitios de unión a IL-15 del complejo IL-15:IL-15R α Su/Fc están totalmente ocupados. En otras
- 20 realizaciones, el complejo IL-15:IL-15R α se purifica basándose en las propiedades de carga compleja o de tamaño. En otras realizaciones, el complejo de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico basándose en las propiedades de carga compleja. En otras realizaciones, el complejo de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado se purifica usando una resina a base de amina cuaternaria con condiciones de unión que emplean tampones de pH neutro de baja
- 25 intensidad iónica y condiciones de elución que emplean tampones de intensidad iónica creciente.

Se describen estuches que incluyen uno o más de los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención, uno o más reactivos específicos (p. ej., un nucleótido que codifica uno o más complejos de proteínas de fusión solubles de la invención) para elaborar los complejos de proteínas de fusión solubles de invención, y/o materiales específicos para usar uno o más complejos de proteínas de fusión solubles de la invención. Los materiales de los estuches se proporcionan en un envase apropiado, típicamente con instrucciones de uso.

30

Otras realizaciones estarán claras a partir de la divulgación posterior.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra la proteína de fusión denominada molécula T2 (T2M) que consiste en un polipéptido multicatenario.
- 35 La Figura 2 muestra el vector (pMC.c264scTCR-Su/IgG1.PUR) que contiene el inserto génico IL15R α Sushi humano correcto.
- La Figura 3 muestra la secuencia de la secuencia de ácido nucleico de c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 (SEQ ID N°: 34).
- La Figura 4 muestra la secuencia proteínica del péptido c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 (SEQ ID N°: 35).
- 40 La Figura 5 muestra el vector denominado c264scTCR/Sushi/hlgG1-pMSGVc o pMSGVc264Sulg.
- La Figura 6 muestra la secuencia de la secuencia de ácido nucleico de c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 (SEQ ID N°: 36).
- La Figura 7 muestra la secuencia proteínica del péptido c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 (SEQ ID N°: 37).
- La Figura 8 muestra el vector denominado c149scTCR/IL15N72D-pMSGVn o pMSGV-c149IL15N72D.
- 45 La Figura 9 muestra la secuencia de la secuencia de ácido nucleico de c149scTCR/huL15N72D (SEQ ID N°: 38).
- La Figura 10 muestra la secuencia proteínica del péptido c149scTCR/huL15N72D (SEQ ID N°: 39).
- La Figura 11 muestra un análisis de SDS-PAGE de fracciones de purificación de las proteínas de fusión T2, c264scTCR/hulgG1 y c264scTCR/hulgG1 Δ CH1 bajo condiciones reductoras y no reductoras. Bajo condiciones reductoras, las bandas de la molécula T2 migran a pesos moleculares consecuentes con los polipéptidos c264scTCR/huL15 y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1. Bajo condiciones desnaturizantes no reductoras, la banda de c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 migra a un peso molecular consecutivo con un complejo de c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 dímero conectado por disulfuro y un polipéptido c264scTCR/huL15N72D.
- 50

La Figura 12 muestra resultados de cromatografía de filtración en gel con exclusión por tamaño que demuestran que la proteína T2 natural se eluía al peso molecular esperado de una molécula de cuatro cadenas (2 x c264scTCR/IL15N72D, 2 x c264scTCR/huL15Sushi/hulgG1).

5 La Figura 13 muestra resultados de un ensayo de unión in vitro en el que cantidades equimolares de proteína T2 purificada, compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1, o proteína de fusión de c264scTCR/hulgG1 purificada eran capturadas sobre pocillos revestidos con anticuerpo anti-IgG1 humana. Después de la unión, las proteínas se detectaron usando anticuerpo anti-IgG1 humana bajo condiciones de ELISA estándar.

10 La Figura 14 muestra resultados de un ensayo de unión in vitro en el que cantidades equimolares de proteínas de T2 o c264scTCR/hulgG1 eran capturadas sobre pocillos revestidos con Ab anti-IgG1 humana y detectadas con un anticuerpo anti-C β de TCR humana (W4F).

15 La Figura 15 muestra resultados de un ensayo de unión in vitro en el que se examinó la actividad de unión a péptido/MHC de los dominios de TCR de la molécula T2. Cantidades equimolares de T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1) o proteínas de c264scTCR/hulgG1 fueron capturadas sobre pocillos revestidos con Ab anti-IgG1 humana y detectadas con tetrámeros de péptido p53 (aa 264-272)/HLA-estreptavidina A2-HRP.

20 La Figura 16 muestra resultados de un ensayo in vitro para demostrar la actividad del dominio de IL-15 de la molécula T2. Se revistieron pocillos de microvaloración con anticuerpo anti-IL-15 humana y se aplicaron a los pocillos cantidades molares equivalentes de proteína de T2 purificada, compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1, o proteína de fusión c264scTCR/huL15N72D. Después de las etapas de unión y lavado, las proteínas unidas se detectaron con anticuerpo anti-IL-15 humana bajo condiciones de ELISA estándar.

25 La Figura 17 muestra los resultados de un ensayo de proliferación para caracterizar adicionalmente la actividad funcional del dominio de IL-15 de las moléculas T2 usando la línea celular 32D β dependiente de citocinas. Para medir la proliferación celular, células 32D β (2 x 10⁴ células/pocillo) se incubaron con concentraciones crecientes de proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1) o proteína de fusión c264scTCR/huL15N72D durante 48 h a 37°C. Se añadió reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche® Applied Science) durante las últimas 4 h del crecimiento celular según los procedimientos del fabricante. La conversión de WST-1 en el colorante formazano coloreado por células metabólicamente activas se determinó a través de medidas de absorbancia a 440 nm.

Las Figuras 18A-B muestran los resultados de un modelo en primates in vivo para determinar la capacidad de la proteína T2 para promover la proliferación de células inmunitarias sensibles a IL-15. Se extrajo sangre cinco días después de la inyección con proteína T2 y se tiñó con respecto a marcadores de células T con memoria CD8 (CD8 y CD95) (A) y marcadores de células NK (CD56 y CD16) (B) y se comparó con sangre extraída antes del tratamiento.

35 Las Figuras 19A-B muestran ensayos de unión celular que caracterizan la actividad de unión del dominio Fc de IgG1 de la molécula T2. A. El análisis por citometría de flujo muestra resultados de un ensayo en el que células U937 que incluyen el receptor de Fc- γ se incubaron con 33 nM de proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1), c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo) durante 20 min. Las células se lavaron una vez y se incubaron con tetrámero de péptido p53 (aa 264-272) conjugado a PE/HLA-A2 durante 20 min. La unión a receptores de Fc γ sobre la superficie de células U937 se analizó con citometría de flujo. B. Se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo que muestra resultados de un estudio de unión a U937 similar que usa un intervalo de concentraciones de proteína como el indicado y se representó la intensidad fluorescente media para las células teñidas.

45 La Figura 20 muestra resultados de un ensayo para determinar la actividad biológica de los dominios Fc de las moléculas T2 para mediar en la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se añadieron proteína T2, c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo) a una placa de 96 pocillos a una concentración de 0,137 nM a 100 nM. Células diana T2 positivas a HLA-A2 se sometieron a impulsos con 10 μ M de péptido p53 aa264-272 y se marcaron con 50 μ g/ml de calceína-AM. Las proteínas de fusión se mezclaron con 1 x 10⁴ de la célula diana por pocillo y se añadieron 1 x 10⁶/pocillo de PBMC humanas recientes. La placa se incubó a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 2 h y se recogieron 100 μ l del medio condicional y se analizaron cuantitativamente con respecto a la calceína liberada de células sometidas a lisis.

50 Las Figuras 21A y B muestran resultados de un ensayo en el que células T2 positivas a HLA-A2 se sometieron a impulsos con diversas cantidades de péptido p53 aa264-272 para examinar la actividad de unión de proteína T2 a dianas de péptido/MHC sobre la superficie celular. Las células cargadas con péptido se incubaron con proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1), c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo), cada una en 83 nM. Las células se incubaron con Ab anti-TRC biotinilado (BF1) y estreptavidina-PE. A continuación, las células se analizaron con respecto a la tinción de anticuerpo mediante

citometría de flujo para A y la intensidad de tinción de fluorescencia media de las células cargadas con diferentes concentraciones de péptido se representa para B.

5 La Figura 22 muestra los resultados de un ELISA en el que moléculas T2 de c149scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 o c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 (en el sobrenadante de cultivo celular) se capturaron sobre placas de microvaloración revestidas con el anticuerpo anti-TCR humano BF1, y las moléculas T2 unidas se detectaron usando el anticuerpo anti-TCR humano W4F-BN.

10 La Figura 23 muestra los resultados de un ELISA en el que moléculas T2 de c149scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 o c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 (en el sobrenadante de cultivo celular) se capturaron sobre placas de microvaloración revestidas con el anticuerpo caprino anti-IgG humana, y las moléculas T2 unidas se detectaron usando el anticuerpo anti-IL-15 humana.

15 La Figura 24 muestra los resultados de un ELISA en el que moléculas T2 de c149scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 (en el sobrenadante de cultivo celular) se capturaron sobre placas de microvaloración revestidas bien con anticuerpo caprino anti-IgG humana o bien anticuerpo anti-TCR humano BF1. Las moléculas T2 capturadas en BF1 se detectaron bien con anticuerpo anti-TCR humano W4F-BN o bien anticuerpo anti-IL-15 humana. Las moléculas T2 capturadas en Ab caprino anti-IgG humana se detectaron bien con los tetrámeros de péptido p53 (aa 149-157)/HLA-estreptavidina A2-HRP o los tetrámeros de péptido p53 (aa 264-272)/HLA-estreptavidina A2-HRP.

20 La Figura 25 muestra resultados de un ensayo de citometría de flujo en el que se caracterizaron moléculas T2 que comprenden dos dominios de TCR diferentes, es decir las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c149scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1. La actividad de Fc y TCR de estas moléculas se examinó después de la unión a células U937 que incluyen receptor de Fc- γ y la detección con tetrámeros de péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 seguido por citometría de flujo.

25 Las Figuras 26A y B muestran los resultados de un ensayo farmacocinético en el que A. ratones o B. monos fueron inyectados con proteína T2 purificada compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1. Se recogieron muestras en los momentos indicados. A. Ensayos con formato de ELISA en los que se usó Ab caprino anti-IgG humana para revestir los pocillos y se usó Ab anti-TCR humano (W4F-BN) para la detección; o se usó Ab caprino anti-IgG humana para revestir las placas y se usó Ab anti-IL-15 humana para la detección, según se indica para cuantificar la cantidad de la proteína T2 en la sangre en los momentos indicados. B. Se usó Ab anti-TCR humano (β F-1) para revestir los pocillos, y se usó Ab caprino anti-IgG humana conjugado a HRP para la detección; o se usó Ab anti-IL-15 humana para revestir las placas y se usó Ab caprino anti-IgG humana conjugado a HRP para la detección; o se usó Ab anti-IL-15 humana para revestir las placas y se usó Ab anti-TCR humano (W4F-BN) para la detección.

35 La Figura 27 muestra resultados de un modelo de crecimiento tumoral primario que usa una línea celular de melanoma A375 p53+ HLA-A2+ humana en ratones atímicos. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados intravenosamente con 32 μ g/dosis (1,6 mg/kg) de proteína T2 compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1, 32 μ g/dosis (1,6 mg/kg) de c264scTCR/huIL2 o 60 μ g/dosis (3 mg/kg) de c264scTCR/hulgG1. Se midió el crecimiento tumoral y los datos se muestran en la figura.

La Figura 28 muestra los resultados de ensayos de actividad de IL-15 de moléculas T2 con diversas mutaciones puntuales en el dominio IL-15 según se mide mediante proliferación de células 32D β .

40 La Figura 29 muestra resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos que usa moléculas T2 con diversas mutaciones puntuales en los dominios IL-15 y FC de IgG según se mide mediante lisis dependiente de PBMC de células diana T2 cargadas con péptido.

45 La Figura 30 muestra resultados de un ensayo para detectar los efectos de las mutaciones en IL-15 y Fc sobre la capacidad de las moléculas T2 para estimular respuestas de células NK y T humanas. Se incubaron PBMC humanas a 1,8 a 5 x 10⁵ células/ml durante 4 días a 37°C en medio que contenía 1 nM de moléculas T2 que comprendían las mutaciones indicadas o con 10 ng/ml de IL-2 o IL-15 humana recombinante como un control. A continuación, se examinó la citotoxicidad para células NK usando células K-562 sensibles a NK después del etiquetado con 50 μ g/ml de calceína-AM.

50 La Figura 31 muestra resultados de un ensayo de proliferación de células NK en el que se incubaron PBMC humanas con moléculas T2 que comprendían diversas mutaciones puntuales en los dominios IL-15 y Fc de IgG o con IL-2 o IL-15 humanas recombinantes como un control. Moléculas T2 que comprendían las cadenas c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huIL15N72D o aquellas con las variantes LALA y KA del dominio Fc daban como resultado un incremento en la proliferación de células NK CD56+ mientras que las moléculas T2 que comprendían las sustituciones N65D o D8N de IL-15 no proporcionaban tanta actividad proliferativa de células NK.

55 Las Figuras 32A y B muestran resultados de ensayos de citometría de flujo para probar la unión específica para antígeno de moléculas T2 que incluían las mutaciones en IL-15 y Fc a células T2 con (T2.265) y sin péptido p53

cargado (T2). A muestra histogramas de citometría de flujo y B muestra la relación señal a ruido de la tinción celular específica para péptido a no específica.

Las Figuras 33A a C muestran resultados de ensayos para detectar la actividad de diversas moléculas T2 y moléculas IL-15 A. para soportar el crecimiento de células 32D β , B. para estimular la expansión de diversas poblaciones de células T y C. para estimular la actividad de células NK.

La Figura 34 muestra resultados de un ensayo in vivo para determinar la actividad inmunoestimulante de diversas moléculas T2 en ratones según se indica por cambios en el porcentaje de células T CD8 $^{+}$ y células NK en células de sangre y bazo según se detecta usando citometría de flujo.

Las Figuras 35A y B muestran resultados de un ELISA que usa una molécula T2 multiespecífica que comprende 1) el dominio hUL15N72D fusionado a un scTCR específico para el péptido procedente de los aminoácidos 257-264 de ovalbúmina y 2) un dominio CD8 α/β conectado a la fusión hUL15R α Sushi/hulG1. La actividad de unión de OT1-CD8-T2M se comparó con la fusión OT1scTCR/hUL15N72D mediante ELISA. Se capturaron cantidades molares iguales de cada proteína sobre un pocillo revestido con mAb anti-TCR C β (H57) y se sondaron con tetrámeros de OVA aa257-264/H-2Kb o mAb para IL15, CD8 α , CD8 β o TCR V α 2. También se realizaron ensayos con pocillos revestidos con anticuerpo anti-Ig humana y se sondaron con anticuerpo anti-TCR V α 2.

La Figura 36 A. muestra un diagrama esquemático del complejo c264scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R α Su/birA (dímero de c264scTCR). El modelo de los dominios hIL-15:hIL-15R α Su dímeros se basa en la estructura cristalina publicada del complejo IL-15:IL-15R α humano (33) (PDB 2Z3Q) B. muestra el análisis por SEC de proteínas de fusión c264scTCR. Los paneles muestran el análisis por tamaños de c264scTCR/hIL-15 (superior), c264scTCR/hIL-15R α Su/birA (medio) y complejo c264scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R α Su/birA (dímero de c264scTCR) (inferior), indicando las líneas de puntos picos de proteína relativos.

La Figura 37 muestra la caracterización de la actividad de unión del dímero de c264scTCR que comprende el complejo c264scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R α Su/birA y el heterodímero de c264scTCR/c149scTCR que comprende el complejo c149scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R α Su/birA. A. Células T2 se sometieron a impulsos con 0-62,5 nM de péptido p53 (aa264-272). Las células se tiñeron con cantidades equivalentes (80 nM) de multímeros conjugados a PE del dímero de c264scTCR o c264scTCR/birA. B. El incremento relativo en la tinción de las células comparando dímero de c264scTCR con reactivos c264scTCR/birA se determinó a diferentes concentraciones de péptido. Incremento en número de veces = (Media Geo de células T2 teñidas por dímero de c264scTCR) / (Media Geo de células T2 teñidas por c264scTCR/birA). C. La actividad de unión a péptido p53/HLA-A*0201 del heterodímero de c264scTCR/c149scTCR se determinó mediante ELISA. Se usó anticuerpo monoclonal contra hIL-15 (R&D System) como un anticuerpo de captura. Se usaron tetrámeros A2/p53.264-272.HRP o A2/p53.149-157.HRP como las sondas. Los datos representan las medias \pm DE de determinaciones por triplicado.

La Figura 38 muestra la caracterización de la actividad de unión del dímero de OT1scTCR que comprende el complejo OT1scTCR/hIL-15:OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA. Se cargaron células EL4 con péptido de OVA (aa257-264) y se tiñeron con OT1scTCR/birA-SA-PE (superior) y dímero OT1scTCR-SA-PE (inferior) a 200 nM.

La Figura 39 muestra que el heterodímero de OTscTCR/scCD8 que comprende el complejo OT1scTCR/hIL-15:scCD8/hIL-15R α Su/birA exhibe una actividad de unión a pMHC1 mejorada. A. La expresión en CD8 murino del heterodímero de OT1scTCR/scCD8 se determinó mediante ELISA. Se usó mAb anti-mTCR H57-597 como anticuerpo de captura. El mAb anti-CD8 α o CD8 β murinas biotinilado se usó como una sonda seguido por SA-HRP. Los datos representan las medias \pm DE de determinaciones por triplicado. B. Se cargaron células EL4 con péptido de OVA (aa257-264) a la concentración indicada y se tiñeron con dímero de OT1scTCR-SA-PE (superior) y heterodímero de OT1scTCR/scCD8-SA-PE (inferior) a 200 nM.

Figura 40. Proteínas de fusión que contienen heterodímeros de TCR α/β que comprenden el complejo TCR α hIL-15:TCR β hIL-15R α Su/birA retienen actividad de unión a pMHC1. A. La actividad de unión de OT1scTCR/birA y heterodímero OT1TCR α/β a complejo OVA (aa257-264)/H-2Kb se determinó mediante ELISA. Se usó mAb anti-mTCR H57-597 como anticuerpo de captura. Se usó tetrámero Kb/OVA.257-264.HRP como una sonda. B. La actividad de unión de 264scTCR/birA y heterodímero de 264TCR α/β a complejo p53 (aa264-272)/HLA-A *0201 se determinó mediante ELISA. Se usó mAb anti-TCR como anticuerpo de captura. Se usó tetrámero A2/p53.264-272.HRP como una sonda. Los datos representan las medias \pm DE de determinaciones por triplicado.

La Figura 41 muestra la unión a IL-15 y la actividad funcional de proteínas de fusión. A. Se incubaron células 32D β con 320 nM de los dímeros de c264scTCR que comprenden IL-15 silvestre o dominios de muteína IL-15N72D o IL-15D8N. La unión de las proteínas de fusión se detectó a su vez con Ab anti-C β de TCR humano. B. La capacidad de los dímeros de c264scTCR que comprenden IL-15 silvestre o dominios de muteína para soportar la proliferación de células 32D β se determinó como se describe en los Ejemplos. Los datos representan las medias \pm intervalo de determinaciones por duplicado.

La Figura 42 muestra la actividad de unión a OVA (aa257-264)1H-2K b de OT1scTCR/hIL-15D8N, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA y dímero de OT1scTCR determinada mediante ELISA. Se usó mAb anti-mTCR H57-597 como

anticuerpo de captura. Se usó el tetrámero Kb/OVA.257-264.HRP como una sonda. Los datos representan las medias \pm DE de determinaciones por triplicado.

La Figura 43 muestra curvas de unión de proteína de fusión OT1scTCR a OVA (aa257-264)/H-2K^b y complejos VSV/H-2Kb de control determinadas mediante SPR.

5 La Figura 44A y B muestra resultados de un modelo de crecimiento tumoral primario usando la línea celular tumoral B16 murina en ratones inmunocompetentes. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados intravenosamente con proteínas rhIL-15, T2M, T2M Δ CH1 y T2M Δ TCR Δ CH1 o PBS (control). El crecimiento tumoral se midió y los datos se muestran en A. Los cambios posteriores al tratamiento en el peso corporal de los animales se muestran en B.

10 La Figura 45A y B muestra resultados de un modelo de crecimiento tumoral primario que usa la línea celular tumoral EG7 murina en ratones inmunocompetentes. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados intravenosamente con proteínas rhIL-15, T2M y T2M Δ TCR Δ CH1 o PBS (control). El crecimiento tumoral se midió y los datos se muestran en A. Los cambios posteriores al tratamiento en el peso corporal de los animales se muestran en B.

15 La Figura 46 muestra la secuencia proteínica (SEQ ID N°: 40) del dominio CH2-CH3 o el dominio Fc de IgG1 humana covalentemente y/o genéticamente fusionado con otros dominios proteínicos para generar los complejos de proteínas de fusión.

20 La Figura 47 muestra resultados de un ensayo para determinar la actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por proteínas T2M y scTCR-hulG1 contra células que expresan dianas de péptido/MHC. Diversas cantidades de proteína de fusión (T2M, T2M2 o c264scTCR-Ig) se mezclaron con PBMC humanas recientes y células T2 positivas a HLA-A2 con impulsos de péptido (marcadas con calceína) (relación E:T, 40:1). Después de una incubación de 2 h, el medio de cultivo se recogió y se analizó cuantitativamente con respecto a la calceína liberada de células sometidas a lisis.

25 La Figura 48 muestra resultados de ensayos in vivo para determinar la actividad inmunoestimulante de diversas moléculas T2 en ratones. Ratones C57BL/6 se trataron i.v. con dosis de IL-15 equivalentes molares de hIL-15 (1 mg/kg), IL15N72D:IL15R α -Fc (3,6 mg/kg), T2M (11 mg/kg), T2M2 (10 mg/kg) o un volumen equivalente de PBS el día 1 del estudio. El día 4 del estudio, los ratones fueron sacrificados y se determinaron los recuentos de WBC en sangre y los pesos de los bazo según se muestra en el Panel A. Los cambios en el porcentaje de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) CD8⁺ y NKp46⁺ valoraron mediante citometría de flujo según se muestra en el Panel B. Las PBMC también se usaron para valorar la actividad de células NK basada en la lisis de células diana Yac-1 sensibles a NK en un ensayo de liberación de calceína según se muestra en el Panel C.

30 La Figura 49 muestra resultados de ensayos in vivo para determinar la dosis y las respuestas temporales de diversas moléculas T2 sobre la actividad inmunitaria en ratones. A. Ratones C57BL/6 fueron tratados i.v. con dosis de IL-15 equivalentes molares de hIL-15 (1 mg/kg), IL15N72D:IL15R α -Fc (4 mg/kg), T2M2 (diversas dosis) o un volumen equivalente de PBS el día 1 del estudio. El día 4 del estudio 4, se valoró el porcentaje de células PBMC CD8⁺ y NKp46⁺ mediante citometría de flujo. B. Ratones atímicos fueron tratados i.v. con IL15N72D/IL15R α -Fc (0,2 mg/kg) o T2M2 (2 mg/kg) el día 1 del estudio. El día 4 y 7 después del tratamiento, se valoró el porcentaje de células PBMC NKp46⁺ mediante citometría de flujo.

35 La Figura 50 muestra resultados de un modelo de crecimiento tumoral primario que usa una línea celular de melanoma A375 p53+ HLA-A2+ humana en ratones atímicos. A. Células tumorales de melanoma humano A375 (1 x 10⁶) se inyectaron s.c. en ratones atímicos (5-6/grupo). Se dejó que los tumores se establecieran y los ratones se trataron i.v. con dosis molares equivalentes de IL-15 (0,35 mg/kg), fusiones scTCR-IL15 (1,6 mg/kg), complejo scTCR-IL15/scTCR-IL15R α (3,2 mg/kg) o PBS. Los ratones se trataron tres veces a la semana durante tres semanas empezando el día 11 del estudio. B. Ratones atímicos portadores de tumores A375 también se trataron i.v. con 4 mg/kg de T2M como en A. C. Ratones atímicos portadores de tumores A375 se trataron i.v. con dosis molares equivalentes de IL-15 (0,2 mg/kg), T2M2 (2 mg/kg) o PBS. Los tumores se midieron cada dos días y se representaron los volúmenes de los tumores.

La Figura 51 muestra la secuencia de ácido nucleico de la construcción c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulG1 CH2-CH3 (Fc) (también denominada T2M Δ TCR Δ CH1 y T2M2) (SEQ ID N°: 41).

50 La Figura 52 muestra la secuencia proteínica de la proteína de fusión c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulG1 CH2-CH3 (Fc) madura (también denominada T2M Δ TCR Δ CH1 y T2M2) (SEQ ID N°: 42).

La Figura 53 muestra la secuencia de ácido nucleico de la construcción scAb anti-CD20/hIL-15N72D (SEQ ID N°: 43).

55 La Figura 54 muestra la secuencia proteínica de la proteína de fusión scAb anti-CD20/hIL-15N72D madura (SEQ ID N°: 44).

La Figura 55 muestra la secuencia de ácido nucleico de la construcción scAb anti-CD20/huIL-15R α Su/hulgG1 Fc (SEQ ID N $^{\circ}$: 45).

La Figura 56 muestra la secuencia proteínica de la proteína de fusión scAb anti-CD20/huIL-15R α Su/hulgG1 Fc madura (SEQ ID N $^{\circ}$: 46).

- 5 La Figura 57 muestra resultados de ensayos de citometría de flujo para probar la unión específica para el antígeno CD20 de moléculas T2M scAb anti-CD20 a células de Daudi.

10 La Figura 58 muestra resultados de un ensayo para determinar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos mediada por scAb anti-CD20 T2M contra células tumorales humanas CD20 $^{+}$. Diversas cantidades de proteína de fusión (scAb anti-CD20 T2M, c264scTCR T2M (control negativo) o mAb anti-CD20 quimérico (control positivo)) se mezclaron con PBMC humanas recientes (procedentes de 2 donantes diferentes) y células de Daudi (marcadas con calceína) (relación E:T, 100:1). Después de un período de incubación, el medio de cultivo se recogió y se analizó cuantitativamente con respecto a la calceína liberada de las células sometidas a lisis.

15 La Figura 59 muestra resultados de un ensayo para determinar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos mediada por scAb anti-CD20 T2M contra células tumorales humanas CD20 $^{+}$. Las proteínas de fusión (scAb anti-CD20 T2M, c264scTCR T2M (control negativo) o mAb anti-CD20 quimérico (control positivo)) se mezclaron con diversas cantidades de PBMC humanas recientes (procedentes de 2 donantes diferentes) y células de Daudi (marcadas con calceína). Después de un período de incubación, el medio de cultivo se recogió y se analizó cuantitativamente con respecto a la calceína liberada de células sometidas a lisis.

20 La Figura 60 muestra la secuencia de ácido nucleico de la construcción dominio de cadena ligera V de anti-CD20/dominio constante κ humano/hIL-15N72D (SEQ ID N $^{\circ}$: 47).

La Figura 61 muestra la secuencia proteínica de la proteína de fusión dominio de cadena ligera V de anti-CD20/dominio constante κ humano/hIL-15N72D madura (SEQ ID N $^{\circ}$: 48).

La Figura 62 muestra la secuencia de ácido nucleico de la construcción dominio de cadena ligera V de anti-CD20/dominio CH1 de IgG1 humana/huIL-15R α Su/hulgG1 Fc (SEQ ID N $^{\circ}$: 49).

- 25 La Figura 63 muestra la secuencia proteínica de la proteína de fusión dominio de cadena ligera V de anti-CD20/dominio CH1 de IgG1 humana/huIL-15R α Su/hulgG1 Fc madura (SEQ ID N $^{\circ}$: 50).

La Figura 64 es un dibujo esquemático del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc que consiste en IL-15N72D asociado no covalentemente con la proteína de fusión IL-15R α Su/Fc dímera.

30 La Figura 65 (A - D) son fotografías de perfiles de análisis de electroforesis en gel de preparaciones de IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc. (A) Análisis en gel IEF pH 3-10. Carril 1, Marcador de IEF. Carril 2, complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificado mediante columna rProtein A. Carril 3, IL-15R α Su/Fc. Carril 4, IL-15wt. (B) Análisis en gel IEF pH3-10. Carril 1, Marcador de IEF. Carril 2, complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificado mediante elución con la etapa Q 1. Carril 3, Q1c mediante elución con la etapa Q 2. Carril 4, Q2c mediante elución con la etapa Q 2. (C) Análisis por SDS-PAGE (reducido). Carril 1, Marcador del PM. Carril 2, complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificado mediante columna rProtein A. Carril 3, IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc (Q2c) mediante elución con la etapa Q 2. Carril 4, IL-15R α Su/Fc (a partir del flujo pasante Q). (D) Análisis por SDS-PAGE (reducido) que muestra desglicosilación de proteínas. Carril 1, Marcadores del PM. Los Carriles 2 y 3 muestran proteína IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc digerida con N-Glycosidase F y no digerida, respectivamente. Carril 4, IL-15wt.

40 La Figura 66 es una gráfica de un cromatograma de SEC que usa una columna de filtración en gel Superdex 200 HR 10/30. El complejo IL-15N72D:IL-15R α /Fc purificado se eluyó como un solo pico.

45 La Figura 67 es una gráfica que muestra una comparación del perfil farmacocinético de IL-15wt y el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc después de la administración intravenosa en ratones CD-1. El ELISA de Ab anti-IL-15 mide la concentración de IL-15wt (■). El ELISA de Ab anti-IL-15 mide la concentración de la molécula de IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc intacta (A), mientras que el ELISA de Ab anti-Fc de IgG humana mide la concentración sérica de la proteína de fusión IL-15R α Su/Fc (▼). Las concentraciones observadas se representan mediante símbolos y las curvas ajustadas al modelo se representan mediante líneas.

50 La Figura 68 es una gráfica que muestra una comparación de la actividad biológica de la IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc (IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc IVA) ensamblada in vitro con IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc. Se incubaron células 32D β con concentraciones crecientes de las IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc (■) o IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc (□) ensambladas in vitro durante 72 h antes de la adición de WST-1 durante 4 h. La proliferación celular se cuantificó mediante lectura de la absorbancia a 440 nm para valorar los niveles de formazano. Los puntos de datos mostrados son medias (\pm error estándar) de muestras por triplicado y las líneas representan una curva sigmoidea de respuesta a la dosis ajustada para la determinación de EC $_{50}$. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos.

La Figura 69 es un conjunto de gráficas que muestran el efecto de IL-15wt y el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc sobre el peso del bazo y los niveles de glóbulos blancos. Ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) fueron inyectados intravenosamente con una sola dosis de complejo de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc en 1 mg/kg, IL-15wt en 0,28 mg/kg (dosis molar equivalente) o PBS como un control negativo. Los pesos de los bazo (panel izquierdo) y los recuentos de glóbulos blancos en sangre (panel derecho) se determinaron 4 días después de la inyección. Las barras representan la media \pm error estándar (n = 5). * $P > 0,05$ en comparación con PBS e IL-15wt. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos.

La Figura 70 es un conjunto de gráficas que muestran el efecto de IL-15wt y el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc sobre linfocitos de ratón. Ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) fueron inyectados intravenosamente con una sola dosis de complejo de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc en 1 mg/kg, IL-15wt en 0,28 mg/kg (dosis molar equivalente) o PBS como un control negativo. El porcentaje de células B (CD19), células T CD4 (CD4), células NK (NKp46) y células T CD8 (CD8) se determinó en esplenocitos (panel izquierdo: media \pm error estándar (n = 5)) y PBMC (panel derecho: niveles en sangre agrupada (n = 5)) 4 días después de la inyección. * $P > 0,05$ en comparación con PBS, ** $P > 0,05$ en comparación con IL-15wt. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos.

15 Descripción detallada y realizaciones preferidas

Definiciones

Se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos que se usan en la siguiente descripción escrita.

Según se usa en la presente, el término "que comprende" está destinado a significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros elementos. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significación esencial para la combinación. Así, una composición que consiste esencialmente en los elementos que se definen en la presente no excluiría oligocontaminantes del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significa excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas del método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Según se usa en la presente, el término "complejo de proteínas de fusión IL-15:IL-15R α " es un complejo que tiene IL-15 unida no covalentemente al dominio IL-15R α de un IL-15R α soluble conectado covalentemente a un polipéptido biológicamente activo. La IL-15 puede ser bien IL-15 o bien IL-15 conectada covalentemente a un segundo polipéptido biológicamente activo.

Según se usa en la presente, el término "coexpresado" está destinado a significar que dos polipéptidos distintos se expresan simultáneamente en una célula hospedadora de modo que los dos polipéptidos pueden interactuar o unirse bien en la célula hospedadora o bien en el medio de cultivo de la célula hospedadora y formar un complejo.

Según se usa en la presente, el término "reactivo de afinidad" está destinado a significar cualquier composición que se una específicamente a otra molécula. Ejemplos de reactivos de afinidad incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, proteína A y proteína G. Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se una a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, Fab, Fv, monocatenarios y diseños sencillos o múltiples de cadena variable de inmunoglobulina o dominio de CDR así como anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos.

Por el término "antígeno", según se usa en la presente, se entiende cualquier sustancia que haga que el sistema inmunitario produzca anticuerpos o respuestas inmunitarias mediadas por células específicas contra ella. Un antígeno asociado a una enfermedad es cualquier sustancia que esté asociada con cualquier enfermedad que haga que el sistema inmunitario produzca anticuerpos o una respuesta mediada por células específicas contra ella.

Se entiende que el término "polipéptido biológicamente activo", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, un polipéptido o un péptido; un azúcar o un polisacárido; un lípido o un glicolípido, una glicoproteína o una lipoproteína que pueda producir los efectos deseados según se analiza en la presente, incluyendo un TCR o un anticuerpo con actividad de unión a antígeno, una molécula de CD incluyendo CD8 o un dominio de anticuerpo incluyendo un dominio Fc.

Se entiende que el término "célula", según se usa en la presente, incluye cualquier célula primaria procariótica, eucariótica o línea celular inmortalizada, cualquier grupo de tales células como en un tejido o un órgano. Preferiblemente, las células son de mamífero y particularmente de origen humano, y pueden estar infectadas por uno o más patógenos. Una "célula hospedadora", según la invención, puede ser una célula transfectada, transformada, transducida o infectada de cualquier origen, incluyendo células procarióticas, eucarióticas, de mamífero, aviares, de insecto, de planta o de bacteria, o pueden ser células de cualquier origen que se pueden usar para propagar un ácido nucleico descrito en la presente.

- Se entiende que el término "molécula conjugada", según se usa en la presente, se refiere a una molécula de TCR o anticuerpo y una molécula efectora, habitualmente una molécula química o sintetizada conectada (es decir fusionada) covalentemente mediante un método químico u otro adecuado. Si se desea, la molécula conjugada se puede fusionar en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora de péptidos o una molécula portadora.
- 5 Alternativamente, el conector de péptidos o portador se puede usar para ayudar en la construcción de la molécula conjugada. Moléculas conjugadas específicamente preferidas son toxinas o etiquetas detectables conjugadas.
- Se entiende que el término "molécula efectora", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, un polipéptido o un péptido; un azúcar o un polisacárido; un lípido o un glicolípido, una glicoproteína, una lipoproteína o un agente químico que puede producir los efectos deseados según se analiza en la presente, incluyendo un dominio IL-15, una variante de IL-15 o un receptor de IL-15 tal como IL-15R- α , IL-15R α Su, supresión del exón 3 de IL-15R α , IL-2R- β o γ -C, o fragmentos funcionales de los mismos y tales polipéptidos que también comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo.
- 10 Los términos "molécula de fusión" y "proteína de fusión" se usan intercambiamente y se entiende que se refieren a un polipéptido biológicamente activo, habitualmente un TCR o un anticuerpo, y una molécula efectora, habitualmente una secuencia proteínica o peptídica conectada (es decir fusionada) covalentemente mediante un método recombinante, químico u otro adecuado. Si se desea, la molécula de fusión puede estar fusionada en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora de péptidos. Alternativamente, el conector de péptidos se puede usar para ayudar en la construcción de la molécula de fusión. Específicamente, las moléculas de fusión preferidas son proteínas de fusión. Generalmente, la molécula de fusión también puede estar comprendida por moléculas conjugadas.
- 15 Se entiende que el término "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula procariótica o eucariótica que contenga bien un vector de clonación o bien un vector de expresión. Este término también incluye las células procarióticas o eucarióticas que se han manipulado genéticamente para contener el gen o los genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula hospedadora.
- 25 Se entiende que el término "respuesta inmunitaria", según se usa en la presente, se refiere al proceso por el que las células inmunitarias se estimulan y/o se incorporan desde la sangre a tejidos linfoides así como no linfoides a través de un proceso multifactorial que implica distintas etapas adhesivas y/o de activación. Las condiciones de activación provocan la liberación de citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas y otros factores, la expresión regulada al alza de moléculas de adhesión y otras de activación sobre las células inmunitarias, promueven la adherencia, cambios morfológicos y/o extravasación simultáneos con quimiotaxis a través de los tejidos, incrementan la proliferación y la actividad citotóxica, estimulan la presentación de antígenos y proporcionan otros cambios fenotípicos incluyendo generación de tipos de células de memoria. Se entiende que respuesta inmunitaria también se refiere a la actividad de células inmunitarias para suprimir o regular la actividad inflamatoria o citotóxica de otras células inmunitarias. Respuesta inmunitaria se refiere a la actividad de células inmunitarias in vivo o in vitro.
- 30 Según se usa en la presente, los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se usan intercambiamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida.
- 35 El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas de una sola hebra, de doble hebra o de triple hélice, un gen o un fragmento génico, exones, intrones, mRNA, tARN, rARN, ribozimas, moléculas antisentido, cADN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, aptámeros, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas (p. ej., que comprenden bases modificadas, azúcares y/o conectores internucleotídicos).
- 40 Se entiende que el término "polipéptido" se refiere a cualquier polímero que consista preferiblemente esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos naturales independientemente de su tamaño. Aunque a menudo se usa el término "proteína" con referencia a proteínas relativamente grandes y a menudo se usa "péptido" con referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos a menudo se solapa en la especialidad. El término "polipéptido" se refiere generalmente a proteínas, polipéptidos y péptidos a menos que se apunte otra cosa. Los péptidos útiles según la presente invención en general estarán generalmente entre aproximadamente 0,1 y 100 KD o más hasta aproximadamente 1.000 KD, preferiblemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 KD según se juzga mediante técnicas de dimensionamiento de moléculas estándar tales como centrifugación o electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS.
- 45 Se entiende que los términos "previene", "prevenir", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no tiene, pero con riesgo de o sensible a desarrollar un trastorno o una afección. Prevención y similares no significan prevenir para siempre que un sujeto contraiga la enfermedad o el trastorno específicos. La prevención puede requerir la administración de múltiples dosis. Prevención puede incluir la prevención de una recaída de una enfermedad en un sujeto para el que
- 50
- 55

todos los síntomas de enfermedad se eliminaban, o la prevención de una recaída en una enfermedad recidivante-remitente.

Se entiende que el término "anticuerpo monocatenario" se refiere a un anticuerpo basado en un formato monocatenario. Los anticuerpos monocatenarios pueden consistir en la subunidad de unión mínima de los anticuerpos. Los anticuerpos monocatenarios pueden combinar sólo las regiones de unión a antígeno (p. ej., todas o algunas de las regiones determinantes del complemento, CDR, presentes en la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena ligera) de anticuerpos o una sola cadena de polipéptido plegada establemente. Como tales, los anticuerpos monocatenarios son de un tamaño considerablemente menor que las inmunoglobulinas clásicas pero retienen las propiedades de unión específicas para un antígeno de los anticuerpos. Los anticuerpos monocatenarios pueden estar conectados a una amplia gama de ligandos, por ejemplo moléculas efectoras o conjugados de fármacos.

Por el término "soluble", según se usa en la presente, se entiende que la molécula de fusión y particularmente una proteína de fusión no se sedimenta fácilmente bajo centrifugación de baja fuerza G (p. ej. menos de aproximadamente 30.000 revoluciones por minuto en una centrifuga estándar) desde un tampón acuoso, p. ej., un medio celular. Además, la molécula de fusión es soluble si permanece en solución acuosa a una temperatura mayor de aproximadamente 5-37°C y a pH neutro o cerca de neutro en presencia de concentración baja o sin concentración de un detergente aniónico o no iónico. Bajo estas condiciones, una proteína soluble tendrá a menudo un bajo valor de sedimentación, p. ej., menor de aproximadamente 10 a 50 unidades de Svedberg.

Las soluciones acuosas mencionadas en la presente tienen típicamente un compuesto tamponador para establecer el pH, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5-9, y un intervalo de fuerza iónica entre aproximadamente 2 mM y 500 mM. A veces, se añade un inhibidor de proteasa o un detergente no iónico suave. Adicionalmente, se puede añadir una proteína portadora si se desea, tal como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) hasta unos pocos mg/ml. Tampones acuosos ejemplares incluyen solución salina tamponada con fosfato estándar, solución salina tamponada con Tris u otros tampones y formulaciones de medio celular bien conocidos.

Se entiende que el término "estimular" o "estimulación" se refiere a incrementar, a amplificar, a aumentar, a reforzar una actividad fisiológica, p. ej., una respuesta inmunitaria. La estimulación puede ser una alteración positiva. Un incremento ejemplar puede ser, p. ej., en 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o incluso 90-100%. Otros incrementos ejemplares incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces o incluso 100 veces. Se entiende que el término "suprimir" o "supresión" se refiere a reducir, a atenuar, a disminuir, a detener o a estabilizar una actividad fisiológica, p. ej., una respuesta inmunitaria. La supresión puede ser una alteración negativa. Una reducción ejemplar puede ser, p. ej., en 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o incluso 90-100%. Reducciones ejemplares incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces o incluso 100 veces.

Se entiende que el término "receptor de células T" (TCR, por sus siglas en inglés) se refiere a polipéptidos de o derivados de un complejo de proteínas membranas integrales que participa en la activación de células T en respuesta a la presentación de antígeno. En algunos casos, las células T reconocen un enlace peptídico con el producto de MHC a través del receptor de células T (TRC) heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. El repertorio de TCR ha creado una amplia diversidad mediante los mismos mecanismos de reordenación génica usados en genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos [Tonegawa, S. (1988) *Biosci. Rep.* 8:3-26]. La mayoría de la diversidad se genera en las juntas de las regiones variable (V) y de empalme (J) (o diversidad, D) que codifican la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3, por sus siglas en inglés) de las cadenas α y β [Davis y Bjorkman (1988) *Nature* 334:395-402]. Sin embargo, los TCR no sufren mutaciones puntuales somáticas como lo hacen los anticuerpos, y quizás no coincidentemente. Los TCR tampoco sufren la misma amplitud de maduración de afinidad como anticuerpos. Los TCR, según se presentan en la naturaleza, parecen tener afinidades que varían de 10^5 a 10^7 M⁻¹, mientras que los anticuerpos típicamente tienen afinidades que varían de 10^5 a 10^9 M⁻¹ [Davis y cols. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 16:523-544; Eisen y cols. (1996) *Adv. Protein Chem.* 49: 1-56]. Aunque la ausencia de mutación somática en TCR se puede asociar con bajas afinidades, también se ha argumentado que no hay una ventaja selectiva para que un TCR tenga una afinidad superior. De hecho, los modelos de desencadenamiento en serie [Valitutti y cols. (1995) *Nature* 375:148-151] y cotejo cinético [Rabinowitz y cols. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1401-1405] de activación de células T sugieren ambos que las disociaciones más prolongadas (asociadas con mayor afinidad) serían perjudiciales para el proceso de señalización. También es posible que los TCR de afinidad superior no puedan mantener la especificidad peptídica requerida para respuestas de células T. Por ejemplo, los péptidos unidos dentro de la hendidura del MHC presentan una superficie accesible limitada [Bjorkman, P. J. (1997) *Cell* 89:167-170], lo que a su vez puede limitar la cantidad de energía que se puede generar con la interacción. Por otra parte, elevar la afinidad de un TCR al dirigir la energía hacia las hélices del MHC conduciría presumiblemente a la supresión tímica durante la elección negativa [Bevan, M. J. (1997) *Immunity* 7: 175-178]. El término "TCR" abarca receptores de células T policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, heterodímeros y monocatenarios o un fragmento funcional de los mismos, incluyendo una molécula que comprende los dominios V α y V β del TCR. El término "TCR" también abarca receptores de células T divulgados, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de EE. UU. titulada "T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF", presentada el 19 de marzo de 2008 y la Publicación de Patente de EE. UU. 20030144474.

El término "vector" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de replicarse autónomamente en una célula hospedadora y puede aceptar ADN extraño. Un vector soporta su propio origen de replicación, uno o más sitios de reconocimiento únicos para endonucleasas de restricción que se pueden usar para la inserción de ADN extraño, y habitualmente marcadores seleccionables tales como genes que codifican resistencia a anticuerpos, y a menudo secuencias de reconocimiento (p. ej. promotor) para la expresión del ADN insertado. Vectores comunes incluyen vectores plasmídicos y vectores fágicos.

Se entiende que los términos "dominio Fc" o "región Fc" se refieren a la región "cristalizable en fragmentos" de la cadena pesada de inmunoglobulina. Generalmente, un dominio Fc es capaz de interactuar con un segundo dominio Fc para formar un complejo dímero. El dominio Fc puede ser capaz de unirse a receptores de la superficie celular llamados receptores de Fc y/o proteínas del sistema del complemento o se pueden modificar para reducir o aumentar estas actividades de unión. El dominio Fc se puede derivar de isotipos de anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgM o IgE y afectan a la actividad inmunitaria incluyendo opsonización, lisis celular, desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y otros procesos dependientes de receptores de Fc; activación de la ruta del complemento; y estabilidad de proteínas in vivo.

Las abreviaturas usadas son: IgG, inmunoglobulina; h, humana; IL, interleucina; R, receptor; Su, dominio sushi; TCR, receptor de células T; sc, monocatenario; sTNFR, receptor de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) soluble; NK, asesina natural; KD, constante de disociación en equilibrio; CTL, linfocitos T citotóxicos; aa, aminoácido(s); OVA, ovalbúmina; VSV, virus de estomatitis vesicular; IMDM, medio de Dulbecco modificado de Iscove; CHO, ovario de hámster chino; mAb, anticuerpo monoclonal; β 2m, microglobulina β 2; SA, estreptavidina; HRP, peroxidasa de rábano picante; PE, ficoeritrina; ABTS, sal diamónica de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]; PLE, mejorador de la carga de péptido; c264scTCR, TCR monocatenario soluble específico para complejo de péptido p53 humano (aa264-272)/HLA-A*0201; c149scTCR, TCR monocatenario soluble específico para complejo de p53 humano (aa149-157)/HLA-A*0201; OT1scTCR, TCR monocatenario soluble específico para complejo de péptido de OVA (aa257-264)/H-2Kb; SEC, cromatografía de exclusión por tamaño; pMHCI, péptido/MHC clase I; SPR, resonancia de plasmones superficiales; PM, peso molecular; m, murino; A, absorbancia; RU, unidades de respuesta.

Se entiende que los intervalos proporcionados en la presente se pueden acortar para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

Se entiende que "más de uno" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, etc., o cualquier valor entre los mismos. Se entiende que "al menos" un valor específico es ese valor y todos los valores mayores que ese valor.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, se entiende que el término "o" es inclusivo.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, se entiende que los términos "un", "uno(a)" y "el(la)" son singulares o plurales. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, se entiende que el término "aproximadamente" está dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor indicado. A menos que esté clara otra cosa a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en la presente se pueden modificar mediante el término aproximadamente. La cita de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo simple o combinación de los grupos listados. La cita de una realización para una variable o un aspecto en la presente incluye esa realización como cualquier realización simple o en combinación con cualesquiera otras realizaciones o porciones de la misma.

Cualesquiera composiciones o métodos proporcionados en la presente se pueden combinar con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente.

Dominio Fc

Las inmunoglobulinas de la clase IgG están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana. Sus semividas en circulación pueden alcanzar tanto como 21 días. Se han presentado proteínas de fusión para combinar las regiones Fc de IgG con los dominios de otra proteína, tal como diversas citocinas y receptores solubles (véanse, por ejemplo, Capon y cols., *Nature*, 337:525-531, 1989; Chamow y cols., *Trends Biotechnol.*, 14:52-60, 1996); Pat. EE. UU. N° 5.116.964 y 5.541.087). La proteína de fusión prototípica es una proteína homodímera conectada a través de residuos de cisteína en la región de bisagra de Fc de IgG, dando como resultado una molécula similar a una molécula de IgG sin los dominios variable de cadena pesada y C_{H1} y las cadenas ligeras. La naturaleza dímera de proteínas de fusión que comprenden el dominio Fc puede ser ventajosa para proporcionar interacciones de orden superior (es decir unión bivalente o biespecífica) con otras moléculas. Debido a la homología estructural, las proteínas de fusión de Fc exhiben un perfil farmacocinético in vivo comparable al de IgG humana con un isotipo

similar. Para prolongar la semivida en circulación de IL-15 o proteína de fusión de IL-15 y/o para incrementar su actividad biológica, es deseable elaborar complejos de proteínas de fusión que contengan el dominio de IL-15 unido no covalentemente a IL-15R α conectado covalentemente a la porción Fc de la proteína de IgG de cadena pesada humana según se divulga o se describe en esta invención.

5 El término "Fc" se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento que no se une a un antígeno de un anticuerpo entero, ya sea en forma monómera o multímera. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Los Fc naturales están constituidos por polipéptidos monómeros que pueden estar
10 covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monómeras de moléculas de Fc naturales varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA, IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero unido por disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison y cols. (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). El término "Fc natural", según se usa en la presente, es genérico para las formas monómeras, dímeras y multímeras. Los dominios Fc contienen sitios de unión
15 para proteína A, proteína G, diversos receptores de Fc y proteínas del complemento.

En algunas realizaciones, el término "variante de Fc" se refiere a una molécula o secuencia que está modificada a partir de un Fc natural pero todavía comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn. Las solicitudes internacionales WO 97/34631 (publicada el 25 de septiembre de 1997) y WO 96/32478 describen variantes de Fc
20 ejemplares, así como la interacción con el receptor de rescate. Así, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que está humanizada a partir de un Fc natural no humano. Por otra parte, un Fc natural comprende sitios que se pueden retirar debido a que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención. Así, en ciertas realizaciones, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc natural que afectan a o están implicados en (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula hospedadora
25 seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal al expresarse en una célula hospedadora seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto a un receptor de rescate o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés). Las variantes de Fc se describen con más detalle posteriormente en la presente.

El término "dominio Fc" abarca moléculas y secuencias de Fc natural y variantes de Fc como las definidas anteriormente. Como con las variantes de Fc y los Fc naturales, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma
30 monómera o multímera, ya sea digeridas a partir de anticuerpo entero o producidas mediante expresión de genes recombinantes o por otros medios.

Receptores de células T (TCR)

Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B, células NK) constituyen el componente celular del sistema inmunitario.
35 Bajo condiciones fisiológicas, las células T funcionan en la vigilancia inmunitaria y en la eliminación de un antígeno extraño. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, hay una evidencia convincente de que las células T representan un papel principal en la provocación y la propagación de una enfermedad. En estos trastornos, el fracaso de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférico, es un proceso fundamental en la provocación de una enfermedad autoinmunitaria.
40

El complejo de TCR está compuesto por al menos siete proteínas transmembranarias. El heterodímero conectado por disulfuro ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) forma la unidad de reconocimiento de antígeno monotípica, mientras que las cadenas invariantes de CD3, que consisten en cadenas ϵ , γ , δ , ζ y η , son responsables de acoplar la unión del ligando a rutas de señalización que dan como resultado la activación de células T y la elaboración de las respuestas inmunitarias
45 celulares. A pesar de la diversidad génica de las cadenas de TCR, dos características estructurales son comunes a todas las subunidades conocidas. En primer lugar, son proteínas transmembranarias con un solo dominio que abarca la transmembrana - presumiblemente α -helicoidal. En segundo lugar, todas las cadenas de TCR tienen la característica inusual de poseer un aminoácido cargado dentro del dominio transmembranario predicho. Las cadenas invariantes tienen una sola carga negativa, conservada entre el ratón y el ser humano, y la cadena variante posee una (TCR- β) o dos (TCR- α) cargas positivas. La secuencia transmembranaria de TCR- α está muy conservada en un número de especies y así puede cumplir filogenéticamente un importante papel funcional. La secuencia del octapéptido que contiene los aminoácidos hidrófilos arginina y lisina es idéntica entre las especies.
50

Una respuesta de células T es modulada por antígeno que se une a un TCR. Un tipo de TCR es un heterodímero unido a la membrana que consiste en una cadena α y β que se asemeja a una región variable (V) y constante (C) de
55 inmunoglobulina. La cadena α del TCR incluye una cadena V- α y C- α conectadas covalentemente, mientras que la cadena β incluye una cadena V- β conectada covalentemente a una cadena C- β . Las cadenas V- α y V- β forman un bolsillo o grieta que se puede unir a un superantígeno o antígeno en el contexto de un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (conocido en los seres humanos como un complejo HLA). Véase generalmente Davis *Ann. Rev. of Immunology* 3: 537 (1985); *Fundamental Immunology* 3^a Ed., w. Paul Ed. Rsen Press LTD. Nueva York (1993).
60

Los dominios extracelulares de las cadenas de TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) también se pueden manipular como fusiones a dominios transmembranarios heterólogos para la expresión sobre la superficie celular. Tales TCR pueden incluir fusiones a CD3, CD28, CD8, 4-1BB y/o dominios transmembranarios o de activación del receptor de activación quimérico (CAR, por sus siglas en inglés). Los TCR también pueden ser las proteínas solubles que comprenden uno o más de los dominios que se unen a antígeno de las cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Tales TCR pueden incluir los dominios variables de TCR o fragmentos funcionales de los mismos con o sin los dominios constantes de TCR. Los TCR solubles pueden ser moléculas heterodímeras o monocatenarias.

Complejos de proteínas de fusión

Los complejos de proteínas de fusión solubles y moléculas conjugadas de la invención comprenden al menos dos proteínas de fusión solubles. En ciertas realizaciones, la primera proteína de fusión comprende un primer polipéptido biológicamente activo conectado covalentemente a interleucina-15 (IL-15) o un fragmento funcional de la misma; y la segunda proteína de fusión comprende un segundo polipéptido biológicamente activo conectado covalentemente a polipéptido de receptor α de interleucina-15 (IL-15R α) soluble o un fragmento funcional del mismo, y en donde el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión se une al dominio de IL-15R α soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles. Los complejos de proteínas de fusión de la invención también comprenden dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo conectado a una o ambas de las proteínas de fusión primera y segunda. Preferiblemente, los dominios Fc conectados a las proteínas de fusión primera y segunda interactúan para formar un complejo de proteínas de fusión. Tal complejo se puede estabilizar mediante la formación de enlaces disulfuro entre los dominios Fc de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención incluyen un polipéptido de IL-15, una variante de IL-15 o un fragmento funcional del mismo y un polipéptido de IL-15R α soluble o un fragmento funcional del mismo, en donde uno o ambos de los polipéptidos de IL-15 e IL-15R α incluyen además un dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo.

En ciertos ejemplos, uno de los polipéptidos biológicamente activos comprende un primer TCR soluble o fragmento del mismo. El otro o segundo polipéptido biológicamente activo comprende el primer TCR soluble o un fragmento funcional del mismo y así crea un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con actividad de unión incrementada para ligandos cognados en comparación con el TCR monovalente. Además, el otro polipéptido biológicamente activo comprende un segundo TCR soluble o un fragmento funcional del mismo, diferente del primer TCR soluble. En ciertos ejemplos, se producen TCR que tienen una afinidad superior o una afinidad de unión incrementada para los ligandos cognados en comparación, por ejemplo, con el TCR natural. Si el TCR soluble de la invención que se describe en la presente tiene una afección o afinidad superior para su ligando, entonces es útil como una sonda específica para el antígeno unido a la superficie celular. En ciertos ejemplos preferidos la invención, el TCR es específico para el reconocimiento de un antígeno particular.

En realizaciones ejemplares, el TCR es un heterodímero que comprende una cadena α (denominada en la presente cadena α , alfa o a) y una cadena β (denominada en la presente cadena β , beta o b). En otras realizaciones ejemplares, el TCR comprende un polipéptido de TCR monocatenario. El TCR monocatenario puede comprender una cadena V- α de TCR conectada covalentemente a una cadena V- β de TCR mediante una secuencia conectora de péptidos. El TCR monocatenario puede comprender además un fragmento de cadena C β de TCR conectado covalentemente a una cadena V- β de TCR. El TCR monocatenario puede comprender además un fragmento de cadena C α de TCR conectado covalentemente a una cadena V- α de TCR.

En una realización adicional, uno o ambos de los polipéptidos biológicamente activos primero y segundo comprende un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

En otra realización, el antígeno para el dominio de TCR comprende un antígeno peptídico presentado en una molécula de MHC o HLA. En una realización adicional, el antígeno peptídico se deriva de un polipéptido asociado a un tumor o un polipéptido codificado por virus.

En otra realización, el antígeno para el dominio de anticuerpo comprende un receptor o ligando de la superficie celular.

En una realización adicional, el antígeno comprende un receptor o ligando de antígeno CD, citocina o quimiocina, un receptor o ligando de factor de crecimiento, un factor tisular, una molécula de adhesión celular, MHC/moléculas similares a MHC, receptor de Fc, receptor similar a Toll, receptor de NK, TCR, BCR, receptor o ligando coestimulante positivo/negativo, receptor o ligando de muerte, antígeno asociado a un tumor o antígeno codificado por virus.

Según se usa en la presente, por el término "polipéptido biológicamente activo" o "molécula efectora" se entiende una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, un polipéptido o un péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, una glicoproteína, o una lipoproteína que puede producir los efectos deseados que se analizan en la presente. Moléculas efectoras también incluyen agentes químicos. También se contemplan ácidos nucleicos de moléculas efectoras que codifican una proteína, un polipéptido o un péptido biológicamente activos o efectores. Así, moléculas adecuadas incluyen factores reguladores, enzimas, anticuerpos o fármacos así como ADN,

ARN y oligonucleótidos. Los polipéptidos biológicamente activos o la molécula efectora pueden estar presentes en la naturaleza o se pueden sintetizar a partir de componentes conocidos, p. ej., mediante síntesis recombinante o química y pueden incluir componentes heterólogos. Un polipéptido biológicamente activo o molécula efectora está generalmente entre aproximadamente 0,1 y 100 KD o más hasta aproximadamente 1.000 KD, preferiblemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 KD según se juzga por técnicas de dimensionamiento de moléculas estándar tales como centrifugación o electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Efectos de la invención deseados incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, formar un complejo de proteínas de fusión de la invención con actividad de unión incrementada, destruir una célula diana, p. ej. inducir bien la proliferación celular o bien la muerte celular, iniciar una respuesta inmunitaria, al prevenir o tratar una enfermedad, o actuar como una molécula de detección con propósitos de diagnóstico. Para tal detección, se podría usar, por ejemplo, un ensayo que incluyera etapas secuenciales de cultivo de células para hacer proliferar las mismas, y poner en contacto las células con un complejo de fusión de TCR de la invención y a continuación evaluar si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo adicional de las células.

Conectar covalentemente la molécula efectora a los complejos de proteínas de fusión de la invención según la invención proporciona un número de ventajas significativas. Se pueden producir complejos de proteínas de fusión de la invención que contienen una sola molécula efectora, incluyendo tal péptido de estructura conocida. Adicionalmente, se puede producir una amplia variedad de moléculas en vectores de ADN similares. Esto es, una biblioteca de diferentes moléculas efectoras se puede conectar a los complejos de proteínas de fusión para el reconocimiento de células infectadas o enfermas. Además, para aplicaciones terapéuticas, en lugar de la administración de un complejo de proteínas de fusión de la invención a un sujeto, se puede administrar un vector de expresión de ADN que codifica el complejo de proteínas de fusión para la expresión in vivo del complejo de proteínas de fusión. Tal enfoque evita etapas de purificación costosas asociadas típicamente a la preparación de proteínas recombinantes y evita las complejidades de la captación y el procesamiento de antígenos asociadas con enfoques convencionales.

Según se apunta, los componentes de las proteínas de fusión divulgadas en la presente, p. ej., una molécula efectora tal como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, toxinas proteínicas, dominios de inmunoglobulina u otras moléculas bioactivas y cualesquiera conectores de péptidos, se pueden organizar casi de cualquier modo con la condición de que la proteína de fusión tenga la función para la que está destinada. En particular, cada componente de la proteína de fusión puede estar separado de otro componente por al menos una secuencia conectora de péptidos adecuada si se desea. Adicionalmente, las proteínas de fusión pueden incluir etiquetas, p. ej., para facilitar la modificación, la identificación y/o la purificación de la proteína de fusión. Proteínas de fusión más específicas están en los Ejemplos descritos posteriormente.

Conectores

Los complejos de fusión de la invención también incluyen preferiblemente una secuencia conectora flexible intercalada entre los dominios de IL-15 o IL-15R α y el polipéptido biológicamente activo. La secuencia conectora debe permitir la colocación eficaz del polipéptido biológicamente activo con respecto a los dominios de IL-15 o IL-15R α para permitir la actividad funcional de ambos dominios. En realizaciones en las que el polipéptido biológicamente activo es un TCR, la secuencia conectora sitúa la hendidura que se une a la molécula de TCR de modo que el receptor de células T pueda reconocer complejos de MHC-péptido que se presentan y pueda aportar la molécula efectora a un sitio deseado. La presentación satisfactoria de la molécula efectora puede modular la actividad de una célula bien para inducir o bien para inhibir la proliferación de células T, o para iniciar o inhibir una respuesta inmunitaria a un sitio particular, según se determina por los ensayos divulgados posteriormente, incluyendo los ensayos in vitro que incluyen etapas secuenciales de cultivo de células T para hacer proliferar las mismas, y poner en contacto las células T con un complejo de fusión de TCR de la invención y a continuación evaluar si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo adicional de las células.

En ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de fusión solubles tiene un conector en el que el primer polipéptido biológicamente activo se conecta covalentemente a IL-15 (o un fragmento funcional de la misma) mediante una secuencia conectora de polipéptidos.

En ciertas otras realizaciones, el complejo de proteínas de fusión solubles que se describe en la presente tiene un conector en el que el segundo polipéptido biológicamente activo está conectado covalentemente a polipéptido de IL-15R α (o un fragmento funcional del mismo) mediante una secuencia conectora de polipéptidos.

La secuencia conectora preferiblemente está codificada por una secuencia de nucleótidos que da como resultado un péptido que puede colocar eficazmente la hendidura de unión de una molécula de TCR para el reconocimiento de un antígeno que se presenta o el dominio de unión de una molécula de anticuerpo para el reconocimiento de un antígeno. Según se usa en la presente, la expresión "colocación eficaz del polipéptido biológicamente activo con respecto a los dominios de IL-15 o IL-15R α ", u otra expresión similar, está destinada a significar que el polipéptido biológicamente activo conectado a los dominios de IL-15 o IL-15R α se coloca de modo que los dominios de IL-15 o IL-15R α sean capaces de interactuar entre sí para formar un complejo proteínico. En ciertas realizaciones, los dominios de IL-15 o IL-15R α se colocan eficazmente para permitir interacciones con células inmunitarias para iniciar o inhibir una reacción inmunitaria, o para inhibir o estimular el desarrollo celular.

Los complejos de fusión de la invención también incluyen preferiblemente una secuencia conectora flexible intercalada entre los dominios de IL-15 o IL-15R α y el dominio Fc de inmunoglobulina. La secuencia conectora debe permitir la colocación eficaz del dominio Fc, el polipéptido biológicamente activo y los dominios de IL-15 o IL-15R α para permitir la actividad funcional de cada dominio. En ciertas realizaciones, los dominios Fc se colocan eficazmente para permitir la formación apropiada del complejo de proteínas de fusión y/o interacciones de receptores de Fc o células inmunitarias o proteínas del sistema del complemento para estimular efectos mediados por Fc incluyendo opsonización, lisis celular, desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y otros procesos dependientes de receptores de Fc; activación de la ruta del complemento; y semivida in vivo mejorada del complejo de proteínas de fusión.

Las secuencias conectoras también se pueden usar para conectar dos o más polipéptidos del polipéptido biológicamente activo para generar una molécula monocatenaria con la actividad funcional deseada.

Preferiblemente, la secuencia conectora comprende de aproximadamente 7 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 8 a 16 aminoácidos. La secuencia conectora es preferiblemente flexible de modo que no mantiene el polipéptido biológicamente activo o la molécula efectora en una sola conformación no deseada. La secuencia conectora se puede usar, p. ej., para separar el sitio de reconocimiento de la molécula fusionada. Específicamente, la secuencia conectora de péptidos puede estar colocada entre el polipéptido biológicamente activo y la molécula efectora, p. ej., para reticular químicamente los mismos y para proporcionar flexibilidad molecular. El conector preferiblemente comprende predominantemente aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. Preferiblemente, aproximadamente 80 o 90 por ciento o más de la secuencia conectora comprende residuos de glicina, alanina o serina, particularmente residuos de glicina y serina. Para un complejo de proteínas de fusión que comprende un TCR heterodímero, la secuencia conectora está adecuadamente conectada a la cadena β de la molécula de TCR, aunque la secuencia conectora también podría estar ligada a la cadena α de la molécula de TCR. Alternativamente, la secuencia conectora puede estar conectada a las cadenas tanto α como β de la molécula de TCR. Cuando tal cadena peptídica β se expresa junto con la cadena α , el polipéptido de TCR conectado se debe plegar dando como resultado una molécula de TCR funcional según se representa generalmente en la FIG. 1. Una secuencia conectora adecuada es ASGGGGSGGG (es decir, Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly) (SEQ ID N°: 5), preferiblemente conectada al primer aminoácido del dominio β del TCR. Se podrían usar diferentes secuencias conectoras incluyendo cualquiera de un número de diseños de conectores flexibles que se han usado satisfactoriamente para ligar entre sí regiones variables de anticuerpo, véase Whitlow, M. y cols., (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105. En algunos ejemplos, para conectar covalentemente una molécula efectora a una molécula de cadena β de TCR, la aminosecuencia del conector debe ser capaz de ampliar la distancia adecuada desde el residuo C-terminal de la cadena β de TCR al residuo N-terminal de la molécula efectora. Las secuencias conectoras adecuadas se pueden identificar empíricamente de forma fácil. Adicionalmente, el tamaño y las secuencias adecuadas de las secuencias conectoras también se pueden determinar mediante técnicas informáticas de modelado convencionales basadas en el tamaño y la conformación predichos de la molécula de TCR.

En general, la preparación de los complejos de proteínas de fusión de la invención se puede efectuar mediante procedimientos divulgados en la presente y mediante técnicas de ADN recombinante reconocidas que implican, p. ej., reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), preparación de ADN plasmídico, escisión de ADN con enzimas de restricción, preparación de oligonucleótidos, ligación de ADN, aislamiento de mRNA, introducción del ADN en una célula adecuada, transformación o transfección de un hospedador, cultivo del hospedador. Adicionalmente, las proteínas de fusión se pueden aislar y purificar usando agentes caotrópicos y métodos electroforéticos, de centrifugación y cromatográficos muy conocidos. Véanse generalmente, Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. (1989); y Ausubel y cols., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1989) para una divulgación relativa a estos métodos.

Según se usa en la presente, polipéptidos biológicamente activos o moléculas efectoras de la invención pueden incluir factores tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, toxinas proteínicas, dominios de inmunoglobulina u otras proteínas bioactivas tales como enzimas. Además, los polipéptidos biológicamente activos pueden incluir conjugados con otros compuestos tales como toxinas no proteínicas, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, etiquetas detectables, materiales radiactivos y similares.

Las citocinas de la invención se definen por cualquier factor producido por células que afectan a otras células y son responsables de cualquiera de un número de múltiples efectos de inmunidad celular. Ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan, a la familia IL-2, interferón (IFN), las familias de citocinas IL-10, IL-1, IL-17, TGF y TNF, y a IL-1 a IL-35, IFN- α , IFN- β , IFN γ , TGF- β , TNF- α y TNF β .

Según la invención, la primera proteína de fusión comprende un primer polipéptido biológicamente activo conectado covalentemente a dominio de interleucina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo según se define anteriormente. IL-15 es una citocina que afecta a la activación y la proliferación de células T. La actividad de IL-15 para afectar a la activación y la proliferación de células inmunitarias es similar en algunos aspectos a IL2, aunque se han caracterizado bien diferencias fundamentales (Waldmann, T A, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601).

Las quimiocinas, similares a las citocinas, se definen como cualquier factor o molécula química que cuando se expone a otras células sea responsable de cualquiera de un número de múltiples efectos de inmunidad celular. Quimiocinas adecuadas pueden incluir, pero no se limitan, a las familias de quimiocinas CXC, CC, C y CX₃C y a CCL-1 a CCL-28, CXC-1 a CXC-17, XCL-1, XCL-2, CX3CL1, MIP-1b, IL-8, MCP-1 y Rantes.

- 5 Factores de crecimiento incluyen cualesquiera moléculas que cuando se exponen a una célula particular inducen la proliferación y/o la diferenciación de la célula afectada. Factores de crecimiento incluyen proteínas y moléculas químicas, algunas de las cuales incluyen: GM-CSF, G-CSF, factor de crecimiento humano y factor de crecimiento de células madre. Factores de crecimiento adicionales también pueden ser adecuados para los usos descritos en la presente.
- 10 Toxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier sustancia que tenga un efecto letal o un efecto inhibitorio sobre el crecimiento cuando se exponga a células. Más específicamente, la molécula efectora puede ser una toxina celular de, p. ej., origen vegetal o bacteriano tal como, p. ej., toxina de la difteria (DT), toxina Shiga, abrina, toxina del cólera, ricina, saporina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), proteína antiviral de fitolaca o gelonina. Fragmentos biológicamente activos de tales toxinas son bien conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., cadena A de DT y cadena A de ricina. Adicionalmente, la toxina puede ser un agente activo en la superficie celular tal como, p. ej., enzimas fosfolipasa (p. ej., fosfolipasa C).

Además, la molécula efectora puede ser un fármaco quimioterapéutico tal como, p. ej., vindesina, vincristina, vinblastina, metotrexato, adriamicina, bleomicina o cisplatino.

- 20 Adicionalmente, la molécula efectora puede ser una molécula etiquetada detectablemente adecuada para estudios de diagnóstico u obtención de imágenes. Tales etiquetas incluyen biotina o estreptavidina/avidina, nanopartículas o un cristal detectables, una enzima o un fragmento catalíticamente activo de la misma, una etiqueta fluorescente tal como proteína fluorescente verde, FITC, ficoeritrina, cicromo, rojo de Texas o puntos cuánticos; un radionúclido, p. ej., yodo-131, itrio-90, renio-188 o bismuto-212; moléculas fosforescentes o quimioluminiscentes o una etiqueta detectable mediante PET, ultrasonidos o MRI tal como Gd - o agentes de contraste basados en iones metálicos paramagnéticos. Véase, p. ej., Moskaug y cols. *J Biol. Chem.* 264, 15709 (1989); Pastan, I. y cols. *Cell* 47, 641, 1986; Pastan y cols., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" *Olsnes and Phil, Pharmac. Ther.*, 25, 355 (1982); la solicitud de PCT publicada n° WO 94/29350; la solicitud de PCT publicada n° WO 94/04689; la solicitud de PCT publicada n° WO2005046449 y la Pat. EE. UU. N° 5.620.939 para una divulgación relativa a la elaboración y el uso de proteínas que comprenden efectores o etiquetas.

- 30 Un complejo de fusión o conjugado proteínico que incluya dominios de IL-15 e IL-15R α conectados covalentemente tiene varios usos importantes. Por ejemplo, el complejo de fusión o conjugado proteínico que comprende un TCR se puede emplear para aportar el complejo IL-15:IL-15R α a ciertas células capaces de unirse específicamente al TCR. Según esto el complejo de fusión o conjugado proteínico proporciona medios para dañar o destruir selectivamente células que comprenden el ligando. Ejemplos de células o tejido capaces de ser dañados o destruidos por los complejos de fusión o conjugados proteínicos que comprenden un TCR incluyen tumores y células infectadas viralmente o bacterianamente que expresan uno o más ligandos capaces de unirse específicamente mediante el TCR. Células o tejido sensibles a ser dañados o destruidos se pueden ensayar fácilmente mediante los métodos divulgados en la presente.

- 40 Los polipéptidos de IL-15 e IL-15R α de la invención según se definen anteriormente corresponden adecuadamente en la secuencia de aminoácidos a moléculas de IL-15 e IL-15R α presentes en la naturaleza, p. ej. moléculas de IL-15 e IL-15R α de un ser humano, un ratón u otro roedor, u otro mamífero. Secuencias de estos polipéptidos y que codifican ácidos nucleicos son conocidas en la bibliografía, incluyendo mRNA de interleucina 15 (IL15) humana - GenBank: U14407.1, mRNA de interleucina 15 (IL15) de *Mus musculus* - GenBank: U14332.1, mRNA de precursor de la cadena α de receptor de interleucina (IL15RA) humana - GenBank: U31628.1, cadena α de receptor de interleucina 15 de *Mus musculus* - GenBank: BC095982.1.

- 50 En algunos entornos puede ser útil hacer polivalentes a los complejos de fusión o conjugados proteínicos de la presente invención, p. ej., para incrementar la valencia del sc-TCR o sc-anticuerpo. En particular, las interacciones entre los dominios de IL-15 e IL-15R α del complejo de proteínas de fusión proporciona un medio para generar complejos polivalentes. Además, la proteína de fusión polivalente se puede elaborar al conectar entre sí covalentemente o no covalentemente entre una y cuatro proteínas (iguales o diferentes) al usar, p. ej., técnicas de etiquetado de biotina-estreptavidina estándar, o mediante conjugación a soportes sólidos adecuados tales como cuentas de látex. Proteínas químicamente reticuladas (por ejemplo reticuladas a dendrímeros) también son especies polivalentes adecuadas. Por ejemplo, la proteína se puede modificar al incluir secuencias que codifican secuencias de etiquetado que se pueden modificar tales como la etiqueta BirA de biotilación o residuos de aminoácido con cadenas laterales químicamente reactivas tales como Cys o His. Tales etiquetas de aminoácido o aminoácidos químicamente reactivos se pueden colocar en una variedad de posiciones en la proteína de fusión, preferiblemente distal del sitio activo del polipéptido biológicamente activo o la molécula efectora. Por ejemplo, el extremo C de una proteína de fusión soluble se puede conectar covalentemente a una etiqueta u otra proteína fusionada que incluya tal aminoácido o aminoácidos reactivos. Se pueden incluir cadenas laterales adecuadas para conectar

químicamente dos o más proteínas de fusión a un dendrímero adecuado u otra nanopartícula para dar una molécula multivalente. Los dendrímeros son polímeros químicos sintéticos que pueden tener uno cualquiera de un número de diferentes grupos funcionales de su superficie (D. Tomalia, *Aldrichimica Acta*, 26:91:101 (1993)). Dendrímeros ejemplares para el uso según la presente invención incluyen, p. ej., dendrímero de poliamina E9 Starburst y dendrímero de poliamina E9 Combust, que pueden conectar residuos de cisteína. Nanopartículas ejemplares incluyen liposomas, partículas de núcleo-envuelta o partículas basadas en PLGA.

En otra realización de la invención, uno o ambos de los polipéptidos del complejo de proteínas de fusión comprende un dominio de inmunoglobulina. Alternativamente, la proteína de fusión dominio de unión a proteína-IL-15 puede estar conectada además a un dominio de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina preferidos comprenden regiones que permiten la interacción con otros dominios de inmunoglobulina para formar proteínas multicatenarias según se proporciona anteriormente. Por ejemplo, las regiones de cadena pesada de inmunoglobulina, tales como las C_H2-C_H3 de IgG1, son capaces de interactuar establemente para crear la región Fc. Dominios de inmunoglobulina preferidos que incluyen dominios Fc también comprenden regiones con funciones efectoras, incluyendo actividad de unión a receptor de Fc o proteína del complemento, y/o con sitios de glicosilación. En algunas realizaciones, los dominios de inmunoglobulina del complejo de proteínas de fusión contienen mutaciones que reducen o aumentan la actividad de unión al receptor de Fc o al complemento o la glicosilación, afectando de ese modo a la actividad biológica de la proteína resultante. Por ejemplo, dominios de inmunoglobulina que contienen mutaciones que reducen la unión a receptores de Fc se podrían usar para generar un complejo de proteínas de fusión de la invención con menor actividad de unión a células portadoras de receptor de Fc, lo que puede ser ventajoso para reactivos diseñados para reconocer o detectar antígenos específicos.

Ácidos nucleicos y vectores

La invención proporciona además secuencias de ácido nucleico y particularmente secuencias de ADN que codifican las presentes proteínas de fusión. Preferiblemente, la secuencia de ADN es soportada por un vector adecuado para la replicación extracromosómica tal como un fago, un virus, un plásmido, un fagémido, un cósmido, YAC o un episoma. En particular, un vector de ADN que codifica una proteína de fusión deseada se puede usar para facilitar los métodos preparativos descritos en la presente y para obtener cantidades significativas de la proteína de fusión. La secuencia de ADN se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante de proteína insertada. Se puede utilizar una variedad de sistemas hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteína. Estos incluyen sistemas celulares de mamífero infectados con virus (p. ej., virus variolovacunal, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contiene vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido.

Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, se puede usar uno cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción adecuados. Véase, generalmente, Sambrook y cols., anteriormente, y Ausubel y cols. anteriormente.

Se incluyen en la invención métodos para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles, comprendiendo el método introducir en una célula hospedadora un vector de ADN como el descrito en la presente que codifica las proteínas de fusión primera y segunda, cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles, purificar el complejo de proteínas de fusión solubles de las células hospedadoras o el medio.

En general, un vector de ADN preferido según la invención comprende una secuencia de nucleótidos conectada por enlaces fosfodiéster que comprende, en una dirección 5' a 3', un primer sitio de clonación para la introducción de una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido biológicamente activo, conectado operativamente a una secuencia que codifica una molécula efectora.

Los componentes de la proteína de fusión codificados por el vector de ADN se pueden proporcionar en un formato de casete. Por el término "casete" se entiende que cada componente se puede sustituir fácilmente por otro componente mediante métodos recombinantes estándar. En particular, un vector de ADN configurado en un formato de casete es particularmente deseable cuando el complejo de fusión codificado se va a usar contra patógenos que pueden tener o tienen la capacidad para desarrollar serotipos.

Para elaborar el vector que codifica un complejo de proteínas de fusión, la secuencia que codifica el polipéptido biológicamente activo se conecta a una secuencia que codifica el péptido efector mediante el uso de ligasas adecuadas. Se puede obtener ADN que codifica el péptido de presentación al aislar ADN de fuentes naturales tales como de una línea celular adecuada o mediante métodos sintéticos conocidos, p. ej. el método del triéster de fosfato. Véase, p. ej., *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984). También se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles comercialmente. Una vez aislado, el gen que codifica el polipéptido biológicamente activo se puede amplificar mediante la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) u otros medios conocidos en la técnica. Cebadores de PCR adecuados para amplificar el gen del polipéptido biológicamente activo pueden añadir sitios de restricción al producto de PCR. El producto de PCR incluye preferiblemente sitios de empalme para el péptido efector y secuencias líder necesarias para la expresión y la secreción apropiada del complejo de fusión de polipéptido biológicamente activo-efector. El producto de PCR también incluye preferiblemente una secuencia que codifica la secuencia conectora, o un sitio de enzima de restricción para la ligación de tal secuencia.

Las proteínas de fusión descritas en la presente se producen preferiblemente mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, una vez que se aísla una molécula de ADN que codifica el polipéptido biológicamente activo, la secuencia se puede ligar a otra molécula de ADN que codifica el polipéptido efector. La secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido biológicamente activo se puede enlazar directamente a una secuencia de ADN que codifica el péptido efector o, más típicamente, una secuencia de ADN que codifica la secuencia conectora que se analiza en la presente puede estar intercalada entre la secuencia que codifica el polipéptido biológicamente activo y la secuencia que codifica el péptido efector y se puede enlazar usando ligasas adecuadas. La molécula de ADN híbrida resultante se puede expresar en una célula hospedadora adecuada para producir el complejo de proteínas de fusión. Las moléculas de ADN se ligan entre sí en una orientación 5' a 3' de modo que, después de la ligación, el marco de traducción de los polipéptidos codificados no se altere (es decir, las moléculas de ADN se ligan entre sí en el marco). Las moléculas de ADN resultantes codifican una proteína de fusión en el marco.

También se pueden incluir otras secuencias de nucleótidos en la construcción génica. Por ejemplo, una secuencia promotora, que controla la expresión de la secuencia que codifica el polipéptido biológicamente activo fusionado al péptido efector, o una secuencia líder, que dirige la proteína de fusión a la superficie celular o el medio de cultivo, se puede incluir en la construcción o estar presente en el vector de expresión en el que se inserta la construcción. Se prefiere particularmente una inmunoglobulina o un promotor de CMV.

Al obtener un polipéptido biológicamente activo variante, secuencias que codifican dominios de IL-15, IL-15R α o Fc, los expertos normales en la especialidad reconocerán que los polipéptidos se pueden modificar mediante ciertas sustituciones, adiciones, eliminaciones y modificaciones postraduccionales de aminoácidos, sin pérdida o reducción de la actividad biológica. En particular, se sabe bien que es improbable que las sustituciones de aminoácidos conservativas, esto es, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de tamaño, carga, polaridad y conformación similares, alteren la función proteínica. Los 20 aminoácidos estándar que son los constituyentes de proteínas se pueden clasificar ampliamente en cuatro grupos de aminoácidos conservativos como sigue: el grupo no polar (hidrófobo) incluye alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina; el grupo polar (no cargado, neutro) incluye asparagina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina y tirosina; el grupo cargado positivamente (básico) contiene arginina, histidina y lisina; y el grupo cargado negativamente (ácido) contiene ácido aspártico y ácido glutámico. Es improbable que la sustitución en una proteína de un aminoácido por otro dentro del mismo grupo tenga un efecto adverso sobre la actividad biológica de la proteína. En otro caso, se pueden hacer modificaciones en las posiciones de los aminoácidos para reducir o mejorar la actividad biológica de la proteína. Tales cambios se pueden introducir aleatoriamente o a través de mutaciones sitioespecíficas basadas en propiedades estructurales o funcionales conocidas o supuestas del residuo o los residuos elegidos. Después de la expresión de la proteína variante, los cambios en la actividad biológica debidos a la modificación se pueden evaluar fácilmente usando ensayos de unión o funcionales.

La homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante análisis de hibridación de ADN, en donde la estabilidad del híbrido de ADN de doble hebra depende del nivel de apareamiento de bases que se produzca. Condiciones de alta temperatura y/o bajo contenido de sal reducen la estabilidad del híbrido, y se pueden variar para prevenir la renaturalización de secuencias que tienen menos de un grado de homología seleccionado. Por ejemplo, para secuencias con aproximadamente 55% de contenido de G-C, condiciones de hibridación y lavado de 40-50°C, 6 x SSC (tampón de cloruro sódico/citrato sódico) y 0,1% de SDS (dodecilsulfato sódico) indican aproximadamente 60-70% de homología, condiciones de hibridación y lavado de 50-65°C, 1 x SSC y 0,1% de SDS indican aproximadamente 82-97% de homología, y condiciones de hibridación y lavado de 52°C, 0,1 x SSC y 0,1% de SDS indican aproximadamente 99-100% de homología. También está disponible una amplia gama de programas informáticos para comparar secuencias de nucleótidos y aminoácidos (y medir el grado de homología), y una lista que proporciona fuentes de software tanto disponible comercialmente como libre se encuentra en Ausubel y cols. (1999). Algoritmos de comparación de secuencias y alineamiento de múltiples secuencias fácilmente disponibles son, respectivamente, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul y cols., 1997) y los programas ClustalW. BLAST está disponible en la red en ncbi.nlm.nih.gov y una versión de ClustalW está disponible en 2.ebi.ac.uk.

Los componentes de la proteína de fusión se pueden organizar en casi cualquier orden con tal de que cada uno sea capaz de realizar su función pretendida. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido biológicamente activo está situado en el extremo C- o N-terminal de la molécula efectora.

Las moléculas efectoras preferidas de la invención tendrán tamaños que conducirán a la función para la que están destinados esos dominios. Las moléculas efectoras de la invención se pueden elaborar y fusionar al polipéptido biológicamente activo mediante una variedad de métodos incluyendo métodos de reticulación química muy

conocidos. Véase, p. ej., Means, G. E. y Feeney, R. E. (1974) en *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. Véase además S. S. Wong (1991) en *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press. Sin embargo, generalmente se prefiere usar manipulaciones recombinantes para elaborar la proteína de fusión en el marco.

5 Según se apunta, una molécula de fusión o una molécula de conjugado según la invención se puede organizar de varios modos. En una configuración ejemplar, el extremo C del polipéptido biológicamente activo está conectado operativamente al extremo N de la molécula efectora. Esa conexión se puede alcanzar si se desea mediante métodos recombinantes. Sin embargo, en otra configuración, el extremo N del polipéptido biológicamente activo está conectado al extremo C de la molécula efectora.

10 Alternativamente o además, una o más moléculas efectoras adicionales se pueden insertar en los complejos de polipéptido biológicamente activo o conjugado según sea necesario.

Vectores y expresión

15 Se puede emplear un número de estrategias para expresar complejos de fusión proteínicos de la invención. Por ejemplo, la construcción de proteínas de fusión descrita anteriormente se puede incorporar en un vector adecuado mediante medios conocidos tales como mediante el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en el vector para la inserción de la construcción seguido por ligación. El vector que contiene la construcción génica se introduce a continuación en un hospedador adecuado para la expresión de la proteína de fusión. Véase, generalmente, Sambrook y cols., anteriormente. La selección de vectores adecuados se puede realizar empíricamente basándose en factores que se refieren al protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con y tener el replicón apropiado para el hospedador que se está empleando. Además, el vector debe ser capaz de ajustarse a la secuencia de ADN que codifica el complejo de proteínas de fusión que se va a expresar. Células hospedadoras adecuadas incluyen células eucarióticas y procarióticas, preferiblemente aquellas células que se pueden transformar fácilmente y exhiben un crecimiento rápido en el medio de cultivo. Células hospedadoras específicamente preferidas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, p. ej., *S. cerevisiae*. Generalmente, se prefieren células de mamífero, particularmente J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros hospedadores adecuados incluyen, p. ej., células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, anteriormente. A continuación, se pueden seleccionar líneas celulares transformadas o transfectadas estables. Células que expresan un complejo de proteínas de fusión de la invención se pueden determinar mediante procedimientos conocidos. Por ejemplo, la expresión de un complejo de proteínas de fusión conectado a una inmunoglobulina se puede determinar mediante un ELISA específico para la inmunoglobulina conectada y/o mediante inmunotransferencia. Otros métodos para detectar la expresión de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos biológicamente activos conectados a dominios de IL-15 o IL-15R α se divulgan en los Ejemplos.

35 Según se menciona generalmente anteriormente, se puede usar una célula hospedadora con propósitos preparativos para propagar un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada. Así, una célula hospedadora puede incluir una célula procariótica o eucariótica en la que se pretende específicamente la producción de la proteína de fusión. Así, las células hospedadoras incluyen específicamente células y órganos de levadura, mosca, gusano, planta, rana, mamífero que son capaces de propagar un ácido nucleico que codifica la fusión. Ejemplos no limitativos de líneas celulares de mamífero que se pueden usar incluyen células CHO dhfr- (Urlaub y Chasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)), células 293 (Graham y cols., *J Gen. Virol.*, 36:59 (1977)) o células de mieloma como SP2 o NSO (Galfre y Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3 (1981)).

40 Células hospedadoras capaces de propagar un ácido nucleico que codifica un complejo de proteínas de fusión abarca células eucarióticas no mamíferas así como incluyendo células de insecto (p. ej., *Sp. frugiperda*), levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*., *K. lactis*, *H polymorpha*; como se revisa generalmente por Flier, R, *Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496 (1992)), fúngicas y vegetales. También se contemplan ciertos procariotas tales como *E. coli* y *Bacillus*.

50 Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada se puede introducir en una célula hospedadora mediante técnicas estándar para transfectar células. El término "transfectar" o "transfección" está destinado a abarcar todas las técnicas convencionales para introducir un ácido nucleico en células hospedadoras, incluyendo coprecipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, transducción y/o integración viral. Métodos adecuados para transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook y cols. anteriormente, y otros libros de texto de laboratorio.

Diversos promotores (región reguladora de inicio de la transcripción) se pueden usar según la invención. La selección del promotor apropiado depende del hospedador de expresión propuesto. Se pueden usar promotores procedentes de fuentes heterólogas con tal de que sean funcionales en el hospedador elegido.

55 La selección del promotor también depende de la eficacia deseada y el nivel de producción de péptido o proteína. Promotores inducibles tales como tac se emplean a menudo a fin de incrementar drásticamente el nivel de expresión de proteína en *E. coli*. La sobreexpresión de proteínas puede ser nociva para las células hospedadoras. Por consiguiente, el crecimiento de la célula hospedadora se puede limitar. El uso de sistemas promotores inducibles

permite que las células hospedadoras se cultiven hasta densidades aceptables antes de la inducción de la expresión génica, facilitando de ese modo rendimientos de producto superiores.

Se pueden usar diversas secuencias de señal según la invención. Se puede usar una secuencia de señal que es homóloga a la secuencia codificante del polipéptido biológicamente activo. Alternativamente, también se puede usar una secuencia de señal que se ha seleccionado o diseñado para una secreción y un procesamiento eficaces en el hospedador de expresión. Por ejemplo, pares adecuados de secuencia de señal/célula hospedadora incluyen la secuencia de señal sacB de *B. subtilis* para la secreción en *B. subtilis*, y el factor de emparejamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* o secuencias de señal pho1 de fosfatasa ácida de *P. pastoris* para la secreción de *P. pastoris*. La secuencia de señal se puede enlazar directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de peptidasa de señal a la secuencia codificante de proteína, o a través de un puente nucleotídico corto que consiste habitualmente en menos de diez codones, donde el puente asegura el marco de lectura correcto de la secuencia de TCR aguas abajo.

Elementos para mejorar la transcripción y la traducción se han identificado para sistemas de expresión de proteínas eucarióticas. Por ejemplo, colocar el promotor del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) 1000 pb a cada lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles de transcripción en de 10 a 400 veces en células vegetales. La construcción de expresión también debe incluir las secuencias de inicio de la traducción apropiadas. La modificación de la construcción de expresión para incluir una secuencia de consenso Kozak para el inicio de la traducción apropiada puede incrementar el nivel de traducción en 10 veces. A menudo se emplea un marcador selectivo, que puede ser parte de la construcción de expresión o estar separado de ella (p. ej., soportado por el vector de expresión), de modo que el marcador se pueda integrar en un sitio diferente del gen de interés. Ejemplos incluyen marcadores que confieren resistencia a antibióticos (p. ej., bla confiere resistencia a ampicilina para células hospedadoras de *E. coli*, nptII confiere resistencia a kanamicina a una amplia variedad de células procarionóticas y eucarióticas) o que permiten que el hospedador crezca sobre medio mínimo (p. ej., HIS4 permite que *P. pastoris* o *S. cerevisiae* His⁻ crezcan en ausencia de histidina). El marcador seleccionable tiene sus propias regiones reguladoras de inicio y terminación de la transcripción y la traducción para permitir una expresión independiente del marcador. Si se emplea resistencia a antibióticos como un marcador, la concentración del antibiótico para la selección variará dependiendo del antibiótico, variando generalmente de 10 a 600 μ g del antibiótico/ml de medio.

La construcción de expresión se ensambla al emplear técnicas de ADN recombinante (Sambrook y cols., 1989; Ausubel y cols., 1999). La digestión con enzimas de restricción y la ligación son las etapas básicas empleadas para enlazar dos fragmentos de ADN. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligación, y esto se puede efectuar al rellenar salientes, eliminar porciones terminales del fragmento o los fragmentos con nucleasas (p. ej., ExoIII), mutagénesis sitiodirigida, o al añadir nuevos pares de bases mediante PCR. Se pueden emplear policonectores y adaptadores para facilitar el enlace de fragmentos seleccionados. La construcción de expresión se ensambla típicamente en fases que emplean rondas de restricción, ligación y transformación de *E. coli*. Numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción de la construcción de expresión se conocen en la especialidad (λ ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI, citados en Ausubel y cols., 1999) y la elección particular no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación estará influenciada por el sistema de transferencia génica seleccionado para la introducción de la construcción de expresión en la célula hospedadora. Al final de cada fase, la construcción resultante se puede analizar mediante análisis de restricción, secuencias de ADN, hibridación y PCR.

La construcción de expresión se puede transformar en el hospedador como la construcción del vector de clonación, bien lineal o bien circular, o se puede retirar del vector de clonación y se puede usar como tal o introducirse en un vector de aporte. El vector de aporte facilita la introducción y el mantenimiento de la construcción de expresión en el tipo de célula hospedadora seleccionado. La construcción de expresión se introduce en las células hospedadoras mediante cualquiera de un número de sistema de transferencia génica conocidos (p. ej., competencia natural, transformación mediada químicamente, transformación de protoplastos, electroporación, transformación biolística, transfección o conjugación) (Ausubel y cols., 1999; Sambrook y cols., 1989). El sistema de transferencia génica seleccionado depende de las células hospedadoras y los sistemas vectoriales usados.

Por ejemplo, la construcción de expresión se puede introducir en células de *S. cerevisiae* mediante transformación de protoplastos o electroporación. La electroporación de *S. cerevisiae* se efectúa fácilmente y da eficacias de transformación comparables a la transformación de esferoplastos.

La presente invención proporciona además un procedimiento de producción para aislar una proteína de fusión de interés. En el procedimiento, una célula hospedadora (p. ej., una célula de levadura, hongo, insecto, bacteria o animal), en la que se ha introducido un ácido nucleico que codifica la proteína de interés conectada operativamente a una secuencia reguladora, se desarrolla a escala de producción en un medio de cultivo para estimular la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de interés. Posteriormente, la proteína de fusión de interés se aísla de células hospedadoras recogidas o del medio de cultivo. Se pueden usar técnicas de purificación de proteínas estándar para aislar la proteína de interés del medio o de las células recogidas. En particular, las técnicas de purificación se pueden usar para expresar y purificar una proteína de fusión deseada a gran escala (es decir en cantidades de al menos miligramos) a partir de una variedad de equipamientos incluyendo botellas rotatorias, matraces giratorios, placas de cultivo tisular, un biorreactor o un fermentador.

Un complejo de fusión proteínica expresado se puede aislar y purificar mediante métodos conocidos. Típicamente, el medio de cultivo se centrifuga o se filtra y a continuación el sobrenadante se purifica mediante cromatografía de afinidad o inmutafinidad, p. ej. cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G o un protocolo de inmutafinidad que comprende el uso de anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de fusión expresado tal como un TCR conectado o una región inmutoglobulínica del mismo. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden separar y purificar mediante una combinación apropiadas de técnicas conocidas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos que utilizan la solubilidad tales como precipitación con sales y precipitación en disolvente, métodos que utilizan la diferencia en el peso molecular tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, métodos que utilizan una diferencia en la carga eléctrica tales como cromatografía de intercambio iónico, métodos que utilizan afinidad específica tales como cromatografía de afinidad, métodos que utilizan una diferencia en la hidrofobia tales como cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa y métodos que utilizan una diferencia en el punto isoelectrico, tales como electroforesis de enfoque isoelectrico, columnas de afinidad a metales tales como Ni-NTA. Véase generalmente Sambrook y cols. y Ausubel y cols. anteriormente, para una divulgación relativa a estos métodos.

Se prefiere que las proteínas de fusión de la presente invención sean sustancialmente puras. Esto es, las proteínas de fusión se han aislado de sustituyentes celulares que la acompañan naturalmente de modo que las proteínas de fusión estén presentes preferiblemente en al menos 80% o 90% a 95% de homogeneidad (p/p). Las proteínas de fusión que tienen al menos de 98 a 99% de homogeneidad (p/p) son las más preferidas para muchas aplicaciones farmacéuticas, clínicas y de investigación. Una vez sustancialmente purificada, la proteína de fusión debe estar sustancialmente libre de contaminantes para aplicaciones terapéuticas. Una vez parcialmente purificadas o hasta sustancialmente purificadas, las proteínas de fusión solubles se pueden usar terapéuticamente, o para realizar ensayos in vitro o in vivo según se divulga en la presente. La pureza sustancial se puede determinar mediante una variedad de técnicas estándar tales como cromatografía y electroforesis en gel.

Los complejos de fusión de TCR solubles de la invención contienen dominios de TCR que están suficientemente truncados de modo que el complejo de fusión de TCR se pueda secretar al medio de cultivo después de la expresión. Así, un complejo de fusión de TCR truncado no incluirá regiones ricas en residuos hidrófobos, típicamente los dominios transmembranarios y citoplásmicos de la molécula de TCR. Así, por ejemplo, para una molécula de TCR truncada preferida de la invención, preferiblemente desde aproximadamente la cisteína final hasta el residuo C-terminal de la cadena β y desde aproximadamente la cisteína final hasta el residuo C-terminal de la cadena α de la molécula de TCR no se incluyen en el complejo de fusión de TCR truncado.

Los presentes complejos de proteínas de fusión son adecuados para el uso in vitro o in vivo con una variedad de células que son cancerosas o están infectadas o que pueden ser infectadas por una o más enfermedades.

Descripción detallada

La interleucina-15 humana (hIL-15) es transpresentada a células efectoras inmunitarias por la cadena α del receptor de IL-15 humana (hIL-15R α) expresada sobre células que presentan antígeno. IL-15R α se une a hIL-15 con alta afinidad (38 pM) principalmente a través del dominio Sushi extracelular (hIL-15R α Su). Aquí se demuestra que los dominios de hIL-15 y hIL-15R α Su se pueden usar como un andamiaje para construir complejos de fusión de múltiples dominios. Se formaron complejos de fusión de receptores de células T (TCR) tanto bivalentes como biespecíficos usando este andamiaje a través de la combinación de diversos dominios de TCR monocatenarios (sc) fusionados a los extremos N de las cadenas de hIL-15 y hIL-15R α Su. En estas fusiones, los dominios de scTCR retienen la actividad de unión a antígeno y el dominio de hIL-15 exhibe unión al receptor y actividad biológica. Las fusiones de scTCR bivalentes exhibían una capacidad de unión a antígeno mejorada debido a la avidéz de unión molecular incrementada mientras que las fusiones que comprenden dos dominios de scTCR diferentes eran capaces de unir dos complejos de péptido cognado/MHC. Las moléculas biespecíficas que contienen dominios de scTCR y scCD8 $\alpha\beta$ también exhiben una unión significativamente mayor a complejo de péptido cognado/MHC que las moléculas de scTCR bien bivalentes o bien monovalentes, demostrando que el andamiaje IL-15:IL-15R α exhibe la flexibilidad necesaria para soportar la interacción de múltiples dominios con una diana dada. Sorprendentemente, también se podrían formar TCR funcionales al coexpresar las cadenas α y β de TCR separadamente como fusiones con los dominios de hIL-15 y hIL-15R α Su. Finalmente, se muestra que el dominio de hIL-15 fusionado se puede manipular a través de mutaciones sitioespecíficas para proporcionar actividad de citocina superagonista o antagonista. Conjuntamente, estas propiedades indican que los dominios de hIL-15 y hIL-15R α Su se pueden usar como un andamiaje funcional versátil para generar nuevas moléculas inmunitarias elegidas como diana.

Los dominios de IgG, particularmente el fragmento Fc, se han usado satisfactoriamente como andamiajes dímeros para un número de moléculas terapéuticas incluyendo fármacos biológicos aprobados. Por ejemplo, el etanercept es un dímero de receptor de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) p75 humano soluble (sTNF α) conectado al dominio Fc de IgG1 humana. Esta dimerización permite que el etanercept sea hasta 1.000 veces más potente para inhibir la actividad de TNF- α que el sTNFR monómero y proporciona la fusión con una semivida sérica cinco veces más larga que la forma monómera. Como resultado, el etanercept es eficaz en la neutralización de la actividad proinflamatoria de TNF- α in vivo y la mejora de los resultados de pacientes para un número de diferentes indicaciones autoinmunitarias.

Además de su actividad de dimerización, el fragmento Fc también proporciona funciones efectoras citotóxicas a través de la activación y la interacción del complemento con receptores de Fcγ presentados sobre células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos, fagocitos y células dendríticas. En el contexto de anticuerpos terapéuticos anticancerosos y otras proteínas de fusión de dominio de anticuerpo-Fc, estas actividades probablemente representan un papel importante en la eficacia observada en modelos tumorales animales y en pacientes con cáncer. Sin embargo, estas respuestas efectoras citotóxicas pueden no ser suficientes en un número de aplicaciones terapéuticas. Así, ha habido un interés considerable en mejorar y expandir la actividad efectora del dominio Fc y desarrollar otros medios para incorporar respuestas inmunitarias citotóxicas, incluyendo actividad de células T, a la zona enferma a través de moléculas terapéuticas dirigidas a una diana. Se han usado dominios de IgG como un andamiaje para formar anticuerpos biespecíficos para mejorar la calidad y la cantidad de productos generados por la tecnología de fusión de hibridomas tradicional. Aunque estos métodos evitan los inconvenientes de otros andamiajes, ha sido difícil producir anticuerpos biespecíficos en células de mamífero en niveles suficientes para soportar el desarrollo y el uso clínico.

En un esfuerzo por desarrollar un nuevo andamiaje multímero inmunoestimulante derivado de ser humano, los presentes inventores se centraron en el uso de dominios de IL-15 humana (hIL-15) y receptor de IL-15. hIL-15 es un miembro de la pequeña familia de haz de cuatro hélices α de citocinas que se asocia con la cadena α del receptor de hIL-15 (hIL-15R α) con una alta afinidad de unión (constante de disociación en equilibrio (KD) $\sim 10^{-11}$ M). El complejo resultante se transpresenta a continuación a los complejos de receptor de IL-2/15 humana β /cadena y común (hIL-15R $\beta\gamma$ C) presentados sobre la superficie de células T y células NK. Esta interacción citocina/receptor da como resultado la expansión y la activación de células T y células NK efectoras, que representan un papel importante en la erradicación de células viralmente infectadas y malignas. Normalmente, hIL-15 y hIL-15R α se coproducen en células dendríticas para formar complejos intracelularmente que posteriormente son secretados y expuestos como moléculas heterodímeras sobre superficies celulares. Así, las características de las interacciones de hIL-15 y hIL-15R α sugieren que estos dominios de unión intercatenarios podrían servir como un nuevo andamiaje inmunoestimulante derivado de ser humano para elaborar moléculas dímeras solubles capaces de una unión específica para la diana. En la presente, los inventores describen la generación y la caracterización de un número de proteínas de fusión que comprenden dominios de receptor de células T (TCR) y unión a CD8 para demostrar la viabilidad de usar el andamiaje de hIL-15:hIL-15R α para crear tanto homodímeros solubles con una afinidad de unión funcional incrementada hacia antígenos diana como heterodímeros para complejos proteínicos específicos de múltiples sitios. Los presentes inventores también han mostrado que estas proteínas de fusión retienen una potente actividad de hIL-15 capaz de estimular respuestas de células efectoras inmunitarias.

En la presente, los inventores demuestran los usos potenciales de un andamiaje basado en hIL-15:hIL-15R α Su para crear nuevas moléculas dímeras. Los complejos dímeros de proteínas de fusión retenían la actividad biológica inmunoestimulante y específica para una diana de sus dominios de hIL-15 y dominios de unión, indicando que la adición de hIL-15 y hIL-15R α no alteraba significativamente la ordenación espacial de los dominios de fusión y proporcionaba un grado adecuado de flexibilidad de conformación sin afectar a la actividad de la citocina. Así, este andamiaje se podría usar para formar complejos de fusión multivalentes, tales como el dímero de c264scTCR, para incrementar la afinidad de unión global de las moléculas, o moléculas biespecíficas, tales como el heterodímero de c264scTCR/c149scTCR. En todos los casos, las proteínas de fusión solubles se producían a niveles relativamente altos en un cultivo de células CHO recombinantes (mg por litro en sobrenadante de cultivo celular sin cribado u optimización intensivos de la línea celular) y se podrían purificar fácilmente de los sobrenadante de cultivo celular. Los presentes inventores también han demostrado que la utilidad del andamiaje basado en hIL-15:hIL-15R α Su se podría extender para crear moléculas bicatenarias biológicamente activas solubles, tales como TCR α/β , al fusionar los dominios extracelulares de las dos cadenas polipeptídicas a los extremos N de hIL-15 y hIL-15R α Su. Este formato daba como resultado una disminución moderada en la actividad de hIL-15, posiblemente debido a impedimento estérico entre las cadenas α/β de TCR interplegadas fusionadas a los extremos N distales del complejo hIL-15:hIL-15R α Su y el sitio de unión a hIL-15R $\beta\gamma$ C situado en el medio del complejo. Son posibles otros formatos y se pueden generar usando métodos habituales.

El andamiaje basado en hIL-15:hIL-15R α Su también se usó para generar un heterodímero OT1scTCR/scCD8 en el que los dominios de CD8 α/β y TCR son capaces de unirse al mismo complejo de pMHC1 pero en sitios espacialmente distintos. Estudios previos que usan reactivos de pMHC1 solubles han determinado que CD8 estabiliza y mejora las interacciones TCR:pMHC1 en la superficie celular a través de efectos tanto sobre la disociación como sobre la asociación. Este efecto es importante para determinar la dependencia de las células T sobre la actividad correceptora de CD8, de modo que el requerimiento de CD8 para la activación de células T específica de pMHC1 está inversamente correlacionado con la afinidad de TCR:pMHC1. Sin embargo, varios estudios de unión que usan proteínas de CD8 α/β , TCR y pMHC1 purificadas solubles han mostrado que las interacciones TCR:pMHC1 no se ven afectadas por la presencia o ausencia de CD8, sugiriendo efectos de unión no cooperativos.

Los resultados de los presentes estudios basados en células y de unión a SPR con el heterodímero OT1scTCR/scCD8 están en contraste con estos informes previos al mostrar que los dominios TCR y CD8 expuestos en la misma molécula soluble exhibían una actividad de unión a péptido/MHC mucho mejor que la que se observaba con moléculas que soportan dominios de TCR monovalentes o divalentes. Este efecto se refleja tanto en una disociación más lenta como en una asociación más rápida del complejo heterodímero pMHC1:OT1scTCR/scCD8, de

acuerdo con las observaciones para la unión de pMHC1 a moléculas de CD8 y TCR sobre células T. Así, el heterodímero OT1scTCR/scCD8 imita la unión del OT1 TCR sobre células T, que exhibe una fuerte dependencia de la actividad de correceptor CD8 para interacciones con pMHC. Estos resultados indican que el heterodímero scTCR/scCD8 y variantes de esta molécula podrían servir como herramientas muy útiles para analizar adicionalmente interacciones moleculares entre el complejo TCR:pMHC1:CD8 terciario en un sistema libre de células. Además, los reactivos basados en el heterodímero scTCR/scCD8 con actividad de unión a pMHC1 mejorada podrían tener utilidad para detectar la presentación de antígenos sobre células enfermas, sin la necesidad de mutar el dominio de TCR para una afinidad de unión incrementada.

Los resultados de los presentes experimentos de SPR sobre las fusiones OT1scTCR difieren de los presentados por Alam y cols., donde se observaba que la afinidad de unión de heterodímero de OT1TCR α/β monovalente al complejo de péptido de OVA/H-2Kb inmovilizado era aproximadamente 6 μ M. En los presentes estudios, los inventores fueron incapaces de detectar la unión a péptido de OVA/H-2Kb del monómero OT1scTCR/birA y el dímero OT1scTCR/birA exhibía una KD aparente de 30 μ M. Es posible que el OT1 TCR pierda actividad de unión cuando se le da formato como una molécula V α -conector-V β -C β monocatenaria. Sin embargo, los presentes inventores observaron una actividad equivalente cuando se comparaba OT1scTCR/birA y una construcción bicatenaria. Por otra parte, estudios previos han mostrado que los tetrámeros de OVA/H-2Kb con mutaciones Kb que anulan la unión a CD8 exhiben poca o ninguna actividad de unión específica a células que soportan OT1 TCR incluso cuando se usaban concentraciones altas de tetrámeros, sugiriendo interacción de baja afinidad entre OT1 TCR y su pMHC1 cognado. En contraste, los tetrámeros de péptido de OVA/H-2Kb sin las mutaciones de unión a CD8 eran capaces de teñir brillantemente células que soportaban OT1 TCR, de acuerdo con la capacidad de CD8 para mejorar la actividad de unión a OT1 TCR observada en este estudio.

El andamiaje basado en hIL-15:hIL-15R α Su se puede explotar de forma muy parecida al dominio Fc del andamiaje de IgG para generar productos terapéuticos dirigidos a dianas multivalentes o multiespecíficos. Con su potente actividad para estimular la proliferación y la activación de células NK y células T con memoria CD8+ efectoras, el dominio hIL-15 amplía el alcance de mecanismos inmunoterapéuticos potenciales más allá de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la activación del complemento asociadas con enfoques basados en IgG. Usando enfoques similares a los usados para manipular la actividad del dominio Fc de moléculas de IgG, los presentes inventores demuestran que el dominio IL-15 se puede mutar para incrementar o disminuir su actividad funcional. Los presentes inventores muestran que la molécula de fusión hIL-15:hIL-15R α Su que contiene una mutación N72D en el dominio IL-15 exhibe un incremento de 3-4 veces en la actividad biológica, mientras que la mutación IL-15 D8N exhibe poca o ninguna actividad. Aunque las proteínas de fusión basadas en superagonistas de IL-15 podrían servir como productos inmunoterapéuticos dirigidos a una diana para cáncer y enfermedades infecciosas, un antagonista de IL-15 capaz de inhibir células sensibles a IL-15 en la zona enferma puede tener un potencial terapéutico para tratar rechazo de aloinjertos y enfermedades autoinmunitarias inflamatorias, particularmente si las células T con memoria CD8 representan un papel en la patología de la enfermedad. Ya se ha mostrado que una proteína antagonista de mutante de IL-15/Fc γ 2a no dirigida a una diana es eficaz para inhibir el rechazo de islotes y aloinjertos cardíacos y prevenir el desarrollo y la progresión de la artritis en modelos en animales experimentales. Son posibles enfoques similares con dominios antagonistas de IL-15 en el contexto de las proteínas de fusión hIL-15:hIL-15R α Su. Además, bajo ciertas circunstancias, puede ser deseable tener un andamiaje funcionalmente inerte para la generación de moléculas multímeras. Por ejemplo, se ha encontrado que las fusiones scTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su que contienen una mutación IL-15 D8N, que elimina interacciones con IL-15R β γ , proporcionan mejor tinción específica para antígeno de TCR de células que despliegan complejo de receptor de IL-15.

Aunque los presentes inventores se han dirigido a TCR y moléculas de CD8 como dominios de elección como diana con propósitos de demostración en la presente, se entiende que el andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su se podría usar para construir otras nuevas moléculas con dominios proteínicos derivados de anticuerpos, moléculas de adherencia u otros receptores. También es posible crear fusiones de dominios proteínicos a los extremos C de la hIL-15 e hIL-15R α Su que, basándose en la estructura cristalina, son accesibles para la modificación. Las moléculas resultantes pueden contener hasta cuatro capacidades de reconocimiento de dianas diferentes. Con los socios de fusión apropiados, estos tipos de moléculas pueden promover la conjugación de células efectoras inmunitarias y células diana y conseguir una destrucción eficaz de las células diana. Además, el dominio IL-15 del complejo puede aumentar más estos procesos al proporcionar actividad inmunoestimulante para apoyar la proliferación de células efectoras y la citotoxicidad. Una variedad de moléculas multifuncionales basadas en este concepto se usan como agentes inmunoterapéuticos anticancerosos y antivirales.

Previamente, el pobre nivel de expresión en un sistema de células de mamífero estándar limitaba el desarrollo de hIL-15 recombinante como un producto terapéutico. Según se demuestra en la presente, se puede conseguir la expresión de complejos scTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su a niveles capaces de apoyar el desarrollo clínico y potencialmente la comercialización del producto. Además, se ha mostrado que la cadena IL-15R α mejora la actividad in vivo de hIL-15, sin limitarse por el mecanismo, posiblemente al mejorar la farmacocinética de la citocina. Estas dos características de complejos hIL-15:hIL-15R α Su, en combinación con su naturaleza multivalente y/o el diseño de elección como diana multiespecífico, proporciona una oportunidad de capturar todo el potencial de hIL-15 como un agente inmunoterapéutico contra el cáncer y las infecciones virales.

Según se proporciona en los Ejemplos, se encontró que los complejos de proteínas de fusión hIL-15:hIL-15R α Su que comprenden dominios Fc de inmunoglobulina tienen ventajas adicionales. La asociación de los dominios Fc permite la generación de moléculas multicatenarias capaces de interacciones multivalentes y multispecíficas. De hecho, los complejos de proteínas de fusión de la invención que comprenden los múltiples dominios del mismo sTCR exhibían una actividad de unión a antígeno mejorada con respecto a la esperada basándose en la actividad de la fusión de sTCR dímera. En algunos casos, el complejo de fusión de la invención es capaz de unirse a y activar tanto células inmunitarias portadoras de IL-15R $\beta\gamma$ C y células inmunitarias portadoras de receptor de Fc, permitiendo una potente actividad inmunoestimulante. Se encontró que el complejo de proteínas de fusión de la invención que comprende dos dominios exhibía mejor actividad de IL-15 que la esperada cuando se comparaba con otras proteínas de fusión de IL-15. Adicionalmente, el complejo de proteínas de fusión de la invención era más eficaz para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de Fc de anticuerpo contra células diana que presentan péptido/MHC que la proteína de fusión TCR-IgG1. La actividad mejorada puede haber sido el resultado de una unión mejorada de los complejos de proteína de fusión al complejo de péptido/MHC y/o el incremento de reactividad para células efectoras que exponen receptores de Fc o receptores de IL-15. Por otra parte, a través de análisis por mutagénesis, se encontró que cada uno de los dominios TCR, IL-15 e IgG Fc de los complejos de proteínas de fusión se podrían manipular fácilmente e independientemente para alterar su unión y actividad funcional para proporcionar un complejo multispecífico con los efectos biológicos deseados.

Se demostró que los complejos de proteínas de fusión de la invención tienen un perfil farmacocinético significativamente mejor en mamíferos que IL-15 libre. Además, basándose en el perfil farmacocinético similar observado con diferentes métodos de análisis, los complejos de proteínas de fusión permanecen intactos in vivo como una molécula multicatenaria sin evidencia de escisión o disociación de la cadena de polipéptido. Adicionalmente, se muestra que los complejos de proteínas de fusión de la invención son capaces de mediar en la actividad antitumoral contra tumores tanto portadores como no portadores de dianas en animales y exhibían una eficacia antitumoral más potente que rhIL-15 administrada en una dosis molar equivalente. Por otra parte, el tratamiento con dosis eficaces de las proteínas de fusión era bien tolerado en estos modelos en animales.

Ejemplo 1 - Construcción de vectores de expresión que contienen genes de fusión c264scTCR/huIL15R α Sushi-hulgG1 y c149scTCR/huIL15N72D.

La proteína de fusión denominada molécula T2 (T2M) consiste en un polipéptido multicatenario (Figura 1). En una realización de la invención, uno de estos polipéptidos comprende una fusión entre un dominio de unión a proteína e IL-15 (o variantes de IL-15) según se divulga en el documento WO2008143794. Un segundo polipéptido de T2 comprende una fusión entre un dominio de unión a proteína, un dominio IL-15R α y un dominio de inmunoglobulina. Alternativamente, la proteína de fusión de dominio de unión a proteína-IL-15 se puede conectar además a un dominio de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina preferidos comprenden regiones que permiten la interacción con otros dominios de inmunoglobulina para formar proteínas multicatenarias. Por ejemplo, las regiones de cadena pesada de inmunoglobulina, tales como C_H2-C_H3 de IgG1, son capaces de interactuar para crear la región Fc. Dominios de inmunoglobulina preferidos también comprenden regiones con funciones efectoras, incluyendo actividad de unión a receptor de Fc o proteína del complemento, y/o con sitios de glicosilación. En algunas realizaciones, los dominios de inmunoglobulina de la molécula T2 contienen mutaciones que reducen o aumentan la actividad de unión al receptor de Fc o al complemento o la glicosilación, afectando de ese modo a la actividad biológica de la proteína resultante. Por ejemplo, se podrían usar dominios de inmunoglobulina que contienen mutaciones que reducen la unión a receptores de Fc para generar moléculas T2 con una actividad de unión inferior a células que soportan receptores de Fc, lo que puede ser ventajoso para reactivos diseñados para reconocer o detectar antígenos específicos para TCR.

La construcción de un vector de expresión que contiene el TCR monocatenario para p53 (aa 264-272) (denominado c264scTCR) fusionado a dominio IL-15R α sushi humano (huIL15R α Sushi) y regiones constantes de IgG1 humana (hulgG1 C_H1-C_H2-C_H3) se llevó a cabo como sigue. El fragmento génico c264scTCR/hulgG1 se retiró del vector pNEF38-c264scTCR/hulgG1 previamente construido mediante digestión restringida con PaeI y MluI. El fragmento génico se purificó en gel y se ligó a vector pMSGV digerido con las mismas enzimas de restricción, dio como resultado la construcción denominada pMSGV-c264scTCR/hulgG1. Un fragmento de ADN que contenía el promotor de CMV se purificó de pcDNA3.1 después de la digestión con NruI y HindIII. Este fragmento se ligó en pMSGV-c264scTCR/hulgG1 que se había digerido con PaeI y rellenado con ADN polimerasa para crear extremos romos y a continuación se digirió con HindIII. La construcción resultante se denominó pMC-c264scTCR/hulgG1. Un fragmento génico huIL15R α Sushi procedente del pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Sushi previamente construido (véase el documento WO2008143794) se amplificó con el cebador delantero:

5'-TGTTGGGAATTCATCACGTGCCCTC-3' (SEQ ID N°: 6)

y el cebador trasero:

5'-TGGTGTGAATTCTCTAATGCATTTGAGACTGG-3' (SEQ ID N°: 7)

mediante KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD) bajo las siguientes condiciones de PCR: 95°C, 2 min., 1 ciclo; 95°C, 20 s, 65°C, 20 s; 70°C, 20 s, 35 ciclos; 72°C, 10 min., 1 ciclo. El producto de PCR del gen IL15R α Sushi

- humano se purificó en gel y se digirió con EcoRI. El gen se ligó en pMC-c264scTCR/hulgG1 que se había digerido con EcoRI. La clonación del fragmento de ADN que codifica el dominio IL15R α Sushi humano en el pMC-c264scTCR/hulgG1 daba como resultado un gen de fusión c264scTCR/hulL15R α Sushi-hulgG1 que comprendía la siguiente secuencia: 3'-líder de cadena pesada de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector de péptidos - 264 TCR V- β - TCR C- β humana - IL15R α Sushi humana - cadena pesada de IgG1 humana. El vector resultante (pMC.c264scTCR-Su/IgG1.PUR), mostrado en la Figura 2, que contenía el inserto génico IL15R α Sushi humano correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se reconfirmó mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen y la proteína c264scTCR/hulL15R α Sushi/hulgG1 se muestran en la Figura 3 y la Figura 4, respectivamente.
- 5 Se construyó un vector de expresión diferente que contenía la fusión génica c264scTCR/hulL15R α Sushi-hulgG1 que carecía de los sitios EcoRI internos (y las secuencias codificantes correspondientes). Para este vector, una porción del fragmento génico c264scTCR se amplificó a partir del vector c264scTCR/hulgG1 con el cebador delantero:
- 5'GTACGACTTAATTAACCTCGAGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGTTATGG3' (SEQ ID N°: 8)
- y el cebador trasero:
- 15 5'CTTCCCGTTAACCCACCAGCTCAGCTCCACGTG3' (SEQ ID N°: 9).
- El resto de la región constante de TCR β del fragmento génico c264scTCR se amplificó a partir del vector c264scTCR/hulgG1 con el cebador delantero:
- 5'CTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC3' (SEQ ID N°: 10)
- y el cebador trasero:
- 20 5'GAGGGCACGTGATGTCTGCTCTACCCAGGCCTC3' (SEQ ID N°: 11)
- El fragmento génico hulL15R α Sushi se amplificó a partir del vector c264scTCR/hulL15R α Sushi con el cebador delantero:
- 5'GTAGAGCAGACATCACGTGCCCTCCCCCATG3' (SEQ 10 N°: 12)
- y el cebador trasero:
- 25 5'CCTTGGTGCTAGCTCTAATACATTTGAGACTGGGGTTGTCC3' (SEQ ID N°: 13).
- El fragmento génico de la región constante de cadena pesada de hulG1 se amplificó a partir del vector c264scTCR/hulgG1 con el cebador delantero:
- 5'CCAGTCTCAAATGTATTAGAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC3' (SEQ 10 N°: 14)
- y el cebador trasero:
- 30 5'GTAATATTCTAGACGCGTTCATTATTTACCAGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC3' (SEQ ID N°: 15).
- Los productos resultantes que contenían la secuencia de la región constante de β de TCR y el gen hulL15R α Sushi se usaron como plantillas para generar un fragmento génico mediante PCR usando el cebador delantero:
- 5'CTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC3' (SEQ ID N°: 10)
- y el cebador trasero:
- 35 5'CCTTGGTGCTAGCTCTAATACATTTGAGACTGGGGTTGTCC3' (SEQ ID N°: 13)
- El producto de PCR resultante y el fragmento génico de hulG1 sirvieron como plantillas para generar un gen de fusión TCR β c/hulL15R α Sushi/hulgG1 mediante PCR con el cebador delantero:
- 5'CTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC3' (SEQ ID N°: 10)
- y el cebador trasero:
- 40 5'GTAATATTCTAGACGCGTTCATTATTTACCAGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC3' (SEQ 10 N°: 15)
- El producto de PCR c264scTCR se digirió con PaeI y HpaI y el gen de fusión TCR β c/hulL15R α Sushi/hulgG1 se digirió con HpaI y NsiI. Los fragmentos génicos digeridos se ligaron en vector de retrovirus pMSGV que contenía promotor de CMV. El vector resultante se denominó c264scTCR/Sushi/hulgG1-pMSGVc o pMSGVc264Sulg (Figura 5). Las secuencias del gen y la proteína c264scTCR/hulL15R α Sushi/hulgG1 se muestran en la Figura 6 y la Figura 7, respectivamente.
- 45

5 La generación de vectores de expresión que producen una fusión entre el dominio de unión a TCR monocatenario (es decir c264scTCR) e IL-15 (o variantes de IL-15) se ha divulgado en el documento WO2008143794. Variantes de IL-15 particularmente útiles son las que reducen o eliminan la actividad biológica de IL-15 o que incrementan la actividad biológica de IL-15. Por ejemplo, variantes de IL-15 humanas con sustituciones en la posición 72 (es decir sustitución N72D) pueden incrementar la actividad biológica de 5 a 10 veces. Variantes de IL-15 se proporcionan en la tabla posterior:

Mutantes	Posición	8	61	65	72	108	Unión al receptor de IL15Rβγc	Unión a IL15Rα	Actividad de Proliferación
		D	D	N	N	Q	+	+	+
*1	WT aa	8	N				-	+	-
*2	8	8	A				-	+	-
*3	8	61		A			-	+	-
*4	61	65			D		-	+	-
*5	65	65			A		-	+	-
*6	65	72				0	3+	+	3+
*8	72	72				R	-	+	-
*9	72	108					-	+	-
*10	108	8 + 65	N		A		-	+	-
*11	8 + 65	8 + 108	A				-	+	-
*12	8 + 108	8 + 65	S		R		-	+	-

* referencia

10 Los complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 que se describen en la tabla inmediatamente anterior se caracterizaron por su capacidad para unirse a antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentan p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, células T2 positivas a HLA-A2.1 (2 x 10⁶/ml) se cargaron con 20 μM de péptido p53 (aa264-272) a 37°C en presencia de 1 x PLE (Altor Bioscience) durante 2-3 h. Células T2 que no se incubaban con péptido y células 32Dβ que expresan IL-2/15Rβγc sirven como controles. Las células T2 cargadas con péptido p53, células T2 de control o células 32Dβ (2 x 10⁵/100 μl) se incubaron a continuación durante 30 min. a 4°C con 320 nM de los siguientes complejos de proteínas de fusión dímeros:

1) c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαSushi, 2) c264scTCR/huIL15D8A+c264scTCR/huIL15RαSushi y 3) c264scTCR/huIL15D8N+c264scTCR/huIL15RαSushi. Estos complejos se generaron al incubar 160 nM de proteína de fusión c264scTCRhuIL15 purificada y 160 nM de proteína de fusión c264scTCRhuIL15RαSushi purificada a 4°C durante 3 horas. Después de la tinción, las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,05% de azida sódica) y se tiñeron con 0,5 μg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TCR Cβ humana (BF1) en 100 μl de tampón de lavado durante 30 min. a 4°C. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5 μg de estreptavidina conjugada a R-ficoeritrina en 100 μl de tampón de lavado durante 30 min. a 4°C. Las células se lavaron y se resuspendieron para el análisis mediante citometría de flujo.

25 El complejo c264scTCR/huIL15D8A+c264scTCR/huIL15Sushi y el complejo c264scTCR/huIL15D8N+c264scTCR/huIL15Sushi exhibían una actividad equivalente al complejo c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15Sushi para teñir específicamente células T2 cargadas con péptido p53. Estos resultados indican que los dominios scTCR multivalentes son completamente funcionales en cada uno de estos complejos de fusión. Los complejos de proteínas de fusión que comprende variantes de IL-15 (D8A y D8N) no muestran actividad de unión a los receptores IL-15Rβγc presentes sobre las células 32Dβ. Se llevaron a cabo estudios similares de unión a receptores IL-15Rβγc con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Tabla 1. Los resultados indican que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de la invención que comprenden variantes de IL-15 retienen actividad para reconocer complejos péptido/MHC y exhiben una actividad de unión reducida o incrementada para receptores IL-15Rβγc.

Para ciertas moléculas T2, es útil tener múltiples dominios de unión diferentes fusionados a los componentes IL-15 e IL-15R α . En un ejemplo para ilustrar la actividad de tales moléculas, un dominio TCR monocatenario (llamado c149scTCR), específico para el péptido p53 (aa 149-157) presentado en el contexto de HLA-A2, se conectó al dominio IL-15N72D y la proteína de fusión resultante se coexpresó con la proteína de fusión c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 para producir una proteína T2 multicatenaria con dominios de unión a c264scTCR y c149scTCR.

Para generar el gen de fusión c149scTCR/IL15N72D, un fragmento génico c149scTCR (TCR- α , conector, TCR- β y fragmento constante de TCR- β) se amplificó a partir del vector de expresión c149scTCR/hulgG1 con el cebador delantero:

10 5'GACTTCAAGCTTAATTAAGCCACCATGGACAGACTTACTTCTTC3' (SEQ ID N°: 16)

y el cebador trasero:

5'-CTTCCCGTTAACCCACCAGCTCAGCTCCACGTG-3' (SEQ ID N°: 9)

El resto de la región constante de TCR β del vector c149scTCR/hulgG1 se amplificó con el cebador delantero:

5'CTGGTGGGTAAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC3' (SEQ ID N°: 10)

15 y el cebador trasero:

5'CACCCAGTTGTCTGCTCTACCCAGGCCTC3' (SEQ 10 N°: 17)

El gen huIL15N72D se amplificó a partir del vector de expresión c264scTCR/huIL15N72D con el cebador delantero:

5'CTGGGGTAGAGCAGACAACACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTG3' (SEQ ID N°: 18)

y el cebador trasero:

20 5'CCTCATGCATTGCAATCCGGATCATTAGAAGTGTGATGAACATTTGG3' (SEQ ID N°: 19)

Los productos resultantes que contenían la secuencia de la región constante de TCR β y el gen huIL15N72D se usaron como plantillas para generar un fragmento génico mediante PCR usando el cebador delantero:

5'CTGGTGGGTAAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC3' (SEQ 10 N°: 10)

y el cebador trasero:

25 5'CCTCATGCATTGCAATCCGGATCATTAGAAGTGTGATGAACATTTGG3' (SEQ 10 N°: 19)

El producto de PCR c149scTCR se digirió con Pac I y Hpa I y el producto de PCR TCR β c/huIL15N72D se digirió con Hpa I y BstB I. Los fragmentos génicos digeridos se ligaron en un vector de retrovirus pMSGV que contenía promotor de CMV. El vector resultante se denominó c149scTCR/IL15N72D-pMSGVn o pMSGV-c149IL15N72D (Figura 8). Las secuencias del gen y la proteína c149scTCR/huIL15N72D se muestran en la Figura 9 y la Figura 10, respectivamente.

30

Ejemplo 2 - Generación de líneas de células hospedadoras transfectadas que producen proteínas de fusión.

Los vectores de expresión se pueden introducir en una variedad de líneas de células hospedadoras mediante varios métodos de transformación, transfección o transducción diferentes. En uno de tales métodos, células CHO-K1 (5 x 10⁵) se sembraron en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche en una incubadora de CO₂. Las células se transfectaron con 5 μ g de vector de expresión que contenía los genes de fusión c264scTCR/huIL15N72D usando 10 μ l de reactivo Mirus TransIT-LT1 (Mirus) según el protocolo del fabricante. Las células se seleccionaron con 4 mg/ml de G418 (Invitrogen) un día después de la transfección. Las células resistentes a G418 se expandieron y las células que expresaban proteína de fusión TCR/IL15 se subclonaron tres veces mediante la dilución limitativa y se cribaron líneas celulares de producción basándose en el nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo mediante ELISA específico para TCR y huIL15 con un anticuerpo de captura, anticuerpo anti-TCR C β humana (BF1), y un anticuerpo de detección, anticuerpo anti-IL-15 humana biotinilado (BAM 247, R&D Systems) descrito previamente (véase el documento WO2008143794). A continuación, la línea celular que producía c264scTCR/IL15N72D se transdujo con el vector retroviral pseudotipado que contiene el gen de fusión c264scTCR/huIL15R α Sushi-hulgG1 como sigue.

45 Para producir el vector retroviral pseudotipado, se cultivaron 2 x 10⁶ de las células de empaquetamiento 293GP en un plato de 10 cm revestido con polilisina (BD Bioscience) durante 2 días a 37°C en una incubadora de CO₂. A continuación, las células se cotransfectaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 9 μ g del plásmido pMC-c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 y 4 μ g del plásmido pMD-G que codifica la proteína de envuelta VSV-G. El sobrenadante que contenía virus se recogió 48 h después de la transfección y el residuo celular se retiró haciendo

pasar a través de un filtro de poli(fluoruro de vinilideno) de 0,45 µM. El virus se aplicó a las células productoras de c264scTCR/IL15N72D (1 x 10⁵ células/pocillo en una placa de 6 pocillos) en presencia de 10 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Las células se seleccionaron con 10 µg/ml de puromicina y 2 mg/ml de G418 2 días después de la transducción. Las células resistentes a puromicina y G418 se expandieron y las células que expresaban complejo de proteínas de fusión T2 se subclonaron tres veces mediante la dilución limitativa y se cribaron líneas celulares de producción basándose en el nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo usando un ELISA específico para hulG1/hulL15 con un anticuerpo de captura, anticuerpo anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch), y el anticuerpo de detección, anticuerpo anti-IL-15 humana biotinilado (BAM 247, R&D Systems).

Ejemplo 3 - Generación y purificación de proteínas de fusión T2.

Se cultivaron líneas celulares que expresan c264scTCR/hulL15N72D y c264scTCR/hulL15RαSushi/hulG1 bajo condiciones de crecimiento (es decir 25-37°C durante de 5 a 28 días en matraces de cultivo, matraces rotatorios o agitadores a pequeña escala o en biorreactores de fibra hueca, de bolsa mezclada por ondas o de depósito agitado a gran escala o recipientes y reactores de cultivo equivalentes) para producir la molécula T2 como una proteína soluble en el medio de cultivo. Para purificar la molécula T2, se ajustó el pH del medio de cultivo y se cargó en una columna de inmunoafinidad que contenía un anticuerpo anti-TCR (BF1) covalentemente acoplado a Sepharose. La columna se lavó y las moléculas T2 se eluyeron con 0,5 M de citrato Na pH 4,0. La proteína eluida se concentró y el tampón se intercambió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se cargó en una columna de rProtein A-Sepharose. Después de las etapas de lavado, la proteína se eluyó con 0,5 M de citrato Na pH 4,0 y a continuación el tampón se intercambió en PBS. La proteína resultante se caracterizó mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie y cromatografía de exclusión por tamaño.

Bajo condiciones de SDS-PAGE reductoras, la proteína T2 purificada migró como dos bandas de polipéptido correspondientes a los pesos moleculares esperados de los componentes c264scTCR/hulL15N72D y c264scTCR/hulL15Sushi/hulG1 en comparación con las proteínas de fusión c264scTCR/hulG1 y c264scTCR/hulG1ΔCH1 purificadas que migran a bandas simples esperadas de moléculas homodímeras (Figura 11). Bajo condiciones desnaturadoras no reductoras, la banda de c264scTCR/hulL15RαSushi/hulG1 migra a un peso molecular de acuerdo con el polipéptido dímero mientras que la banda de c264scTCR/hulL15N72D está de acuerdo con su forma monómera (Figura 11). Mediante cromatografía de filtración en gel con exclusión por tamaño, la proteína T2 natural se eluía al peso molecular esperado de una molécula tetracatenaria (2 x c264scTCR/IL15N72D, 2 x c264scTCR/hulL15RαSushi/hulG1) (Figura 12). Estos resultados confirman que la molécula T2 exhibe una conformación multicaténaria de acuerdo con las interacciones entre los dominios hulL15N72D y hulL15RαSushi e interacciones covalentes entre la hulG1 según se muestra en la Figura 1.

Métodos de expresión en células de mamífero y purificación por cromatografía de afinidad similares se usaron para general otros complejos de proteína T2 descritos en la presente.

Ejemplo 4 - Caracterización in vitro de las actividades de unión de la molécula T2

Se llevaron a cabo ensayos in vitro para caracterizar las actividades de unión de los dominios de la molécula T2 y comparar estas actividades con las de otras moléculas de fusión. Para caracterizar el dominio IgG1, pocillos de microvaloración se revistieron con anticuerpo anti-IgG1 humana y se aplicaron a los pocillos cantidades molares equivalentes de proteína T2 purificada, compuesta por las cadenas c264scTCR/hulL15N72D y c264scTCR/hulL15Sushi/hulG1, o proteína de fusión c264scTCR/hulG1 purificada. Después de las etapas de unión y lavado, las proteínas unidas se detectaron con anticuerpo anti-IgG1 humana bajo condiciones de ELISA estándar.

Los resultados del ensayo mostrado en la Figura 13 demuestran que el dominio IgG1 de la molécula T2 muestra actividad de unión a anticuerpo equivalente al dominio comparable de la fusión TCR/IgG1, indicando que el dominio IgG1 de T2 retiene una conformación natural. El dominio TCR de la molécula T2 se ensambló de un modo similar. Se capturaron cantidades molares equivalentes de proteínas de T2 o c264scTCR/hulG1 en los pocillos revestidos con Ab anti-IgG1 humana y se detectaron con anticuerpo anti-TCR Cβ humana (W4F).

Según se muestra en la Figura 14, la proteína T2 exhibía una reactividad doble que la proteína c264scTCR/hulG1 para el anticuerpo anti-TCR. Esto se espera dada la composición de la proteína de fusión de TCR tetracatenaria de la molécula T2 en comparación con la composición homodímera de la fusión c264scTCR/hulG1. Se evaluó la actividad de unión a péptido/MHC de los dominios TCR de la molécula T2. Se capturaron cantidades molares equivalentes de T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/hulL15N72D y c264scTCR/hulL15RαSushi/hulG1) o proteínas c264scTCR/hulG1 sobre pocillos revestidos con Ab anti-IgG1 humana y se detectaron con tetrámeros de péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 estreptavidina-HRP. Según se muestra en la Figura 15, la proteína T2 exhibía una actividad de unión 3 veces superior que la proteína c264scTCR/hulG1 para el reactivo de péptido/MHC. Esto era inesperado ya que, basándose en su estructura y reactividad con Ab anti-TCR (véase la Figura 14), se anticipaba que la proteína T2 solo exhibía una actividad de unión a TCR 2 veces superior que c264scTCR/hulG1. Así, la estructura molecular de T2 proporciona una mejor actividad de unión específica de antígeno que la esperada basándose en los componentes individuales. Esta actividad de unión mejorada puede ser el resultado de menos

interferencia estérica, mejores efectos de avidéz, interacciones cooperativas y/o un mejor ajuste de conformación entre el dominio TCR y el antígeno de péptido/MHC.

Ejemplo 5 - Caracterización de la actividad biológica del dominio IL-15 de T2

5 También se evaluó la actividad del dominio IL-15 de la molécula T2. Los pocillos de microvaloración se revistieron con anticuerpo anti-IL-15 humana y se aplicaron a los pocillos cantidades molares equivalentes de proteína T2 purificada, compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15Sushi/hulgG1, o proteína de fusión c264scTCR/huIL15N72D purificada. Después de las etapas de unión y lavado, las proteínas unidas se detectaron con anticuerpo anti-IL-15 humana bajo condiciones de ELISA estándar.

10 Según se muestra en la Figura 16, la proteína T2 exhibía una reactividad incrementada (1,6 veces superior) en comparación con la fusión c264scTCR/huIL15N72D para el Ab anti-IL15, según se espera basándose en la hipótesis de que cada molécula T2 contiene dos dominios IL-15. La actividad biológica del dominio IL-15 de las moléculas T2 se caracterizó adicionalmente en ensayos de proliferación que usan la línea celular 32D β dependiente de citocinas. Para medir la proliferación celular, se incubaron células 32D β (2×10^4 células/pocillo) con concentraciones crecientes de proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15Sushi/hulgG1) o proteína de fusión c264scTCR/huIL15N72D durante 48 h a 37°C. Se añadió el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Applied Science) durante las últimas 4 h de crecimiento celular según los procedimientos del fabricante. La conversión de WST-1 en el colorante formazano coloreado mediante células metabólicamente activas se determinó a través de medidas de absorbancia a 440 nm.

20 Según se muestra en la Figura 17, la proteína T2 exhibe una actividad biológica 3 veces superior que la proteína de fusión c264scTCR/huIL15N72D. Esto era inesperado ya que, basándose en su estructura y reactividad con Ab anti-IL-15 (véase la Figura 16), se anticipaba que la proteína T2 solo exhibía una actividad de IL-15 2 veces superior que c264scTCR/huIL15N72D. Conjuntamente, estos resultados ilustran un número de ventajas para el formato molecular de T2 al proporcionar una actividad de unión a TCR y una actividad biológica de IL-15 incrementadas que no se observaban con estos componentes solos en el contexto de otros formatos de proteína de fusión.

25 La capacidad de la proteína T2 para promover la proliferación de células inmunitarias sensibles a IL-15 se examinó en un modelo en primates. Monos cynomolgus ($n = 2$, 1 m, 1 h) fueron inyectados intravenosamente con proteína T2 purificada (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1) en 0,5 mg/kg. Sangre extraída 5 días más tarde se tiñó con respecto a marcadores de células T con memoria CD8 (CD8 y CD95) y marcadores de células NK (CD56 y CD16) y se comparó con sangre extraída antes del tratamiento. Según se muestra en la Figura 18, el tratamiento con T2 daba como resultado una expansión de células T con memoria CD8⁺ CD95⁺ (A) y células NK efectoras CD56^{dim} CD16⁺ (B). Estos resultados están de acuerdo con que la molécula T2 exponga una potente actividad de IL-15 in vivo.

Ejemplo 6 - Caracterización de la unión y la actividad biológica del dominio Fc de T2

35 The actividad de unión del dominio Fc de IgG1 de la molécula T2 se caracterizó en ensayos de unión celular. Células U937 portadoras de receptor de Fc- γ se incubaron con 33 nM de proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1), c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo) durante 20 min. Las células se lavaron una vez y se incubaron con tetrámero de péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 conjugado a PE durante 20 min. La unión a receptores de Fc y en la superficie de células U937 se analizó con citometría de flujo según se muestra en la Figura 19A. También se llevaron a cabo estudios de unión a U937 similares usando un intervalo de concentraciones de proteína y la intensidad fluorescente media para las células teñidas se representó en la Figura 19B.

40 Los resultados de estos estudios indican que las células U937 se tiñen más eficazmente con las moléculas T2 que las correspondientes proteínas de fusión c264scTCR/hulgG1, verificando la actividad de unión al receptor de Fc de las moléculas T2. Para evaluar la actividad biológica de los dominios Fc, se determinó la capacidad de la molécula T2 para mediar en la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En este estudio, se añadieron proteína T2, c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo) a una placa de 96 pocillos en de 0,137 a 100 nM. Células diana T2 positivas a HLA-A2 se sometieron a impulsos con 10 μ M de péptido p53 aa264-272 y se etiquetaron con 50 μ g/ml de calceína-AM. Las proteínas de fusión se mezclaron con 1×10^4 de la célula diana por pocillo y se añadieron 1×10^6 /pocillo de PBMC humanas recientes. La placa se incubó a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 2 h y 100 μ l del medio condicional se recogieron y se analizaron con respecto a la calceína liberada de células sometidas a lisis. La calceína se cuantificó con un lector de fluorescencia Ex-485 nm, Em-538 nm y Corte-530 nm. La lisis celular específica se calcula con la siguiente fórmula: Lisis Específica = [exp-(fondo-autoliberación)] / [Liberación completa-(fondo-autoliberación)] x 100%. Exp=proteína de fusión+células T2 +PBMC; Fondo=medio solamente; Autoliberación=células T2 solamente; Liberación completa=células T2 + 0,5% de Triton X-100.

55 Los resultados de determinaciones por triplicado por punto de datos se muestran en la Figura 20, donde se caracterizaron dos lotes diferentes de las proteínas T2. Los resultados indican que la proteína T2 era más eficaz para mediar en la actividad similar a ADCC contra células diana que presentan péptido/MHC que la proteína de

fusión TCR-IgG1. La actividad incrementada puede haber sido el resultado de la unión mejorada de las moléculas T2 al complejo péptido/MHC y/o incrementar la reactividad para células efectoras que exponen receptores de Fc o receptores de IL-15.

Ejemplo 7 - Caracterización de complejos péptido/MHC que se unen a moléculas T2 expuestas sobre células

- 5 Para evaluar la actividad de unión de proteína T2 a dianas de péptido/MHC sobre células, células T2 positivas a HLA-A2 se sometieron a impulsos con diversas cantidades de péptido p53 aa264-272. A continuación, las células se incubaron con proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1), c264scTCR/hulgG1 o A2AL9scTCR/IgG1 (control negativo), cada una en 83 nM. Las células se incubaron con Ab anti-TCR biotinilado (BF1) y estreptavidina-PE. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo según se muestra en la Figura 21A. La intensidad fluorescente media para las células teñidas se representó en la Figura 21B.

15 Los resultados muestran que las moléculas T2 exhiben una capacidad mejorada para detectar complejos de péptido p53/HLA-A2 sobre células en comparación con la proteína de fusión c264scTCR/hulgG1. Estos resultados indican que la proteína T2 es capaz de unirse más eficazmente que las fusiones c264scTCR/hulgG1 a antígenos peptídicos asociados a tumores sobre células diana.

20 Se esperan resultados similares usando moléculas T2 que comprenden dominios TCR específicos para otras dianas de péptido/MHC. Por ejemplo, se sabe que diversos péptidos derivados de las proteínas asociadas a tumores humanos; p53, gp100, MART1, MAGE-A3, PSMA, PSA, Her2/neu, hTERT, tirosinasa, survivina, WT1, PR1, NY-ESO1, EGFR, BRAF y otros, se unen a moléculas de HLA y son dianas para respuestas de células T humanas a través de interacciones con TCR. Adicionalmente, se han identificado TCR específicos para complejos de HLA que exponen antígenos virales procedentes de HIV, HCV, HBC, CMV, HTLV, HPV, EBV y otros virus. Estos TCR podrían estar fusionados a las proteínas de IL-15 o huL15R α Sushi y estar caracterizados por reactividad péptido/MHC sobre las células que presentan antígeno cargadas con péptido apropiadas según se describe anteriormente.

Ejemplo 8 - Caracterización de moléculas T2 que portadores de dos dominios TCR diferentes

25 Según se indica anteriormente, es útil tener múltiples dominios de TCR diferentes fusionados a componentes IL-15, IL-15R α e IgG de la molécula T2. Esto permite que se presente una actividad de dirección a una diana del antígeno en una proteína multicaténaria. Para demostrar la viabilidad de este enfoque, vectores de expresión c264scTCR-Sushi-hlgG1-pMSGVc y c149scTCR-huL15N72D-pMSGVn se cotransfectaron en células CHO cultivadas en medio IMDM-10. El sobrenadante de cultivo se recogió después de 6 días de cultivo de los transfectantes a temperatura ambiente. Las moléculas T2 de c149scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 se caracterizaron con ELISA. Las moléculas T2 purificadas de c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huL15N72D se usaron como un control. En un ensayo para evaluar los dominios TCR, los pocillos se revistieron con Ab anti-TCR humano (BF1), la proteína de fusión se añadió y la proteína unida se detectó con Ab anti-TCR humano biotinilado (W4F-BN).

35 Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que los dominios TCR de moléculas T2 compuestas por c149scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 eran detectables por anticuerpos anti-TCR. Para valorar los dominios IgG1 e IL-15 de las proteínas T2, se usa un ELISA comprendido por una captura con Ab caprino anti-IgG humana y una detección con Ab anti-IL-15 humana descrito anteriormente.

40 Según se muestra en la Figura 23, la molécula T2 compuesta por c149scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 era detectable en este formato indicando la interacción entre las cadenas proteínicas que contienen los dominios IgG1 e IL-15N72D. La actividad del dominio c149scTCR también se examinó en un ELISA que usa captura con Ab anti-IgG humana y detección con tetrámeros de péptido p53 (aa 149-157)/HLA-A2 estreptavidina-HRP.

45 Se muestra en la Figura 24 que la molécula T2 compuesta por c149scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 era detectable en este formato indicando que moléculas con un dominio IgG1 también tienen actividad de unión al complejo péptido p53 (aa 149-157)/HLA-A2 a través de interacciones entre las cadenas c149scTCR/huL15N72D y c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1. Ensayos adicionales que consistían en una captura con Ab anti-IgG humana y una detección con los tetrámeros bien péptido p53 (aa 149-157)/HLA-A2 o bien péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 o captura con Ab anti-TCR (BF1) y detección con Ab anti-TCR o Ab anti-IL15 verificaron que cada uno de los dominios estaba conectado funcionalmente en la proteína T2 compuesta por las cadenas c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 y c149scTCR/huL15N72D (Figura 24).

55 También se generaron moléculas T2 en las que estos dos dominios TCR se expresaban en las otras cadenas proteínicas, es decir las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c149scTCR/huL15Sushi/hulgG1. La actividad de Fc y TCR de estas moléculas se evaluó después de la unión a células U937 y la detección con tetrámeros péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 seguido por citometría de flujo.

Según se muestra en la Figura 25, moléculas T2 compuestas por las cadenas c264scTCR/huL15N72D y c149scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 eran capaces de unirse a receptores de Fc y sobre células U937 a través del

dominio Fc y reconocer complejo péptido p53 (aa 264-272)/HLA-A2 a través del dominio c264scTCR. Estos estudios verifican que las moléculas T2 con múltiples dominios TCR funcionales y dominios IL-15 e IL15R α e IgG1 son capaces de formar estructuras como las mostradas en la Figura 1.

Ejemplo 9 - Caracterización de la farmacocinética de proteína T2 en ratones y monos cynomolgus

5 Una importante limitación con las terapias potenciales con IL-15 es la semivida biológica muy corta de la citocina in vivo. Para evaluar las propiedades farmacocinéticas biológicas de las moléculas T2 en un modelo en animales, ratones transgénicos HLA-A2/Kb- (5 ratones/momento) fueron inyectados intravenosamente con proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1) purificada en 135 μ g/ratón. El modelo de ratones transgénicos HLA-A2/Kb- se seleccionó debido a que la presencia del dominio HLA-A2.1, para el que este c264scTCR está restringido, puede influir en la farmacocinética de la proteína y debe dar una visión "humanizada" más pertinente de la farmacocinética que otros modelos no humanos. En este estudio, se recogió sangre a las 0, 1, 4, 8, 24, 48 y 72, 96 horas después de la inyección y los niveles de proteína T2 en el suero se midieron mediante ELISA. Se usaron dos formatos de ELISA diferentes: 1) captura con Ab caprino anti-IgG humana y detección con Ab anti-TCR humano (W4F-BN) o 2) captura con Ab caprino anti-IgG humana y detección con Ab anti-IL-15 humana. Estos ensayos permiten la evaluación de la estabilidad de la proteína intacta y el complejo de proteína multicaténaria.

Según se muestra en la Figura 26A, la molécula T2 tenía una semivida biológica de aproximadamente 9 - 11 horas después de la inyección intravenosa. Esta es considerablemente más larga que la semivida de ~1 hora presentada de IL-15 humana observada en ratones después de inyección IP (Stoklasek TA y cols. 2006. J. Immunol. 177: 6072). Adicionalmente, la molécula T2 alcanzaba concentraciones séricas de acuerdo con la dosis aportada, mientras que muy poco de la dosis administrada de IL-15 se recuperaba en el suero en el estudio presentado previamente (Stoklasek TA y cols. 2006. J. Immunol. 177: 6072). Así, la molécula T2 tiene un perfil farmacocinético significativamente mejor que la IL-15 humana libre. Además, basándose en el perfil farmacocinético similar observado con los dos ELISA, la proteína T2 permanecía intacta como una molécula multicaténaria sin evidencia de escisión.

Para valorar las propiedades farmacocinéticas biológicas de las moléculas T2 en un modelo en primates, monos cynomolgus (n = 2, 1 m, 1 h) fueron inyectados intravenosamente con proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1) purificada en 0,5 mg/kg. En este estudio, se recogió sangre a las 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección y los niveles de proteína T2 en el suero se midieron mediante ELISA. Se usaron tres formatos de ELISA diferentes: 1) captura con Ab anti-TCR humano (β F-1) y detección con Ab caprino anti-IgG humana conjugado a HRP o 2) captura con Ab anti-IL-15 humana y detección con Ab caprino anti-IgG humana conjugado a HRP o 3) captura con Ab anti-IL-15 humana y detección con Ab anti-TCR humano (W4F-BN). Estos ensayos muestran la evaluación de la estabilidad de la proteína intacta y el complejo de proteína multicaténaria.

Según se muestra en la Figura 26B, la molécula T2 tenía una semivida biológica de aproximadamente 4-6 horas después de la inyección intravenosa. Esta es considerablemente más larga que la semivida de ~1 hora presentada de IL-15 observada en monos después de la inyección subcutánea (Villinger, F. y cols. 2004. Vaccine 22: 3510). Así, la molécula T2 parece tener un perfil farmacocinético significativamente mejor que IL-15 libre. Además, basándose en el perfil farmacocinético similar observado con los tres ELISA, estos datos apoyan los datos farmacocinéticos en múnido que sugieren que la proteína T2 permanece intacta como una molécula multicaténaria sin evidencia de escisión.

Ejemplo 10 - Actividad antitumoral de moléculas T2 contra tumores humanos sólidos en un modelo en ratón de tumores xenoinjertados

Para determinar los efectos terapéuticos de la proteína T2, los presentes inventores examinaron la actividad antitumoral en un modelo de crecimiento tumoral primario con la línea celular de melanoma p53+ HLA-A2+ A375 humana en ratones atímicos. Las células tumorales se inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos y se dejó que los tumores crecieran hasta 100 mm³ antes de que comenzara el tratamiento. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados intravenosamente con 32 μ g/dosis (1,6 mg/kg) de proteína T2 compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15Sushi/huIgG1, 32 μ g/dosis (1,6 mg/kg) de c264scTCR/huIL2 o 60 μ g/dosis (3 mg/kg) de 264scTCR/huIgG1. Los ratones fueron tratados un día sí y uno no durante una semana (3 inyecciones) seguido por un período de reposo de 9 días y a continuación un día sí y uno no durante una semana adicional (3 inyecciones). Durante el estudio, se midió el crecimiento tumoral y se representaron los volúmenes de los tumores (Figura 27). Los resultados se compararon con el crecimiento de tumores A375 en ratones tratados solo con PBS.

Según se muestra en la Figura 27, el crecimiento de tumores A375 se inhibió en ratones atímicos tratados bien con molécula T2 o bien con proteínas de fusión TCR-IL2 o TCR-IgG. Estudios previos mostraron que los efectos antitumorales de las proteínas de fusión TCR-IL2 o TCR-IgG específicas para p53 en este modelo eran el resultado de dirigir la actividad del dominio efector a la zona del tumor a través del dominio TCR (Belmont y cols. 2006 Clin. Immunol. 121 :29, Mosquera y cols. 2005 J. Immunol. 174:4781). Para valorar esta posibilidad, proteínas T2 con

dominios TCR no dirigidos a una diana se probaron en el modelo en ratones de xenoinjertados con tumor A375. Una disminución en la eficacia de las moléculas T2 no dirigidas a una diana en comparación con las proteínas T2 específicas de p53 contra el tumor A375 proporcionará una evidencia de que la elección como diana del antígeno tumoral representa un papel en la actividad antitumoral de las moléculas T2.

5 Ejemplo 11- Caracterización de moléculas T2 con mutaciones en los dominios IL-15 y Fc

Según se divulga en el documento WO2008143794, se pueden introducir mutaciones en el dominio IL-15 que incrementen o disminuyan su capacidad para interactuar con las cadenas IL-15R β y afectar a sus actividades biológicas. Por ejemplo, según se indica anteriormente, la sustitución N72D puede incrementar la actividad biológica de IL-15 de 5 a 10 veces. En otros casos, es útil disminuir la actividad de IL-15 para proporcionar una función antagonista. Para examinar los efectos de tales mutaciones en el contexto del formato molecular de T2, se generaron construcciones c264scTCR/huIL15 que contenían sustituciones en las posiciones 8 (es decir, D8N) y 65 (es decir, N65D) del dominio IL-15 y se coexpresaron con la proteína c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1. Los complejos resultantes de variante c264scTCR/huIL15 y cadenas c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 se probaron con respecto a la actividad biológica de IL-15 usando las células 32D β que se describen en el Ejemplo 5. Según se muestra en la Figura 28, las moléculas T2 que comprenden variante D8N y N65D de IL-15 exhibían una disminución significativa en su capacidad para apoyar la proliferación de células 32D β en comparación con las moléculas T2 que comprenden el dominio N72D de IL-15 o las fusiones c264scTCR/huIL15. De acuerdo con los resultados del Ejemplo 5, las moléculas T2 que comprenden el dominio N72D de IL-15 exhibían más actividad de IL-15 que cualquiera de las fusiones c264scTCR/huIL15N72D o c264scTCR/huIL15.

También se introdujeron mutaciones en el dominio Fc de IgG1 que previamente se mostraba que disminuían su capacidad para interactuar con receptor de Fc y o complemento (Hessell, A. J., y cols. 2007. Nature 449: 101-1040). Por ejemplo, la sustitución de residuos de leucina en las posiciones 234 y 235 de la C_H2 de IgG1 (numeración basada en la secuencia de consenso del anticuerpo) (es decir, ... PE **L L G G** ... (SEQ ID N°: 1)) por residuos de alanina (es decir, ...PE **A A G G** ... (SEQ 10 N°: 2)) da como resultado una pérdida de unión al receptor de Fc y mientras que la sustitución del residuo de lisina en la posición 322 de las C_H2 de IgG1 (numeración basada en la secuencia de consenso del anticuerpo) (es decir, ...K C **K S L** ... (SEQ ID N°: 3)) por un residuo de alanina (es decir, ...K C **A S L** ... (SEQ ID N°: 4)) da como resultado una pérdida de activación del complemento (Hessell, A. J., y cols. 2007. Nature 449: 101-1040, incorporada en la presente mediante referencia). Estas sustituciones se introdujeron en la construcción c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 y la proteína resultante se coexpresó con c264scTCR/huIL15N72D o las otras variantes de TCR-IL-15 descritas anteriormente. La capacidad de estos complejos para mediar en la actividad de ADCC de PBMC humanas contra células diana T2 positivas a HLA-A2 cargadas con péptido p53 aa264-272 se evaluó como se describe en el Ejemplo 6. Otras mutaciones que se sabe que alteran la función de Fc se proporcionan, por ejemplo, en Lazar y cols., PNAS, 103 :4005-4010, 2006.

Según se muestra en la Figura 29, el complejo de T2 que comprende las cadenas c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1-LALA y c264scTCR/huIL15N72D no era capaz de mediar en altos niveles de actividad de ADCC de acuerdo con la pérdida de unión a receptor de Fc y exhibida por la variante Fc-LALA. En contraste, los complejos que comprendían las cadenas c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1-KA y c264scTCR/huIL15N72D o las variantes de IL-15 (N65D o D8N) descritas anteriormente exhibían el mismo nivel de actividad de ADCC que el complejo c264scTCR/huIL15Sushi/hulgG1-c264scTCR/huIL15N72D. Sin limitarse por el mecanismo, estos datos también se esperan basándose en la probabilidad de que el dominio IL-15 y el dominio que se une al complemento de Fc no estén implicados en la mediación de la actividad de ADCC.

También se examinaron los efectos de las mutaciones de IL-15 y Fc sobre la capacidad de las moléculas T2 para estimular respuestas de células NK y T humanas. PBMC humanas en 1,8 a 5 x 10⁵ células/ml se incubaron durante 4 días a 37°C en medio que contenía 1 nM de moléculas T2 que comprendían las mutaciones descritas anteriormente o con 10 ng/ml de IL-2 o IL-15 humana recombinante como control.

A continuación, se evaluó la citotoxicidad de células NK usando células K-562 sensibles a NK después del etiquetaje con 50 ug/ml de calceína-AM. Diversas relaciones de PBMC y células K-562 se mezclaron y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 2 h y se recogieron 100 μ l del medio condicional y se analizaron con respecto a la calceína liberada de células sometidas a lisis. La calceína se cuantificó con un lector de fluorescencia a Ex-485 nm, Em-538 nm y Corte-530 nm. La lisis celular específica se calcula con la siguiente fórmula: Lisis específica = [exp-(fondo-autoliberación)] / [Liberación completa-(fondo-autoliberación)] x 100%. Exp = células K-562 + PBMC; Fondo = solamente medio; Autoliberación = solamente células K-562; Liberación completa = células K-562 + 0,5% de Triton X-100.

Como se muestra en la Figura 30, la incubación con la molécula T2 que comprende las cadenas c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huIL15N72D era capaz de estimular la actividad citotóxica de células NK de PBMC humanas en comparación con la observada después de la incubación con medio solo. Además, las moléculas T2 que comprenden las variantes LALA y KA del dominio Fc también eran capaces de estimular la actividad de células NK mientras que las que comprenden sustituciones N65D o D8N en el dominio de IL-15 tendrían poca o ninguna capacidad para estimular la citotoxicidad de células NK. De acuerdo con estos resultados, la incubación de PBMC humanas con moléculas T2 que comprenden las cadenas

c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huL15N72D o aquellas con las variantes LALA y KA del dominio Fc daban como resultado la proliferación de células NK CD56+ mientras que las moléculas T2 que comprenden sustituciones N65D o D8N de IL-15 no proporcionaban tanta actividad proliferativa de células NK (Figura 31). Estos resultados se esperan basándose en la funcionalidad de cada uno de los dominios de IL-15.

5 Para algunas aplicaciones, pueden ser deseables interacciones disminuidas entre las moléculas T2 y los receptores de IL-15 o Fc para reducir la unión no específica a células portadoras de estos receptores. Para examinar esto, moléculas T2 que contenían mutaciones de IL-15 y Fc se evaluaron con respecto al reconocimiento de células diana específicas de TCR usando células T2 cargadas con péptido. La tinción celular con las moléculas T2 o el control positivo de tetrámero de c264scTCR-estreptavidina se realizó sobre células T2 con (T2.265) y sin péptido p53 cargado (T2) usando el método descrito en el Ejemplo 7 (Figura 32A). Basándose en la tinción de células no cargadas, está claro que la molécula T2 que comprende las cadenas c264scTCR/huL15Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huL15N72D muestra una unión a células significativa en comparación con los controles de tetrámero c264scTCR-estreptavidina o anticuerpo BF1. La introducción de las mutaciones LALA en Fc o N65D o D8N en IL-15 reducía esta unión celular indicando que las interacciones con receptores tanto de Fc como de IL-15 representa un papel en la unión al complejo T2. La combinación de las mutaciones LALA de Fc y N65D o D8N de IL-15 reducía adicionalmente la unión al complejo T2 de modo que la molécula que comprende c264scTCR/huL15Sushi/hulgG1-LALA y c264scTCR/huL15D8N no mostraba unión a células T2 no cargadas por encima del control negativo de anticuerpo BF1. También se efectuó la tinción de células cargadas con péptido p53 mediante la introducción de las mutaciones de Fc o IL-15. Sin embargo, cuando se comparaba la intensidad de fluorescencia media de la tinción de moléculas T2 para células cargadas frente a no cargadas con péptido (relación específica a no específica), está claro que la molécula T2 que comprende las cadenas c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1-LALA y c264scTCR/huL15D8N proporcionaba la especificidad de tinción más alta para el antígeno del péptido p53 (Figura 32B). Estos resultados indican que las actividades de unión de cada uno de los dominios TCR, IL-15 e IgG Fc de la molécula T2 se puede manipular fácilmente e independientemente para proporcionar un complejo multiespecífico con la actividad biológica deseada.

En otros casos, es útil modificar la actividad del dominio IL-15 y los dominios Fc de IgG para optimizar el índice terapéutico y minimizar la toxicidad del complejo T2. Por ejemplo, complejos dirigidos a una diana que se basan en parte en la actividad de ADCC para su efecto terapéutico pueden requerir la dosificación a altos niveles (es decir, 1 - 20 mg/kg) que superaban el nivel de dosis tolerable del componente de IL-15. En tal caso, se espera que los complejos que contienen una mutación en el dominio IL-15 que reduce su actividad proporcionen mejor actividad terapéutica y menor toxicidad. Son de particular interés moléculas T2 que contienen sustituciones N65D o D8N en el dominio IL-15 descritas anteriormente u otras sustituciones incluyendo I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P o Q108A, que se ha encontrado que reducen la actividad de IL-15.

Ejemplo 12 - Caracterización de moléculas T2 no dirigidas a una diana

35 En algunas aplicaciones, no es necesario dirigir el complejo T2 a antígenos específicos. En tales moléculas, los dominios específicos del antígeno tales como los dominios que se unen a TCR se pueden inactivar mediante mutaciones o se pueden eliminar completamente. Usando los métodos descritos en la presente, la actividad de tal molécula que comprende las cadenas huL15R α Sushi/hulgG1 y huL15D8N denominada T2M Δ TCR se comparó con la molécula T2 que comprende las cadenas c264scTCR/huL15R α Sushi/hulgG1 y c264scTCR/huL15N72D (denominada T2M) y una molécula T2 que carece de la cadena hulgG1 (c264scTCR/huL15Sushi y c264scTCR/huL15N72D, denominada T2M Δ Ig o dímero de c264scTCR). Cuando se prueba la capacidad para apoyar el crecimiento de células 32D β según se describe en el Ejemplo 5, la T2M Δ TCR exhibía una actividad de IL-15 muy potente (Figura 33A) que era >24 veces la observada con IL-15 humana recombinante.

45 También se examinó la capacidad de la T2M Δ TCR para apoyar el crecimiento de células inmunitarias humanas. PBMC humanas en 1×10^6 células/ml se incubaron con medio en presencia o ausencia de T2M (0,5 nM), T2M Δ TCR (0,5 nM) o T2M Δ Ig (1 nM) durante 7 días. Las células se tiñeron con anti-CD45RO y anti-CD8, o anti-CD8, anti-CD95 y anti-CCR7, o anti-CD56 y anti-CD16, y se analizaron con FACScan. Los resultados promediados de 8 donantes diferentes mostrados en la Figura 33B indican que la T2M Δ TCR y otras moléculas T2 podían estimular eficazmente la expansión de diversos subgrupos de células T con memoria CD8+ y células NK incluyendo células T de memoria efectoras. La actividad como células NK de estas células se examinó usando los métodos descritos en el Ejemplo 11. Resultados representativos de preparaciones de PBMC de 2 donantes mostrados en la Figura 33C indican que la T2M Δ TCR y otras moléculas T2 podían estimular eficazmente la actividad citolítica de células NK. En general, estos resultados indican que la proteína T2M Δ TCR es una potente molécula inmuoestimulante.

Ejemplo 13 - Actividad in vivo de moléculas T2

55 Para caracterizar adicionalmente la actividad inmuoestimulante de las moléculas T2, se probaron T2M, T2M Δ TCR, T2M Δ TCR que carece del dominio CH1 de IgG1 (T2M Δ TCRACH1), T2M con la mutación LALA de Fc (T2MLALA) y T2 con la mutación D8N de IL-15 (T2MD8N) con respecto a su capacidad para inducir la expansión de células NK y T CD8 en ratones C57BL/6. Además, se evaluaron los complejos c264scTCR/huL15N72D, c264scTCR/huL15R α Sushi y c264scTCR/huL15N72D + c264scTCR/huL15R α Sushi.

Los ratones fueron inyectados i.v. el día 1 y 4 con las proteínas de fusión en una cantidad equivalente a una dosis de 2,5 µg de IL-15. El día 8, se recogieron células sanguíneas y esplenocitos, se tiñeron con respecto a las células T CD8 y las células NK y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en la Figura 34 indican que las moléculas T2 son eficaces para expandir células NK y células T CD8 tanto sanguíneas como esplénicas in vivo. T2MLALA mostraba una actividad similar a T2M, sugiriendo que la unión a FcR y la señalización puede no representar un papel significativo en la expansión de células NK y T CD8. El tratamiento con T2MD8N daba como resultado una actividad disminuida cuando se comparaba con T2M, confirmando el hallazgo de que la mutación D8N disminuía la actividad inmunoestimulante de la molécula in vitro usando PBMC humanas. La eliminación de TCR (T2MΔTCR) y las eliminaciones de TCR y CH1 (T2MΔTCRΔCH1) mostraban una actividad disminuida. Estos efectos se pueden haber debido a las semividas más cortas de estas moléculas más pequeñas. Los complejos c264scTCR/huIL15N72D, c264scTCR/huIL15RαSushi y c264scTCR/huIL15N72D + c264scTCR/huIL15RαSushi también mostraban una actividad in vivo reducida con relación a la T2M, verificando los resultados in vitro que indican que la molécula T2 es un compuesto inmunoestimulante más potente.

Ejemplo 14 - Moléculas T2 multiespecíficas

Para caracterizar adicionalmente la capacidad de los dominios de fusión Fc de IL-15 e IL-15Rα/IgG para actuar como andamiaje para múltiples dominios de unión, se creó un complejo de proteínas de fusión (OT1-CD8-T2M) que comprendía un dominio TCR monocatenario (OT1scTCR) específico para péptido OVA aa257-264 restringido con H-2K^b (SIINFEKL (SEQ ID N°: 20)) conectado a huIL15N72D y un dominio CD8α/β monocatenario conectado a la fusión huIL15RαSushi/huIgG1. El dominio CD8α/β monocatenario comprende el dominio extracelular de CD8α murina conectado a través de un conector de péptidos (G₄S)₄ (SEQ ID N°: 21) al dominio extracelular de CD8β murina. Está bien caracterizado que CD8 se une a un sitio en la molécula de MHC distal con la interfase péptido/MHC específica de TCR. Así, se espera que los dominios tanto OTscTCR como scCD8α/β del complejo OT1-CD8-T2M interactúen en diferentes sitios en la molécula de OVA aa257-264/H-2K^b.

Para probar esto, la actividad de unión de OT1-CD8-T2M se comparó con la de la fusión OT1scTCR/huIL15N72D mediante ELISA. Se capturaron cantidades molares iguales de cada proteína sobre un pocillo revestido con mAb anti-Cβ de TCR (H57) y se sondaron con tetrámeros OVA aa257-264/H-2Kb o mAbs para IL15, CD8α, CD8β o Vα2 de TCR. También se realizaron ensayos con pocillos revestidos con anti-Ig humana y se sondaron con anti-Vα2 de TCR.

Según se muestra en la Figura 35A, la proteína OT1-CD8-T2M exhibía reactividad con anticuerpos anti-IL15, CD8α, CD8β, Vα2 de TCR e Ig humana. Había una reactividad aproximadamente 3 veces superior hacia mAb anti-Vα2 de TCR que OT1scTCR/huIL15N72D, como se esperaba basándose en el formato multivalente del complejo de fusión de T2M. Sin embargo, la fusión OT1scTCR/huIL15N72D mostraba poca o ninguna unión a tetrámeros de OVA aa257-264/H-2Kb mientras que la unión era claramente evidente con la proteína OT1-CD8-T2M (Figura 35B). Estos resultados indican que los dominios tanto OTscTCR como scCD8α/β del complejo OT1-CD8-T2M se unen a la molécula de OVA aa257-264/H-2Kb para proporcionar interacciones estables de alta afinidad.

Ejemplo 15 - Dominios IL-15:IL-15Rα como un andamiaje funcional

Preparación de tetrámeros de péptido/MHC clase I (PMHCI) - El gen H-2Kb murino se clonó a partir de ARN total extraído de linfocitos de ratón C57BL/6 según se describe anteriormente. La región extracelular se ligó al vector de expresión de cadena pesada HLA-A*0201 (31) reemplazando la secuencia codificante de HLA-A*0201 (31). Los vectores de expresión β2m, HLA-A*0201 y H-2Kb se transformaron individualmente en E. coli y la expresión de las proteínas recombinantes se indujo según se describe (31), y se expresaron como cuerpos de inclusión insolubles. Las proteínas activas y solubles en el complejo con los péptidos se obtuvieron mediante el método del repliegamiento descrito en http://www.microbiology.emory.edu/altman/jdaWebSite_v3/ptetPrepOverview.shtml. Los reactivos péptido p53 (aa264-272) y (aa149-157)/HLA-A*0201 se denominan A2/p53.264-272 y A2/p53.149-157, respectivamente, y el péptido OVA (aa257-264)/H-2Kb se denomina Kb/OVA.257-264.

ELISA - Se revistieron inmunoplasmas (Maxisorb, Nunc, Rochester, NY) con mAb (BF1) 8A3.31 para capturar proteínas de fusión c264scTCR o con mAb H57-597 para capturar proteínas de fusión OT1scTCR. Después del lavado, las proteínas se detectaron usando diversas sondas según se detalla en la sección de Resultados. A continuación, se añadió el sustrato ABTS (sal diamónica de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) y se midió la absorbancia a 405 nm usando un lector de placas de 96 pocillos (Versamax, Sunnyvale, CA).

Citometría de flujo - Para la caracterización de los complejos de proteínas de fusión c264scTCR, células T2 se sometieron a impulsos con péptido p53 (aa264-272) a 37°C durante 2 h en presencia de mejorador cargado de péptido (PLE, Aitor BioScience Corp., Miramar, FL). Para los complejos de proteínas de fusión OT1scTCR, células EL4 de linfoma murino se sometieron a impulsos con péptido OVA en 100 µg/ml y PLE a 37°C durante 6 h. Las diversas proteínas de fusión de birA (complejadas con SA-PE) se añadieron y se incubaron a 4°C durante 1 h. Las muestras se lavaron dos veces y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan usando el software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para valorar la actividad de unión al dominio de IL-15, células 32D β se incubaron con 320 nM de los complejos de proteínas de fusión c264scTCR durante 30 min. a 4°C. La unión de las proteínas se detectó a su vez con mAb 8A3.31 biotinilado (BF1) durante 15 min. y SA-PE (5 μ g/ml de cada uno) durante 15 min. Las células teñidas se analizaron mediante citometría de flujo como se describe anteriormente.

5 Ensayos de proliferación celular - La proliferación celular se midió como se describe previamente (25). Brevemente, células 32D β (1×10^5 células/pocillo) se incubaron con concentraciones crecientes de proteínas scTCR/hIL-15 o scTCR/hIL-15 en presencia o ausencia de una concentración molar igual de scTCR/hIL-15R α Su durante 48 h a 37°C. Se añadió reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) durante las
10 últimas 4 h de crecimiento celular según los procedimientos del fabricante. La conversión de WST-1 en el colorante formazano coloreado por células metabólicamente activas se determinó a través de medida de absorbancia a 440 nm. La EC₅₀ se determinó con la curva de respuesta a la dosis generada a partir de los datos experimentales mediante ajuste de la curva de pendiente variable por regresión no lineal con el software Prizm4 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

15 Resonancia de plasmones superficiales - Las constantes de afinidad de las proteínas de fusión OT1scTCR para su pMHC1 cognado se determinaron usando la metodología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Complejos pMHC1 biotinilados se inmovilizaron sobre la superficie revestida con estreptavidina de un chip sensor de SA5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) al inyectar proteína en 2 μ g/ml en tampón de HBS (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, 0,005% de tensioactivo P20, pH 7,4) a un caudal de 10 μ l/min. Esto daba como resultado 1.000-1.200 RU de complejos pMHC1
20 inmovilizados.

Las proteínas de fusión OT1scTCR purificadas se diluyeron hasta 1 μ M, 0,5 μ M y 0,25 μ M en HBS. Cada concentración se inyectó una vez (50 μ l) a un caudal de 10 μ l/min. sobre una superficie de pMHC1 recientemente inmovilizado así como sobre una superficie de estreptavidina de control bloqueada con biotina (referencia) y se registraron las curvas de unión. La constante de disociación (K_D) y las velocidades de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calcularon a partir de las curvas de unión corregidas (restadas del valor de referencia) usando el software BIAevaluation 4.1.1 (GE Healthcare Sciences, Piscataway, NJ).
25

Creación de dímeros scTCR usando el andamiaje hIL-15:hIL-15R α - Los presentes inventores han mostrado previamente que se podía crear una proteína de fusión bifuncional biológicamente activa, denominada c264scTCR/hIL-15, al fusionar el extremo N de hIL-15 a un TRC quimérico restringido por HLA-A*0201, de tres dominios, específico para el antígeno del péptido p53 (aa264-272) (c264scTCR) (25) (Fig. 36A). Los presentes inventores construyeron una proteína de fusión similar con c264scTCR y el dominio de unión a Sushi (aa 1-66) de IL-15R α humana (hIL-15R α Su), que se ha observado que contienen los elementos estructurales responsables de la unión a hIL-15. esta proteína de fusión se conectó genéticamente a una etiqueta peptídica birA para permitir la biotinylación y la posterior multimerización en presencia de estreptavidina (32). Esta proteína de fusión se denomina
30 c264scTCR/hIL-15R α Su/birA y su expresión y purificación de células CHO eran similares a las de c264scTCR/hIL-15 (25). Estas proteínas de fusión se producen fácilmente a un nivel de mg por litro de sobrenadantes de cultivo celular (datos no mostrados).
35

Basándose en la alta actividad de unión específica entre los dominios hIL-15 e hIL-15R α Su, los presentes inventores anticiparon que las proteínas de fusión podían formar un complejo heterodímero. Además, el examen de la estructura cristalina del complejo IL-15:IL15R α humano indicaba que los extremos N de las dos proteínas están en extremos opuestos del complejo separados aproximadamente 50 Å (33). De ahí que no se espere que la fusión de los dominios scTCR a estas regiones bloquee la formación del complejo.
40

Se observó una evidencia inicial de unión entre las proteínas de fusión c264scTCR/hIL-15 y c264scTCR/hIL-15R α Su/birA en ELISA que usan la c264scTCR/hIL-15R α Su/birA unida a la placa para capturar proteínas hIL-15 y c264scTCR/hIL-15 (25). Para caracterizar adicionalmente los complejos de proteínas de fusión c264scTCR dímeros (denominados dímero de c264scTCR), se mezclaron cantidades molares iguales de proteínas de fusión c264scTCR/hIL-15 y c264scTCR/hIL-15R α Su/BirA purificadas y se dejó que se asociaran a temperatura ambiente durante más de 10 min. Los complejos y las fusiones proteínicas individuales se evaluaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
45

Según se muestra en la Figura 36B, las principales especies en las preparaciones de proteínas de fusión c264scTCR/hIL-15 y c264scTCR/hIL-15R α Su/BirA purificadas exponían un perfil de SEC de acuerdo con proteínas monómeras (peso molecular (PM) = 115 y 113 kDa, respectivamente) mientras que la mezcla de las dos proteínas daba como resultado un pico principal con un peso molecular correspondiente a un complejo dímero (PM > 192 kDa). Así, la aparición de las especies de mayor peso molecular en las preparaciones del dímero de c264scTCR es una evidencia de que se ha generado el complejo heterodímero.
50
55

El dímero de c264scTCR se comparó con proteína c264scTCR/BirA monómera con respecto a su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A*0201. En cada caso, las proteínas se biotinilaron con biotina ligasa seguido por complejación con SA-PE (32) para generar reactivos de tinción de citometría de flujo multímeros según se describe previamente (32). Cuando se usan para teñir células T2 positivas a HLA-A*0201

sometidas a impulsos con concentraciones variables de péptido p53 (aa264-272), ambos reactivos exhibían una unión específica para el antígeno que se incrementaba de un modo dependiente de la concentración de péptido (Figura 37A). Sin embargo, los reactivos de tinción que comprendían el dímero de c264scTCR teñían hasta tres veces mejor que los homólogos c264scTCR/birA derivados de monómero (Figura 37B). Sin querer limitarse por el mecanismo, estos datos sugieren que la dimerización a través de la interacción IL-15:IL-15R α conserva la actividad funcional de los scTCR e incrementa la afinidad efectiva del complejo de fusión de scTCR a su HLA/péptido cognado a través de una afección incrementada. Se observaron resultados similares cuando la biotilación a través de la etiqueta birA se dirigía al extremo C del scTCR/hIL-15 del complejo (datos no mostrados). Esto demuestra que los extremos C del complejo son accesibles a la conjugación a sondas moleculares de tamaño significativo (el PM de la estreptavidina es aproximadamente 60 kDa) sin interferir con los dominios de dimerización o de unión a antígeno del complejo de proteínas de fusión.

Estos estudios se extendieron para examinar la posibilidad de generar moléculas biespecíficas. Se creó un segundo scTCR (c149scTCR) que reconoce un epítipo restringido por HLA-A*0201 de la proteína p53 humana que se extiende desde los residuos de aminoácido 149 a 157 (24). Este scTCR se fusionó a hIL-15 y la proteína resultante, denominada c149scTCR/hIL-15, se coexpresó en células CHO con la fusión c264scTCR/hIL-15 α Su/birA. El complejo de fusión observado en el sobrenadante del cultivo de células CHO recombinantes se inmovilizó usando un anticuerpo anti-IL-15 y se sondó mediante los tetrámeros péptido p53 (aa264-272) o p53 (aa149-157)/HLA-A*0201. Según se muestra en la Figura 37C, el complejo de proteínas de fusión capturado por anticuerpo anti-IL-15 era capaz de unirse a ambos tetrámeros de HLA cargados con péptido. El resultado demuestra que las moléculas de scTCR individuales retienen la actividad funcional cuando se fusionan al andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su y la ordenación espacial del complejo hIL-15:hIL-15R α Su no interfiere significativamente con el empaquetamiento de los dominios de scTCR que tienen un peso molecular individual de aproximadamente 40 kDa.

Para demostrar la amplia utilidad del andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su para la dimerización de proteínas, los presentes inventores crearon un segundo complejo de fusión de scTCR dímero al aparear dos TCR OT1 monocatenarios, uno fusionado al extremo N de hIL-15 y otro al extremo N de la proteína hIL-15R α Su/birA. OT1 es un TCR bien caracterizado que reconoce un epítipo de proteína OVA que se extiende a través de los residuos de aminoácido 257 a 264 en el contexto de H-2Kb murina (34). Se generó un gen TCR monocatenario OT1 (OT1scTCR) y se fusionó a las construcciones hIL-15 y OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA para la expresión de células CHO recombinantes. Se encontró que las proteínas de fusión OT1scTCR purificadas por afinidad tenían actividad de unión a pMHCI en ELISA usando anticuerpo anti-C β H57 de TCR de ratón como un reactivo de captura y tetrámero H2Kb cargado con péptido OVA (aa257-264) marcado con HRP (Figura 42). Para distinguir la diferencia en la actividad de unión entre el dímero OT1 scTCR y el monómero OT1 scTCR/birA, los presentes inventores efectuaron análisis por citometría de flujo similares a los descritos anteriormente para los dímeros c264scTCR pero con células EL4 positivas a H-2Kb cargadas con péptido OVA (aa257-264).

Según se muestra en la Figura 38, los tetrámeros de SA-PE que comprendían el dímero OT1scTCR en efecto se teñían significativamente mejor que los que comprendían fusiones OT1scTCR/birA monómeras. Los presentes inventores también realizaron ensayos de resonancia de plasmones superficiales para valorar la afinidad de unión del monómero y el dímero de OT1scTCR contra los complejos H2-Kb/birA cargados con péptido OVA (aa257-264) biotilados inmovilizados sobre un chip sensor de estreptavidina. Se estimó que la afinidad de unión aparente (KD) del dímero OT1scTCR a los complejos péptido de OVA/H-2Kb era aproximadamente 30 μ M, mientras que no se observó unión para la proteína de fusión OT1scTCR/birA monómera (Tabla 1). Estos datos confirman que la dimerización a través de la interacción hIL-15:hIL-15R α conserva la actividad biológica de los scTCR e incrementa la afinidad efectiva de la molécula de scTCR a sus complejos de pMHCI cognados a través de una afección incrementada.

Creación de un heterodímero OT1scTCR/scCD8 - Puesto que se ha demostrado previamente que la molécula CD8 representa un papel principal en la interacción entre OT1 TCR y su complejo péptido de OVA/H2-Kb cognado (35-37), el andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su proporciona una oportunidad de valorar si la molécula CD8 mejora la afinidad de unión de OT1 TCR a péptido de OVA/H-2Kb expresado sobre la superficie celular y bajo condiciones libres de células y libres de moléculas de adherencia. Para conseguir esto, los presentes inventores crearon en primer lugar una molécula CD8 murina en formato monocatenario (scCD8) al fusionar los dominios extracelulares de las cadenas α y β de la CD8 murina usando un conector flexible. Este gen de fusión se fusionó a la construcción hIL-15R α Su/birA en un vector de expresión retroviral. A continuación se usó retrovirus recombinante para infectar una línea celular CHO que expresa la proteína de fusión OT1scTCR/hIL-15. El complejo de proteínas de fusión heterodímero se purificó del sobrenadante de las células CHO recombinantes cultivadas usando la cromatografía de afinidad basada en anticuerpo anti-TCR según se describe anteriormente. Esta proteína purificada se sometió a ELISA usando anticuerpo anti-TCR como el reactivo de captura y los mAbs bien contra mCD8 α o bien contra mCD8 β biotilados como sondas.

Según se muestra en la Figura 39A, el complejo de fusión inmovilizado en Ab anti-TCR contiene tanto la CD8 α como la CD8 β y, así, indica la formación de un heterodímero OT1scTCR/scCD8. Los presentes inventores usaron análisis por citometría de flujo para comparar la actividad de unión del heterodímero OT1scTCR/scCD8 con el dímero OT1scTCR para cantidades variables de complejos de péptido de OVA/H-2Kb expuestos sobre la superficie celular. Según se muestra en la Figura 39B, reactivos de tinción de SA-PE que comprenden el heterodímero

OT1scTCR/scCD8 podrían detectar fácilmente complejos de péptido de OVA/H-2Kb sobre células EL4 cargadas con tan poco como 10 ng/ml de péptido de OVA, mientras que se observaba poca o ninguna tinción a esta concentración de péptido cuando se usaban reactivos comparables que comprenden el dímero OT1scTCR. Se observó una tinción superior del heterodímero OT1scTCR/scCD8 de fondo sobre células EL4 que no se sometían a impulsos con péptido, sugiriendo que se estaban produciendo interacciones dependientes del péptido entre el dominio CD8 y las moléculas de MHC sobre la superficie celular. Se han presentado efectos similares para tetrámeros de pMHC1 que se unen a moléculas CD8 expresadas sobre células T (38).

Los resultados para interacciones específicas para péptidos del heterodímero OT1scTCR/scCD8 se confirmaron adicionalmente mediante análisis por resonancia de plasmones superficiales. Se estimó que la afinidad de unión (KD) del heterodímero OT1scTCR/scCD8 a los complejos de péptido de OVA/H-2Kb era 2,6 μ M, que es significativamente superior que los \sim 30 μ M observados para el dímero OT1scTCR (Tabla 1, Figura 43). Ninguna proteína de fusión mostraba unión a los complejos de péptido VSV/H- 2Kb de control.

La diferencia en la actividad de unión a pMHC1 específica es sorprendente dado que se espera que la naturaleza bivalente del dímero OT1scTCR proporcione una afinidad funcional incrementada en este formato de ensayo. Adicionalmente, estudios de unión a SPR similares efectuados con proteínas TCR, CD8 α/β y pMHC1 solubles como componentes independientes mostraban solo interacciones débiles (KD 30-100 μ M) entre la proteína CD8 y los complejos péptido/H-2Kb y no efectos cooperativos evidentes de CD8 sobre interacciones TCR:péptido/H-2Kb (39-41). Tomados conjuntamente, estos datos indican que la adición del dominio CD8 α/β a la fusión OT1scTCR tiene un mayor impacto sobre la unión a pMHC1 que la creación de la molécula OT1scTCR bivalente. Los resultados de los presentes inventores demuestran además que el andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su se podía usar para crear moléculas biespecíficas funcionales con la flexibilidad para alojar interacciones proteína-proteína complejas. Además, los presentes inventores muestran por primera vez que una molécula de CD8 funcional se puede construir como una molécula monocatenaria soluble y demuestran que el dominio scCD8 cuando se compleja con OT1scTCR en una molécula heterodímera mejora interacciones TCR:pMHC1 en condiciones libres de células sin la presencia de otras moléculas de adherencia.

Creación de heterodímeros de TCR α/β funcionales - Según se indica anteriormente, los extremos N de los dominios hIL-15 e hIL-15R α están en extremos distales del complejo provocando preguntas en cuanto a si este andamiaje es adecuado para fusiones a polipéptidos de una proteína multicatenaria. Para determinar si se podía construir un TCR α/β heterodímero biológicamente activo soluble usando el andamiaje de hIL-15 y hIL-15R α Su, los extremos C-terminales de los dominios OT1TCR V α -C α y V β -C β extracelulares se conectaron a los extremos N de las cadenas hIL-15 e hIL-15R α Su/birA, respectivamente. Basándose en las estructuras cristalinas de TCR α/β publicadas, se espera que los aminoácidos C-terminales de C α y C β de TCR de la molécula de OT1TCR α/β apropiadamente plegada estén separados \sim 18 Å (42). Los genes de fusión OT1 TCR α /hIL-15 y OT1 TCR β /hIL-15R α Su/birA se clonaron en dos vectores de expresión separados y se cotransfectaron en células CHO. El complejo de proteínas de fusión secretado se purificó usando cromatografía de afinidad con mAb anti-C β de TCR según se describe anteriormente. Cuando se analizan mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie bajo condiciones reductoras, las bandas de proteína purificadas migraban a 50 kDa, de acuerdo con el PM monómero calculado (40 kDa) de cada una de las dos moléculas de fusión (datos no mostrados).

La proteína purificada se caracterizó adicionalmente en el ELISA funcional (captura con mAb anti-C β de TCR: sonda tetrámero péptido de OVA/H2-Kb). Como se muestra en la Figura 40A, se encontró que la proteína purificada tenía una actividad de unión a pMHC1 equivalente a OT1 TCR en el formato monocatenario. Se observaron resultados similares para fusiones hIL-15:hIL-15R α Su/birA a las cadenas V α -C α y V β -C β del TCR 264 específico para p53 (Fig. 40B). Intentos previos para producir heterodímeros de α/β TCR solubles en células de mamífero han sido en gran parte insatisfactorios (43, 44). Así, los resultados de los presentes inventores sugieren que las cadenas α y β de TCR estaban plegadas apropiadamente a través de la asociación de los dominios hIL-15 e hIL-15R α Su/birA dentro de las células transfectadas. Curiosamente, la fusión al extremo N del andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su es capaz de proporcionar la ordenación espacial suficiente para dominios de unión funcionalmente independientes según se observa con el complejo heterodímero de c264scTCR/c149scTCR mientras que retiene la flexibilidad para permitir el plegamiento de cadenas estrechamente apareadas tales como las cadenas α y β de OT1 TCR y 264 TCR.

Actividad biológica del dominio hIL-15 para los complejos de fusión hIL-15:hIL-15R α Su - La capacidad de unión al receptor de IL-15 (IL-15R $\beta\gamma$ C) del dominio hIL-15:hIL-15R α del dímero de c264scTCR se evaluó mediante análisis por citometría de flujo usando células 32D β que portan las cadenas hIL-15R β y γ C murina (m γ C). Estos estudios se llevaron a cabo usando dímeros c264scTCR que contienen el dominio hIL-15 silvestre, así como dímeros con dominios de muteína de hIL-15 que previamente se muestra que mejoran (N72D) o reducen (D8N) la unión a la cadena hIL-15R β (25). Adicionalmente los presentes inventores han demostrado que estas mutaciones no afectan a la formación del complejo hIL-15:hIL-15R α Su (25). Después de la incubación con los dímeros c264scTCR, las células 32D β se tiñeron con mAb anti-TCR para detectar dímeros de proteínas de fusión unidos a células. Según se muestra en la Figura 41A, las células 32D β se tiñeron positivamente mediante los dímeros c264scTCR que contienen dominios hIL-15 silvestre o hIL-15N72D pero no con los que contienen el dominio hIL-15D8N, indicando que la porción hIL-15:hIL-15R α Su del complejo retiene la actividad de unión a IL-15R $\beta\gamma$ C esperada.

La actividad biológica de hIL-15 de los dímeros de proteínas de fusión también se examinó en ensayos de proliferación celular usando células 32D β . Según se muestra en la Figura 42B, el dominio hIL-15 silvestre en los formatos de fusión monómero (fusiones scTCR/hIL-15) o dímero (scTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su) era capaz de apoyar el crecimiento de células 32D β de un modo dependiente de la concentración, que exhibe una estimulación semimáxima (EC50) a ~300 pM. Los dominios hIL-15N72D o D8N bien incrementaban o bien eliminaban la actividad biológica de las proteínas de fusión, respectivamente, independientemente de si están presentes en las fusiones monómeras o dímeras. Estos resultados están de acuerdo con la actividad funcional observada para la citocina IL-15 no fusionada que soporta las mutaciones N72D o D8N (25). Así, la formación del complejo de proteínas de fusión que contiene dos dominios TCR independientes no cambia significativamente la actividad biológica del dominio IL-15. En contraste, había una pérdida de al menos 3 veces de actividad de IL-15 para el complejo heterodímero OT1TCR α/β (datos no mostrados), sugiriendo que la formación de la estructura de TCR heterodímera inhibe, en algún grado, la capacidad del dominio hIL-15 para interactuar con hIL-15R $\beta\gamma$ C. Adicionalmente, estos resultados indican que el dominio hIL-15 se puede manipular fácilmente para permitir una unión al receptor y una actividad funcional mejoradas o reducidas, proporcionando así flexibilidad para el uso del andamiaje hIL-15:hIL-15R α Su en diferentes aplicaciones.

Ejemplo 16 - Perfil de toxicidad y actividad antitumoral de moléculas T2 en ratones inmunocompetentes

Para determinar los efectos in vivo adicionales de las moléculas T2, T2M que carece del dominio IgG1 CH1 (T2M Δ CH1) y los complejos proteínicos T2M Δ TCMCH1 no dirigidos a una diana, los presentes inventores examinaron la toxicidad y la actividad antitumoral en ratones C57BL inmunocompetentes portadores de tumores. Células tumorales murinas B16 (5 x 10⁵/ratón) o EG7 (1 x 10⁶/ratón) fueron inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6NHsd el día 0 del estudio. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados intravenosamente los días 1, 4, 8 y 11 del estudio con 51 o 25,5 μ g/dosis de proteína T2 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1), 47,7 μ g/dosis de T2M Δ CH1 (compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 CH2-CH3) (equivalente molar a 51 μ g/dosis de proteína T2), 16,6 o 8,3 μ g/dosis de T2M Δ TCMCH1 (compuesta por las cadenas huIL15N72D y huIL15R α Sushi/hulgG1 CH2-CH3) (equivalente molar a 51 y 25,5 μ g/dosis de proteína T2, respectivamente), o 1,2 μ g/dosis de rhIL-15 (equivalente molar a 25,5 μ g/dosis de proteína T2). Durante el estudio, se midieron los pesos de los animales y los volúmenes de los tumores y se representan los resultados (Figuras 44A-B y 45A-B).

El tratamiento con las proteínas T2M, T2M Δ CH1 y T2M Δ TCMCH1 inhibía significativamente el crecimiento de tumores B16 (Figuras 44A) y EG7 (Figuras 45A) en comparación con el observado después del tratamiento con PBS y cada uno de los complejos de proteínas de fusión era más eficaz que rhIL-15 administrada a un nivel molar equivalente. Adicionalmente, había poco o ningún efecto toxicológico del tratamiento con T2M, T2M Δ CH1 y T2M Δ TCMCH1 según se medía por cambios en el peso corporal de los ratones portadores de tumores (Figuras 44B y 45B). Sin querer limitarse por el mecanismo, estos datos están de acuerdo con la actividad inmunoestimulante in vivo de estas moléculas en animales inmunocompetentes (Ejemplo 13).

Ejemplo 17 - Caracterización adicional de la actividad inmunoestimulante y antitumoral de T2M y derivados de la misma

Para caracterizar adicionalmente complejos IL-15:IL-15R α -Fc dirigidos a una diana, se generaron líneas celulares CHO recombinantes que coexpresan las proteínas de fusión c264scTCR/huIL-15 y c264scTCR/huIL15R α /IgG1 Fc. En un caso, el dominio IgG1 humano contenía todo el dominio constante de cadena pesada (CH1-CH2-CH3) y en un segundo caso, se usó el dominio CH2-CH3 (es decir Δ CH1) o el dominio Fc, según se indica anteriormente. La secuencia proteínica del dominio CH2-CH3 o el dominio Fc de IgG1 humana se muestra en la Figura 46. Por simplicidad, en este ejemplo, el complejo de superagonista c264scTCR/huIL15N72D:c264scTCR/huIL15R α /IgG1 CH1-CH2-CH3 resultante se denomina moléculas T2 (T2M) y el complejo superagonista c264scTCR/huIL15N72D:c264scTCR/huIL15Sus/IgG1 CH2-CH3 T2M2 (también anteriormente T2M Δ CH1). La ventaja de estos complejos es que la dimerización a través de los dominios Fc y las interacciones entre los dominios IL-15 e IL-15R α dan moléculas tetrámeras que se dirigen a una diana capaces de unirse a células positivas a IL-15R $\beta\gamma$ y células positivas a receptor de Fc (FcR). Adicionalmente, la actividad de cada uno de estos dominios se puede analizar mediante mutantes que reducen interacciones con los receptores cognados. Después de la expresión soluble por células CHO recombinantes, estos complejos se purificaron hasta homogeneidad mediante cromatografía de afinidad usando mAb anti-TCR CR-Sepharose y Protein A Sepharose. La cromatografía de exclusión por tamaño indicaba que las moléculas migraban en el tamaño esperado para complejos intactos.

De forma similar al análisis descrito anteriormente, los métodos basados en ELISA han confirmado que los dominios scTCR e IL-15 de T2M y T2M2 retienen sus actividades de unión respectivas. Adicionalmente, el dominio IgG1 de T2M y T2M2 retiene la capacidad para unirse a células portadores de receptor de Fc (FcR), permitiendo la detección específica con tetrámeros péptido/HLA con actividad comparable a la de fusiones scTCR-IgG1. T2M y T2M2 eran capaces de mediar en la actividad de ADCC de linfocitos humanos contra células que despliegan el complejo p53 (aa264-272)/HLA-A2 (Figura 47). Estos resultados verifican que T2M y T2M2 retienen las funciones efectoras similares a anticuerpo previamente descritas para las fusiones scTCR-IgG. Estudios con complejos que contienen mutaciones de Fc (LALA) que reducen la actividad de unión a FcR demostraban que se requería un dominio Fc funcional para la actividad de ADCC. T2M y T2M2 también apoyaban el crecimiento de la línea celular 32D β

dependiente de IL-15, aunque T2M2 mostraba aproximadamente ~3 veces menos actividad in vitro que T2M. También se valoró la capacidad de estas moléculas para estimular respuestas inmunitarias en ratones. El tratamiento de ratones C57BL/6 con IL-15 (1 mg/kg) tenía poco o ningún efecto sobre los recuentos de glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés), el peso del bazo o las poblaciones de células NK y T CD8+ en la sangre, mientras que el tratamiento con el complejo IL-15N72D:IL-15R α -IgG CH2-CH3 (en una dosis de IL-15 equivalente molar) daba como resultado esplenomegalia y niveles elevados de células T CD8+ (Figura 48A y B), de acuerdo con los resultados observados previamente para complejos IL-15:IL-15R α -Fc similares. Los complejos tanto T2M como T2M2 estimulaban un incremento en los niveles de WBC, el peso del bazo y las poblaciones de células NK y T CD8+ en sangre, mostrando el complejo T2M2 el efecto inmunoestimulante más potente a una dosis molar equivalente (a pesar de exhibir una actividad de IL-15 inferior sobre células 32D β). Se observaron efectos dependientes del tratamiento similares sobre poblaciones de células NK y T CD8+ en el bazo. Los esplenocitos aislados de ratones tratados con complejo T2M2 e IL-15N72D/IL-15R α -IgG mostraban actividad citolítica contra células YAC sensibles a NK (Figura 48C). Los estudios de respuesta a la dosis indican que estos efectos se observan con un nivel de monodosis tan bajo como 0,4 mg/kg (Figura 49A). El tratamiento de ratones atímicos con T2M2 y IL-15N72D/IL-15R α -IgG muestra un incremento en el porcentaje de células NK en la sangre y el bazo 4 días después del tratamiento hasta niveles casi de referencia 7 días después del tratamiento (Figura 49B). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el complejo T2M2 era capaz de estimular respuestas de células T CD8+ y NK en ratones con una actividad significativamente superior que la de IL-15 y para células NK que la del complejo IL-15N72D/IL-15R α -IgG.

La actividad antitumoral de estos complejos se examinó en el modelo de xenoinjerto de A375 subcutáneo en ratones atímicos. En estudios iniciales, la administración de IL-15 humana recombinante, las proteínas de fusión c264scTCR-IL15 y c264scTCR-IL15N72D o el complejo c264scTCR-IL15N72D/c264scTCR-IL15R α no mostraba efecto sobre xenoinjertos de tumores A375 s.c. en comparación con el tratamiento con PBS o proteína de fusión c264scTCR-IL15R α (Figura 50A). La falta de un efecto de las fusiones TCR-IL15 en este modelo se debe probablemente a la incapacidad de estas proteínas para estimular respuestas de células NK en contraste con los resultados presentados con la fusión c264scTCR-IL2. Según se muestra anteriormente, cuando se probaban complejos T2M en este modelo, exhibían una actividad antitumoral moderada pero estadísticamente significativa de acuerdo con su capacidad para estimular la proliferación de células NK (Figura 50B). Sin embargo, en contraste con el tratamiento con cantidades molares equivalentes de fusión c264scTCR-IL15, el esquema de dosificación de T2M (4 mg/kg un día sí y uno no durante tres semanas) daba como resultado una pérdida de peso significativa y dos de 6 ratones morían después de la última dosis. Las observaciones clínicas incluían inactividad de los ratones, postura encorvada y piel rojiza. Estudios paralelos de complejos de proteína IL-15 en otros modelos confirmaron que la dosificación un día sí y otro no repetida no era bien tolerada y que la dosificación semanal proporcionaba estimulación inmunitaria sin toxicidad excesiva. Un cambio en el régimen de dosificación de un día sí y otro no a un esquema semanal, complejo T2M2, a un nivel de dosis que se mostraba que era eficaz para inducir la proliferación de células NK, exhibía una actividad antitumoral significativamente más potente en comparación con el tratamiento con IL-15 o PBS (Figura 50C). De forma más importante, este régimen de dosificación semanal también era bien tolerado por los ratones atímicos portadores de tumores y ratones inmunocompetentes.

Los perfiles de toxicidad de las fusiones scTCR-IL15 y los complejos T2M se valoró en paralelo con los estudios de actividad in vivo descritos anteriormente. Según se indica anteriormente, un tratamiento de 3 semanas un día sí y otro no con fusiones scTCR-IL15 era bien tolerado por ratones atímicos portadores de tumores pero el tratamiento con T2M (4 mg/kg) daba como resultado mortalidad en >30% de los animales. Esto se evaluó adicionalmente en ratones transgénicos HLA-A*0201/Kb- a los que se administraban 9, 18 o 36 mg/kg de T2M o cantidades equivalentes molares de complejos T2M2 un día sí y otro no durante 1 semana. Una semana después del comienzo del tratamiento, se miraron los efectos dependientes de la dosis y el tiempo sobre el peso corporal y las observaciones clínicas. Los ratones que recibían 36 mg/kg de T2M exhibían una pérdida de 20% en el peso corporal en comparación con una disminución de 12% observada en ratones tratados con cantidades equivalentes de T2M2. No se observó cambio en el peso corporal en ratones tratados con ~9 mg/kg de T2M o T2M2 a lo largo del período de 1 semana. De forma interesante, la toxicidad superior observada con T2M no se correlacionaba con la activación de células inmunitarias incrementada ya que los ratones tratados con T2M2 mostraban niveles de recuentos de WBC y niveles de células NK superiores que los ratones tratados con T2M. Se observaron efectos mínimos sobre el peso corporal de los ratones, el peso del bazo y las células inmunitarias después de una administración i.v. de una sola dosis de 0,4 mg/kg de T2M2. Adicionalmente, estudios preliminares en monos cynomolgus indicaron que una sola dosis i.v. de 0,5 mg/kg de T2M no provocaba ningún efecto toxicológico observado pero era capaz de inducir la expansión de células T con memoria CD8+ y células NK efectoras. Los resultados de estos estudios indican que se pueden generar complejos de fusión de IL-15 dirigidos a una diana que tengan potente actividad inmunoestimulante y anticancerosa y toxicidad y perfiles farmacocinéticos favorables. A través de estos estudios se definió y caracterizó una T2M2 (también denominada T2M Δ CH1 compuesta por las cadenas c264scTCR/huIL15N72D y c264scTCR/huIL15R α Sushi/hulgG1 CH2-CH3) optimizada dirigida a TCR como diana. Las secuencias de ácido nucleico y proteínicas de la construcción c264scTCR/huIL15Sushi/hulgG1 CH2-CH3 se muestran en las Figuras 51 y 52, respectivamente.

Ejemplo 18 - Caracterización de moléculas T2 que comprenden dominios que tienen como diana anticuerpos

Para demostrar la utilidad del andamiaje huLL-15:huLL-15R α Su para crear moléculas adicionales que tienen como diana enfermedades, se elaboraron construcciones conectando el extremo C-terminal de un anticuerpo monocatenario contra CD20 humano al extremo N de las cadenas huLL-15N72D y huLL-15R α Su/hulgG1 CH2-CH3 (Fc). La secuencia del anticuerpo monocatenario contra CD20 humano (scAb anti-CD20) comprende las regiones codificantes de los dominios V de cadena pesada y ligera del anticuerpo rituximab conectadas a través de una secuencia conectora flexible. Las secuencias proteínica y de ácido nucleico de la construcción scAb anti-CD20/huLL-15N72D se muestran en las Figuras 53 y 54, respectivamente. Las secuencias proteínica y de ácido nucleico de la construcción scAb anti-CD-20/huLL-15R α Su/hulgG1 Fc se muestran en las Figuras 55 y 56, respectivamente. Estas secuencias se clonaron en vectores de expresión según se describe anteriormente y los vectores de expresión se transfectoraron en células CHO. La coexpresión de las dos construcciones permitía la formación y la secreción de un complejo scAb anti-CD20/huLL-15N72D:scAb anti-CD20/huLL-15R α Su/hulgG1 Fc soluble (también denominado scAb anti-CD20 T2M) que se purificó del sobrenadante de cultivo de células CHO usando cromatografía de afinidad con proteína A.

De forma similar al análisis descrito anteriormente, los métodos basados en ELISA han confirmado la formación del complejo scAb anti-CD20/huLL-15N72D:scAb anti-CD20/huLL-15R α Su/hulgG1 Fc. Adicionalmente, los ensayos de unión al receptor de IL-15 y de proliferación celular que usan células 32D β según se describe anteriormente indicaban que el complejo exhibía unión a IL-15 y actividad biológica. El complejo scAb anti-CD20 T2M se probó a continuación con respecto a la actividad de unión específica para antígeno contra la línea celular Daudi de linfoma de Burkitt CD20⁺ humano. Las células Daudi se incubaron con scAb anti-CD20 T2M, c264scTCR T2M o PBS. Después de una etapa de lavado, los complejos de proteínas de fusión unidos a células se detectaron con anticuerpo caprino anti-Ig humana conjugado a PE (GAH-Ig-PE) mediante citometría de flujo (Figura 57). El complejo scAb anti-CD20 T2M mostraba una unión significativa a células Daudi que no se observaba con c264scTCR T2M o GAH-Ig-PE, indicando reactividad específica para estas células.

También se efectuaron estudios para determinar si los complejos scAb anti-CD20 T2M eran capaces de destruir células tumorales CD20⁺ a través de un mecanismo basado en ADCC. Células diana Daudi etiquetadas con calceína-AM se mezclaron con PMBC humanas (E:T - 100:1) y diversas concentraciones de scAb anti-CD20 T2M, c264scTCR T2M (control negativo) o mAb anti-CD20 quimérico (control positivo). Después de un período de incubación, se evaluó la lisis de células diana como se describe anteriormente. Como se muestra en la Figura 58, el complejo scAb anti-CD20 T2M era altamente eficaz en la mediación de la actividad de ADCC contra células de linfoma humano CD20⁺. Esto se verificó mediante estudios similares que examinaban diferentes relaciones de células efectoras a diana, donde el complejo scAb anti-CD20 T2M (a 2 nM) mostraba una actividad comparable al mAb anti-CD20 quimérico (Figura 59).

Basándose en estos resultados, se espera que la molécula de scAb anti-CD20 T2M exhiba actividad antitumoral contra células de linfoma humano en modelos de tumor xenoinjertado estándar (véanse, por ejemplo, Rossi y cols. Blood 2009;114:3864; Gillis y cols. Blood. 2005;105:3972; y Xuan y cols. Blood 2010; 115:2864-2871).

Adicionalmente, se podían generar y expresar según se describe en la presente construcciones de T2M que comprendían dominios de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 fusionados individualmente a las cadenas huLL-15N72D y huLL-15R α Su/hulgG1 CH2-CH3 (Fc), respectivamente (o viceversa). Las secuencias de ácido nucleico y proteínica de estas dos construcciones de fusión se muestran en las Figuras 60 - 63. Se espera que los complejos purificados que comprenden estas proteínas de fusión exhiban actividad biológica del dominio Fc y de IL-15, y actividad de unión específica para CD20, según se describe anteriormente. Se espera que estos complejos medien en la actividad de ADCC contra células tumorales CD20⁺ y la actividad antitumoral contra células tumorales CD20⁺ in vivo.

Se podían generar fácilmente construcciones de T2M que comprendieran scAb o dominios de reconocimiento de anticuerpo con secuencias de anticuerpo específicas para otros antígenos CD, citocinas o receptores o ligandos de quimiocinas, receptores o ligandos de factores de crecimiento, moléculas de adherencia celular, MHC/moléculas similares a MHC, receptores de Fc, receptores similares a Toll, receptores de NK, TCR, BCR, receptores o ligandos coestimulantes positivos/negativos, receptores o ligandos de la muerte, antígenos asociados a tumores, antígenos codificados por virus y codificados por bacterias, y específicos de bacterias. De particular interés son T2M con dominios de anticuerpo específicos para epítomos de antígenos de CD3, CD4, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD51, CD52, CD70, CD74, CD80, CD152, CD147, CD221, EGFR, HER-2/neu, HER-1, HER-3, HER-4, CEA, ligando OX40, cMet, factor tisular, nectina-4, PSA, PSMA, EGFL7, FGFR, receptor de IL-6, receptor de IGF-1, GD2, CA-125, EpCam, receptor de muerte 5 MUC1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, Trail R2, receptor de folato, angiopoyetina-2, receptor de integrina α v β 3 y antígenos and HLA-DR. También son de interés dominios de anticuerpo contra antígenos virales procedentes de HIV, HCV, HBC, CMV, HTL V, HPV, EBV, RSV y otros virus, particularmente los que reconocen epítomos de punta de envuelta y/o gp120 y gp41 de HIV. Tales dominios de anticuerpo se pueden generar a partir de secuencias conocidas en la técnica o aisladas de novo a partir de una variedad de fuentes (es decir, hospedadores o células de vertebrado, bibliotecas combinatorias, bibliotecas sintéticas aleatorias, modelado computacional, etc.) conocidas en la especialidad.

Adicionalmente, según se indica anteriormente, es útil incrementar o disminuir la actividad del dominio IL-15 y los dominios IgG Fc para optimizar el índice terapéutico y minimizar la toxicidad de los complejos T2 que tienen anticuerpos como diana. Métodos para modificar la actividad de dominios Fc se describen anteriormente y están bien caracterizados en la especialidad. En tal caso, se espera que los complejos que contienen una mutación en el dominio IL-15 que reduce su actividad proporcionen mejor actividad terapéutica y menor toxicidad. Son de particular interés moléculas T2 que tienen anticuerpos como diana que contienen sustituciones N65D o D8N en el dominio IL-15 descritas anteriormente u otras sustituciones incluyendo I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P o Q108A, que se ha encontrado que reducen la actividad de IL-15.

Ejemplo 19: Coexpresión del gen de fusión IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc en células CHO

Estudios previos han mostrado que la IL-15 recombinante es pobremente expresada por células de mamífero (A. Ward y cols., *Protein Expr Purif* 68 (2009) 42-48). Sin embargo, se ha presentado que la formación del complejo intracelular con IL-15R α evita la degradación de IL-15 en el ER (C. Bergamaschi y cols., *J Biol Chem* 283 (2008) 4189-4199). De ahí que se postuló que se podía producir IL-15 a un nivel superior si se coexpresa con IL-15R α . Se sabe que el fragmento de IL-15R α soluble que contiene el llamado dominio "sushi" (Su) en el extremo N, porta la mayoría de los elementos estructurales responsables de la unión a citocinas. IL-15R α Su soluble (sin su dominio transmembranario) e IL-15 son capaces de formar complejos heterodímeros muy estables en solución (K_d del complejo = 100 pM (G. Bouchaud y cols., *J Mol Biol* 382 (2008) 1-12)) y estos complejos son capaces de modular (es decir bien estimular o bien bloquear) respuestas inmunitarias a través del complejo IL-15R $\beta\gamma$ c (E. Mortier y cols., *J Biol Chem* 281 (2006) 1612-1619; M.P. Rubinstein y cols., *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 9166- 9171; T.A. Stoklasek y cols., *J Immunol* 177 (2006) 6072-6080; G. Bouchaud y cols., *J Mol Biol* 382 (2008) 1-12). Así, un complejo que consiste en IL-15N72D y una proteína de fusión IL-15R α Su/Fc se eligió para la producción (véase la Fig. 64). El dominio IL-15R α Su se fusionó genéticamente a la región IgG1-Fc humana para facilitar su purificación y dimerización a través de enlaces disulfuro intercatenarios. Para coexpresar IL-15N72D y la IL-15R α Su/Fc, se construyeron dos vectores de expresión basados en retrovirus individuales, pMSGV-IL-15R α Su/Fc y pMSGV-IL-15N72D, y se cotransfectaron en células CHO. Las células CHO recombinantes se seleccionaron basándose en los elementos de resistencia a neomicina y puomicina proporcionados por los dos vectores de expresión, y a continuación se generaron líneas celulares productoras individuales usando clonación con dilución limitada. Se identificó un clon que es capaz de producir aproximadamente 100 mg/l de complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc, basándose en ELISA, en un medio definido libre de suero. Este resultado demostró que la IL-15 se podía expresar a altos niveles en células de mamífero si se coexpresa con el dominio IL-15R α Su.

Ejemplo 20: Purificación y caracterización del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc

Cuando IL-15R α Su/Fc e IL-15N72D se coexpresaban y se ensamblaban intracelularmente en células CHO recombinantes, se esperaban cuatro formas diferentes de proteínas en los sobrenadantes de cultivo celular: 1) molécula de IL-15R α Su/Fc dímera completamente ocupada con dos subunidades de IL-15N72D, 2) molécula de IL-15R α Su/Fc dímera parcialmente ocupada con una subunidad IL-15N72D, 3) una pequeña porción de molécula de IL-15R α Su/Fc homodímera libre sin IL-15 unida, y 4) IL-15N72D libre. Puesto que IL-15N72D carece de una región Fc, se usó una purificación por afinidad basada en rProtein A para separar la IL-15N72D libre de todas las proteínas de fusión portadoras de Fc en el sobrenadante de cultivo.

A continuación, se desarrolló un método de cromatografía de intercambio iónico para separar diversas formas del complejo IL-15R α Su/Fc. El punto isoeléctrico (pI) calculado de la molécula dímera IL-15R α Su/Fc es 8,5. Según se esperaba, se encontró posteriormente que esta proteína en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, no se une a resina QSFF. Adicionalmente, el pI calculado de IL-15N72D es 4,5. Por lo tanto, se predijo que la carga global de la IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc parcialmente ocupada (es decir IL-15R α Su/Fc dímera + una molécula de IL-15N72D) y la IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupada (IL-15R α Su/Fc dímera + dos moléculas de IL-15N72D) es diferente. Esto está de acuerdo con el análisis en gel de IEF de las preparaciones purificadas por proteína A, que mostraban dos grupos principales de complejos con pI entre 5,6-6,5 y 6,8-7,5 correspondientes a los pI esperados de los complejos totalmente y parcialmente ocupados, respectivamente (Fig. 65A). La heterogeneidad entre bandas de pI de cada grupo de proteínas se debe posiblemente al grado de glicosilación y variantes con lisina C-terminal en la cadena de IgG1. Así, se emplearon tampones con diferentes intensidades iónicas para eluir separadamente los complejos parcialmente ocupado y totalmente ocupado de la QSFF. Usando 130 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, una fracción de una sola proteína (etapa Q 1) se eluyó de QSFF y se encontró que contenía principalmente el complejo parcialmente ocupado basándose en ELISA que determinan la ocupación fraccionaria de la molécula IL-15R α Su/Fc. En la etapa posterior que usaba 300 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, dos fracciones proteínicas denominadas Q1c y Q2c se eluyeron adicionalmente de la QSFF. Análisis de ELISA realizados sobre estas preparaciones indicaron que la fracción Q1c contenía una mezcla de complejos parcialmente ocupado (10% del total) y totalmente ocupado (90%) mientras que la fracción Q2c contenía solo el complejo totalmente ocupado (datos no mostrados). Estos hallazgos están de acuerdo con el análisis en gel de IEF de las preparaciones de proteína purificada (Fig. 65B). Las proteínas eluidas de la etapa Q 1 tienen amplios pI que varían de 5,6 a 7,5; representando las proteínas de pI 6,8 a 7,5 el complejo parcialmente ocupado. La elución de la fracción Q1c de la etapa Q 2 contenía principalmente proteína con pI que variaban de 5,6 a 6,5 (es decir complejo totalmente ocupado) pero con pequeñas cantidades de proteína contaminante con pI de 5,6 a 7,5. La fracción Q2c solo contenía proteína con pI que variaban de 5,6 a 6,5.

En el análisis por SEC, se encontró que la preparación Q2c IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificada se eluía como una sola molécula con alta pureza (Fig. 66). El peso molecular estimado del homodímero era aproximadamente 114 kDa, que era mayor que el peso molecular de 92 kDa calculado basándose en la secuencia de aminoácidos deducida de las proteínas de fusión IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc. Esto se debe probablemente a la glicosilación de las proteínas producidas por células de mamífero.

En SDS-PAGE reductora (Fig. 65C), se encontró que la preparación de IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificada contenía tres proteínas con pesos moleculares de 40 kDa, 16 kDa y 13 kDa. Sin embargo, después de una digestión con N-Glycosidase F, solo se detectaron dos proteínas, con pesos moleculares de ~37 kDa y 13 kDa (Fig. 65D). Estos pesos moleculares se ajustaban mucho a los pesos moleculares calculados de IL-15R α Su/Fc e IL-15 o IL-15N72D. Esto sugiere que estas dos proteínas se glicosilaron durante la producción en células de mamífero y la IL-15N72D se produjo en dos formas de glicosilación principales con pesos moleculares de 13 kDa y 16 kDa. La abundancia relativa de estas especies de IL-15N72D en las diferentes fracciones de purificación mostradas en la Fig. 65C está de acuerdo con los niveles de ocupación del complejo determinados por ELISA y análisis en gel de IEF.

Las IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc se separaron en SDS-PAGE reductor y las secuencias de aminoácidos del extremo N de estas proteínas se determinaron usando el método de degradación de Edman. Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 15 aminoácidos N-terminales para IL-15R α Su/Fc e IL-15N72D, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos N-terminales determinadas se ajustaban a sus secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones codificantes de los dos genes. Se confirmó que las secuencias de aminoácidos de las dos bandas principales que aparecían en SDS-PAGE reducida a 13 y 16 kDa eran IL-15N72D. Esta confirmación de secuencia proporcionaba de nuevo la evidencia de glicosilación de IL-15N72D en células de mamífero.

Ejemplo 21: Propiedades farmacocinéticas del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc

Se ha presentado previamente que IL-15 y el complejo IL-15:IL-15R α /Fc ensamblado in vitro tenían una semivida sérica de 1 h y 20 h, respectivamente, en ratones cuando estas proteínas se inyectaban intraperitonealmente (T.A. Stoklasek y cols., *J Immunol* 177 (2006) 6072-6080). Para valorar si IL-15 y el complejo IL-15:IL-15 α Su/Fc purificado coexpresado se comportaban de forma similar cuando se administraban intravenosamente, se determinaron sus parámetros farmacocinéticos en ratones CD-1. Se eligió la administración intravenosa debido a que esta es probablemente la vía de administración de fármaco para ser usada para el complejo IL-15:IL-15 α Su/Fc en seres humanos. Ratones hembra fueron inyectados intravenosamente con 1,0 mg/kg de IL-15:IL-15 α Su/Fc o 0,28 mg/kg de IL-15 (una dosis equivalente molar) y se recogió sangre en diversos momentos desde 15 min. hasta 8 h para IL-15 y de 30 min. a 72 h para IL-15N72D:IL-15 α Su/Fc después de la inyección. Se evaluaron las concentraciones séricas de IL-15N72D:IL-15 α Su/Fc usando dos formatos de ELISA, uno (detección de Ab anti-IL-15) que detecta el complejo intacto y el otro (detección de Ab anti-Fc de IgG humana) que detecta solamente la proteína de fusión IL-15 α Su/Fc. Las concentraciones de IL-15 se evaluaron con un ELISA específico de IL-15 estándar.

El ajuste predicho y los datos reales para IL-15:IL-15 α Su/Fc e IL-15 después de inyecciones en embolada intravenosas simples se muestran en la Figura 67. La semivida estimada de IL-15:IL-15 α Su/Fc usando ELISA basados en Ab anti-IL-15 o Ab anti-Fc de IgG humana era aproximadamente 25 o 18 h, respectivamente. Estos resultados indican que la proteína de fusión no se escindía y la IL-15 no se dissociaba significativamente de la molécula IL-15R α Su/Fc in vivo. La depuración (Cl) de IL-15:IL-15 α Su/Fc variaba de 0,059 a 0,051 ml/h y el volumen de distribución en estado estacionario (Vss) variaba de 2,1 a 1,3 ml dependiendo del formato de ensayo. En comparación, IL-15 tenía una semivida de absorción de 0,24 h y una semivida terminal de 0,64 h. La Cl de IL-15 era 49 ml/h y la Vss era 18,4 ml. Estos resultados indican que IL-15:IL-15 α Su/Fc despliega una semivida terminal >24 veces más prolongada y se depura >800 veces más lentamente que IL-15.

Ejemplo 22: Actividades biológicas in vitro e in vivo del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc

La actividad biológica del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc coexpresado y purificado se evaluó usando un ensayo de proliferación de células 32D β dependiente de IL-15. Para este ensayo, también se generó un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc ensamblado in vitro (IVA) (IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc IVA) al mezclar IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc en una relación 1:1 durante 30 min. a 4°C. Según se muestra en la Figura 68, el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc tenía una actividad biológica equivalente a IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc IVA para apoyar el crecimiento de células 32D β . El complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc exhibía una EC₅₀ de 15,61 pM y el IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc IVA exponía una EC₅₀ de 15,83 pM. Esto demuestra que el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc coexpresado se procesa de forma apropiada intracelularmente y retiene la actividad de IL-15 completa después de la purificación. Así, el método presentado aquí representa un enfoque mejor para generar material clínico de calidad cGMP que las estrategias actuales que emplean ensamblaje in vitro producido individualmente y en algunos casos proteínas replegadas.

El complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc e IL-15wt también se compararon con respecto a su capacidad para inducir la expansión de células NK y células T CD8⁺ en ratones C57BL/6. Como se muestra en la Figura 69, IL-15wt no tiene efecto significativo sobre la expansión de células NK y CD8⁺ durante cuatro días después de una sola dosis intravenosa de 0,28 mg/kg. En contraste, el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc promovía significativamente la proliferación de células NK y T CD8⁺ en la sangre y el bazo, lo que conducía a linfocitosis en sangre y

esplenomegalia (Figuras 69 y 70). Estos hallazgos están de acuerdo con informes previos de que los complejos IL-15:IL-15R α incrementaban significativamente las actividades biológicas de IL-15 in vivo (M.P. Rubinstein y cols., Proc Natl Acad Sci USA 103 (2006) 9166-9171; T.A. Stoklasek y cols., J Immunol 177 (2006) 6072-6080; S. Dubois y cols., J Immunol 180 (2008) 2099-2106; M. Epardaud y cols., Cancer Res 68 (2008) 2972-2983; A. Bessard y cols., Mol Cancer Ther 8 (2009) 2736-2745). Esta actividad mejorada del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc es probablemente el resultado de una combinación de la actividad de unión incrementada de la muteína N72D al complejo IL-15R $\beta\gamma$ c (X. Zhu y cols., J Immunol 183 (2009) 3598-3607), la transpresentación optimizada de citocinas por la cadena IL-15R α in vivo (a través de los receptores FcR sobre células dendríticas y macrófagos), la naturaleza dímera del dominio de citocina (avidéz incrementada de unión a IL-15R $\beta\gamma$ c) y su semivida in vivo incrementada en comparación con IL-15 (25 h frente a <40 min).

En suma, los resultados descritos en la presente demuestran que los genes IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc se pueden coexpresar en células CHO recombinantes y un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado se puede purificar mucho a partir de sobrenadantes celulares usando un método de purificación simple aumentable a escala.

Los ejemplos anteriores se llevaron a cabo usando los siguientes materiales y métodos.

15 Construcción de vectores para la expresión de complejos proteínicos

El gen de fusión IL-15R α Su/Fc se construyó mediante amplificación de PCR solapada de plantillas de ADN que codifican el dominio sushi de IL-15R α humano (aa1-66 de IL-15R α humano) y el fragmento Fc de IgG1 humana. La región codificante de péptido de señal IL-15R α Su (R.L. Wong y cols., Protein Eng Des Sel 24 (2011) 373-383) y el fragmento génico de IgG1-Fc humano (L.A. Mosquera y cols., J Immunol 174 (2005) 4381-4388) se amplificaron usando los pares de cebadores:

BA494: 5'-GACTTCAAGCTTAATTAAGCCACCATGGACAGACTTACTTCTTC-3' (SEQ ID N°: 16); BA550R: 5'-GTGAGTTTTGTCAACAAGATTTTCGGCTCTCTAATGCATTTGAGACTGGGGGTTG-3' (SEQ ID N°: 22) y BA550F: 5'-GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCAC-3' (SEQ ID N°: 23); BA393R: 5'-GTAATATTCTAGACGCGTTCATTATTTACCAGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC-3' (SEQ ID N°: 15), respectivamente. El gen de fusión IL-15R α Su/Fc resultante se ligó en un vector de expresión pMSGV-1 resistente a puromicina (M.S. Hughes y cols., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472) para construir el vector de expresión pMSGV-IL-15R α Su/Fc.

La secuencia codificante de IL-15N72D (X. Zhu y cols., J Immunol 183 (2009) 3598-3607) se clonó en un retrovirus vector de expresión de retrovirus modificado pMSGV-1 (M.S. Hughes y cols., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472) que porta el gen de resistencia a neomicina después de una región IRES para construir el vector de expresión pMSGV-IL-15N72D.

Coexpresión del complejo de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc en células CHO

Para coexpresar proteínas de fusión IL-15N72D e IL-15R α Su/Fc (véase la Fig. 64), pMSGV-IL-15R α Su/Fc y pMSGV-IL-15N72D se cotransfectaron en células CHO seguido por selección en medio que contenía 2 mg/ml de G418 (Hyclone, Logan, UT) y 10 μ g/ml de puromicina (Hyclone, Logan, UT). La proteína de fusión IL-15R α Su/Fc también se expresó individualmente en células CHO para el uso en la carga de IL-15 silvestre (IL-15wt) humana recombinante como control. Para la producción de las proteínas de fusión, las células CHO recombinantes se desarrollaron en medio libre de suero (SFM4CHO, Hyclone, Logan, UT) a 37°C. Cuando la densidad de células viables de los cultivos alcanzaba un máximo, la temperatura de incubación se cambió a 30°C para la acumulación del complejo soluble. A continuación, los sobrenadantes de cultivo se recogieron cuando la densidad de células viables de los cultivos alcanzaba aproximadamente 10% de células viables.

Procedimiento de purificación

El medio de cultivo de células CHO recombinantes se centrifugó y se filtró para retirar células y residuos antes de que el sobrenadante se ajustara hasta pH 8,0 con Tris-HCl 1 M, pH 8,0. El complejo de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc soluble se purificó usando un procedimiento en dos etapas basado en afinidad y cromatografía de intercambio iónico.

Puesto que el complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc contiene el dominio IgG1-Fc, se usó una columna rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) como la primera etapa en el procedimiento de purificación. Antes de la carga de la muestra, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, se esterilizó con 5 VC de NaOH 0,1 N durante 1 h y a continuación se equilibró con 7 VC de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. El sobrenadante se cargó en la columna de 11 ml a 2 ml/min., y la columna se lavó a continuación con 8 VC de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, seguido por 7 VC de tampón de lavado (citrate Na 0,1 M, pH 5,0) para retirar proteínas unidas no específicamente. A continuación, la proteína se eluyó con citrate Na 0,2 M, pH 4,0, y el pH de las fracciones de los picos recogidas se ajustó inmediatamente hasta pH 3,5 usando ácido cítrico 0,2 M; la proteína eluida se mantuvo a este pH bajo durante 30 minutos como una etapa de depuración viral estándar. Después de la etapa de mantenimiento a pH bajo, el pH de la preparación eluida se ajustó hasta pH 7,7 al usar Tris-HCl 2 M, pH 8,0. La preparación se concentró y el tampón se intercambió en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, al usar un concentrador centrífugo

Amicon Ultra-15 (corte 30 kDa, Millipore, Billerica, MA) antes de la filtración estéril usando un filtro de 0,22 µm (Corning Life Sciences, Lowell, MA).

La preparación proteínica se aplicó a continuación a una columna de intercambio iónico Q Sepharose Fast Flow (QSFF; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). Una columna de 5 ml se lavó con tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), se esterilizó mediante 5 VC de NaOH 0,1 N durante 1 h y a continuación se equilibró con tampón A. La concentración de proteína en la preparación se ajustó en primer lugar hasta <1 mg/ml con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y a continuación se cargó en la columna QSFF a una velocidad de 1 ml/min. A continuación, la proteína se eluyó de la columna usando un procedimiento en gradiente de tres etapas como sigue: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 130 mM durante cuatro VC como la primera etapa, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM durante cuatro VC para la segunda etapa y Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 1 M durante dos VC como la última etapa. Las fracciones de picos proteínicos se recogieron, se intercambiaron con tampón en PBS (Hyclone, Logan, UT) y se filtraron usando un filtro de 0,22 µm. La concentración de proteína se determinó mediante un espectrofotómetro UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción de $1 A_{280nm} = 0,79 \text{ mg/ml}$. Este coeficiente de extinción se calculó basándose en la secuencia de aminoácidos deducida del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc.

IL-15R α Su/Fc expresado individualmente se purificó usando cromatografía de afinidad con rProtein A como se describe anteriormente para ensamblar el complejo en solución con IL-15N72D o IL-15wt producidas en *E. coli* y replegadas (Zhu, 2009 N° 3315). Estos complejos ensamblados in vitro se usaron como patrones para la evaluación de la actividad biológica y la estimación del grado de ocupación de los sitios de unión a IL-15 en complejos coexpresados.

Análisis por electroforesis en gel y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Las proteínas purificadas se analizaron mediante diferentes tipos de métodos de electroforesis en gel, que incluían NuPAGE 12% Bis-Tris Gel (bajo condiciones reducidas y no reducidas), 4-20% Tris-glycine gel (condición natural) e IEF pH3-10 gel (para la determinación del pI). Todos los suministros eran de Invitrogen (Carlsbad, CA). Los métodos experimentales se realizaron según se describe por el fabricante. Se usó cromatografía en Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare Bio-Sciences) con PBS (Hyclone, Logan, UT) como el tampón de desarrollo para examinar la pureza y para estimar la masa molecular de las proteínas.

Secuencia de aminoácidos N-terminales y análisis de glicosilación

Las bandas proteínicas de interés se separaron en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se tiñeron mediante solución de Ponceau S. La secuenciación de aminoácidos N-terminales se realizó usando el método de degradación de Edman (Molecular Structure Facility, UC Davis, Davis, CA).

Para examinar si el complejo de fusión estaba glicosilado, 50 µg de la proteína altamente purificada después de la cromatografía de intercambio iónico se digirieron con 2 µl de N-Glycosidase F (Calbiochem, La Jolla, CA) en un volumen total de 50 µl en PBS a temperatura ambiente durante 48 h y a continuación se sometieron a electroforesis en gel NuPAGE 12% Bis-Tris gel bajo una condición reducida.

Determinación de la ocupación de IL-15N72D del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificado

IL-15R α Su/Fc purificado se cargó con IL-15wt (producida en *E. coli* y replegada, proporcionada por I. Yovandich, NCI, Fredrick, MD) en diversas relaciones durante 15 h a 4°C. Después de la incubación, el complejo IL-15wt:IL-15R α Su/Fc se purificó usando cromatografía de afinidad con rProtein A como se describe anteriormente. Este complejo purificado se evaluó usando dos formatos de ELISA, uno (captura con anticuerpo anti-Fc de IgG humana y detección con anticuerpo anti-IL-15) que detecta el complejo intacto y el otro (captura con anticuerpo anti-Fc de IgG humana y detección con anticuerpo anti-Fc de IgG humana) que detecta sólo la proteína de fusión IL-15 α Su/Fc. La relación entre los niveles del complejo IL-15wt:IL-15 α Su/Fc intacto y la proteína IL-15R α Su/Fc refleja el grado de ocupación de los sitios de unión a IL-15 del complejo. [Grado de ocupación (%) = el complejo intacto (ng/ml) / IL-15R α Su/Fc (ng/ml) x 100%]. El complejo totalmente ocupado (preasociado de IL-15R α Su/Fc e IL-15wt en una relación 1:3) se usó a continuación como un patrón para cuantificar el grado de ocupación de complejos de proteínas de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc purificados después de la purificación.

Determinación de la actividad biológica de IL-15

Se empleó un ensayo de proliferación celular in vitro que usaba la línea celular 32D β dependiente de IL-15 para determinar las actividades biológicas de IL-15 del complejo purificado y proteínas IL-15wt según se describe previamente (X. Zhu y cols., *J Immunol* 183 (2009) 3598-3607).

Evaluación farmacocinética

El perfil farmacéutico del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc e IL-15wt se evaluó en ratones CD-1 hembra (4 ratones/momento, Harlan, Indianapolis, IN) según se describe previamente para IL-2 (H. J. Belmont y cols., *Clin Immunol* 121 (2006) 29-39). Se valoraron los niveles séricos del complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc con los dos formatos de ELISA descritos anteriormente. Los niveles de IL-15wt se valoraron mediante ELISA usando captura

con anticuerpo anti-IL-15 (MAB647; R&D Systems, Minneapolis, MN) y detección con anticuerpo anti-IL-15 (BAM247; R&D Systems, Minneapolis, MN). Los niveles de IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc de cada formato de ELISA se ajustaron con un modelo de un compartimento usando PK Solution 2.0 (Summit Research Services, Montrose, CO). Los datos procedentes de ratones tratados con IL-15wt se modelaron mejor como un modelo de dos compartimentos.

5

Estimulación de linfocitos

Ratones C57BL/6 (macho, 6 semanas de edad, Harlan, Indianapolis, IN) fueron inyectados intravenosamente con una sola dosis de complejo de fusión IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc en 1 mg/kg o IL-15wt humana en 0,28 mg/kg (dosis equivalente molar), respectivamente, o PBS como un control negativo. Cuatro días después del tratamiento, se recogieron sangre agrupada (5 ratones por grupo) y esplenocitos. Se aislaron PBMC de la sangre usando Histopaque (Sigma, St. Louis, MO).

10

Las PBMC y los esplenocitos se tiñeron a continuación con anticuerpos anti-CD19 etiquetado con PE, anti-CD335 etiquetado con PE (NKp46), anti-CD4 etiquetado con FITC y anti-CD8 etiquetado con FITC (BioLegend, San Diego, CA). Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Bioscience, San Jose, CA). Todos los estudios en animales se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por IACUC de Altor.

15

Los siguientes péptidos se usaron en los estudios presentados en los Ejemplos anteriores.

Proteína	Aminoácidos	Secuencia (SEQ ID N°)
p53	149-157	STPPPGTRV (SEQ ID N°: 24)
p53	264-272	LLGRNSFEV (SEQ ID N°: 25)
OVA	257-264	SIINFEKL (SEQ ID N°: 20)
VSV	52-59	RGYVYQGL (SEQ ID N°: 26)

Las siguientes secuencias conectoras de dominios proteínicos de las proteínas de fusión se usaron en los Ejemplos presentados.

20

Conector	Secuencias conectoras	Proteína de fusión
Conector de TCR monocatenario	TCR V α -DTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSS-ITCR V β (secuencia conectora divulgada como SEQ N°: 27)	c264scTCR/hIL-15, c264scTCR/hIL-15R α Su/birA
	TCR V α -TSGGGGSGGGGSPGGGGSGGGGSSS - TCR V β (secuencia conectora divulgada como SEQ 10 N°: 28)	c149scTCR/hIL15N72D
	TCR V α -DTSGGGGSGGGASGGGGSGGGGSSS -TCR V β (secuencia conectora divulgada como SEQ 10 N°: 29)	OT1scTCR/birA

Conector	Secuencias conectoras	Proteína de fusión
	TCRV α - SGGGGSGGGASGGGGSGGGGS - TCR V β (secuencia conectora divulgada como SEQ ID N $^{\circ}$: 30)	OT1scTCR/hIL-15D8N, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA *
Bisagra de IgG1 humana mutada	dominio TCR - VNEPKSSDKTHTSPSPTR-hIL-15R α Su (secuencia conectora divulgada como SEQ 10 N $^{\circ}$: 31)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA, 264TCR β /hIL-15R α Su/birA,
	dominio TCR - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL15 (secuencia conectora divulgada como SEQ 10 N $^{\circ}$: 31)	264TCR α /hIL-15D8N, OT1CR α /hIL-15, OT1scTCR/hIL-15D8N *
Conector BirA	h1L-15R α Su - SGGGSGGGGSID - etiqueta birA (secuencia conectora divulgada como SEQ 10 N $^{\circ}$: 32)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA
Conector de CD8 monocatenario	CD8 α - SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS- CD8 β (secuencia conectora divulgada como SEQ ID N $^{\circ}$: 33) .	scCD8 $\alpha\beta$ /hIL-15R α Su/birA

* de referencia

Referencias

1. Kouzarides, T. y Ziff, E. (1988) Nature 336, 646-651
2. Kouzarides, T. y Ziff, E. (1989) Nature 340, 568-571
- 5 3. Kouzarides, T. y Ziff, E. (1989) Cancer Cells 1, 71-76
4. Rieker, J. D. y Hu, J. C. (2000) Methods Enzymol 328, 282-296
5. Busch, R., Pashine, A., Garcia, K. C. y Mellins, E. D. (2002) J Immunol Methods 263, 111-121
6. Stern, L. J. y Wiley, D. C. (1992) Cell 68, 465-477
7. Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E. y Zaller, D. M. (1995) Nature 375, 802-
10 806
8. de Kruijff, J. y Logtenberg, T. (1996) Journal of Biological Chemistry 271, 7630-7634
9. Kostelny, S., Cole, M. y Tso, J. (1992) J Immunol 148, 1547-1553
10. Holliger, P. y Hudson, P. J. (2005) Nat Biotechnol 23, 1126-1136
11. Hayden-Ledbetter, M. S., Cerveny, C. G., Espling, E., Brady, W. A., Grosmaire, L. S., Tan, P., Bader, R., Slater,
15 S., Nilsson, C. A., Barone, D. S., Simon, A., Bradley, C., Thompson, P. A., Wahl, A. F. y Ledbetter, J. A. (2009)
Clinical Cancer Research 15, 2739-2746

12. Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U. y Pluckthun, A. (2006) *J Biol Chem* 281, 35186-35201
13. Cuesta, A. M., Sanchez-Martin, D., Sanz, L., Bonet, J., Compte, M., Kremer, L., Blanco, F. J., Oliva, B. y Alvarez-Vallina, L. (2009) *PLoS One* 4, e5381
- 5 14. Mohler, K., Torrance, D., Smith, C., Goodwin, R., Stremmler, K., Fung, V., Madani, H. y Widmer, M. (1993) *J Immunol* 151, 1548-1561
15. Feldmann, M. (2002) *Nat Rev Immunol* 2, 364-371
16. Weiner, L. M. (2007) *Nat Rev Cancer* 7, 701-706
17. Baeuerle, P. A., Kufer, P. y Bargou, R. (2009) *Curr Opin Mol Ther* 11, 22-30
- 10 18. Shen, J., Vil, M. D., Jimenez, X., Iacolina, M., Zhang, H. y Zhu, Z. (2006) *J Biol Chem* 281, 10706-10714
19. Lu, D. y Zhu, Z. (2009) *Methods Mol Biol* 525, 377-404, xiv
20. Jackman, J., Chen, Y., Huang, A., Moffat, B., Scheer, J. M., Leong, S. R., Lee, W. P., Zhang, J., Sharma, N., Lu, Y., Iyer, S., Shields, R. L., Chiang, N., Bauer, M. C., Wadley, D., Roose-Girma, M., Vandlen, R., Yansura, D. G., Wu, Y. y Wu, L. C. (2010) *J Biol Chem* (In Press)
- 15 21. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, L., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A. y Jacques, Y. (2006) *J Biol Chem* 281, 1612-1619
22. Waldmann, T. A. (2006) *Nat Rev Immunol* 6, 595-601
23. Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., Alicea, C., Zhang, G. M., Patel, V., Fclber, B. K. y Pavlakis, G. N. (2008) *J Biol Chem* 283, 4189-4199
- 20 24. Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J. y Sherman, L. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11993-11997.
25. Zhu, X., Marcus, W. D., Xu, W., Lee, H. I., Han, K., Egan, J. O., Yovandich, J. L., Rhode, P. R. y Wong, H. C. (2009) *J Immunol* 183, 3598-3607
26. Deer, J. R. y Allison, D. S. (2004) *Biotechnol Prog* 20, 880-889
- 25 27. Zhao, Y., Bennett, A. D., Zheng, Z., Wang, Q. J., Robbins, P. F., Yu, L. Y. L., Li, Y., Molloy, P. E., Dunn, S. M., Jakobsen, B. K., Rosenberg, S. A. y Morgan, R. A. (2007) *J Immunol* 179, 5845-5854
28. Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Card, K. F., Lee, H. L., Han, K. P., Wen, J., Tang, S., Zhu, X., Merrill, J., Chavillaz, P. A., Wong, J. L., Rhode, P. R. y Wong, H. C. (2006) *Clin Immunol* 121, 29-39
29. Yang, S., Rosenberg, S. A. y Morgan, R. A. (2008) *J Immunother* 31, 830-839
- 30 30. Card, K. F., Price-Schiavi, S. A., Liu, B., Thomson, E., Nieves, E., Belmont, H., Builes, J., Jiao, J. A., Hernandez, J., Weidanz, J., Sherman, L., Francis, J. L., Amirkhosravi, A. y Wong, H. C. (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53, 345-357
31. Garboczi, D. N., Hung, D. T. y Wiley, D. C. (1992) *PNAS* 89, 3429-3433
- 35 32. Zhu, X., Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Lee, H. I., Fernandez, M., Wong, R. L., Builes, J., Rhode, P. R. y Wong, H. C. (2006) *J Immunol* 176, 3223-3232
33. Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis, S. J. y Ikemizu, S. (2007) *Nat Immunol* 8, 1001-1007
34. Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. y Carbone, F. R. (1994) *Cell* 76, 17-27
35. Daniels, M. A. y Jameson, S. C. (2000) *J Exp Med* 191, 335-346.
- 40 36. Nugent, C. T., Renteria, R. O., Kuus-Reichel, K. y Kumar, A. (2005) *Immunol Lett* 98,208-215
37. Schott, E. y Ploegh, H. L. (2002) *Eur J Immunol* 32, 3425-3434
38. Neveu, B., Echasserieau, K., Hill, T., Kuus-Reichel, K., Houssaint, E., Bonneville, M. y Saulquin, X. (2006) *Int. Immunol.* 18, 1139-1145

39. Kern, P., Hussey, R. E., Spoerl, R., Reinherz, E. L. y Chang, H.-C. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 27237-27243
40. Arcaro, A., Gregoire, C., Bakker, T. R., Baldi, L., Jordan, M., Goffin, L., Boucheron, N., Wurm, F., van der Merwe, P. A., Malissen, B. y Luescher, I. F. (2001) *J Exp Med* 194, 1485-1495
- 5 41. Wang, R., Natarajan, K. y Margulies, D. H. (2009) *J Immunol* 183, 2554-2564
42. Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E. y Wiley, D. C. (1996) *Nature* 384, 134-141
43. Lin, A., Devaux, B., Green, A., Sagerstrom, C., Elliott, J. y Davis, M. (1990) *Science* 249, 677-679
44. Traunecker, A., Dolder, B., Oliveri, F. y Karjalainen, K. (1989) *Immunol Today* 10, 29-32
- 10 45. Laugel, B., van den Berg, H. A., Gostick, E., Cole, D. K., Wooldridge, L., Boulter, J., Milicic, A., Price, D. A. y Sewell, A. K. (2007) *J Biol Chem* 282, 23799-23810
46. Wooldridge, L., van den Berg, H. A., Glick, M., Gostick, E., Laugel, B., Hutchinson, S. L., Milicic, A., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Price, D. A. y Sewell, A. K. (2005) *J Biol Chem* 280, 27491-27501
47. Gakamsky, D. M., Luescher, I. F., Pramanik, A., Kopito, R. B., Lemonnier, F., Vogel, H., Rigler, R. y Pecht, I. (2005) *Biophys J* 89, 2121-2133
- 15 48. Cole, D. K., Dunn, S. M., Sami, M., Boulter, J. M., Jakobsen, B. K. y Sewell, A. K. (2008) *Mol Immunol* 45, 2700-2709
49. Alam, S. M., Davies, G. M., Lin, C. M., Zal, T., Nasholds, W., Jameson, S. C., Hogquist, K. A., Gascoigne, N. R. y Travers, P. J. (1999) *Immunity* 10, 227-237
50. Cheever, M. A. (2008) *Immunol Rev* 222, 357-368
- 20 51. Ferrari-Lacraz, S., Zanelli, E., Neuberg, M., Donskoy, E., Kim, Y. S., Zheng, X. X., Hancock, W. W., Maslinski, W., Li, X. C., Strom, T. B. y Moll, T. (2004) *J Immunol* 173, 5818-5826
52. Zheng, X. X., Gao, W., Donskoy, E., Neuberg, M., Ruediger, M., Strom, T. B. y Moll, T. (2006) in *Transplantation* Vol. 81, pp. 109-116
- 25 53. Ferrari-Lacraz, S., Zheng, X. X., Fueyo, A. S., Maslinski, W., Moll, T. y Strom, T. B. (2006) *Transplantation* 82, 1510-1517

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION

<120> MOLÉCULAS DE FUSIÓN SOLUBLES MULTÍMERAS DE IL-15 Y MÉTODOS PARA ELABORAR Y USAR LAS MISMAS

<130> 25438EP

<140> EP 11 827 439.8

<141> 2011-09-21

<150> US 61/527,911

<151> 2011-08-26

<150> US 61/384,817

<151> 2010-09-21

<160> 51

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Pro Glu Leu Leu Gly Gly
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Glu Ala Ala Gly Gly
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Cys Lys Ser Leu
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Cys Ala Ser Leu
1 5

<210> 5

<211> 10
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 5
 Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 6
 tgttggaat tcatcacgtg ccctc

25

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 7
 tggtgtgaat tctctaatgc atttgagact gg

32

<210> 8
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 8
 gtacgactta attaactcga gccacatgg agacagacac actcctgtta tgg

53

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 9
 cttcccgta acccaccagc tcagctccac gtg 33

<210> 10
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 10
 ctggtgggtt aacgggaagg aggtgcacag tggggtc 37

<210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 11
 gagggcacgt gatgtctgct ctaccccagg cctc 34

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400>
 gtagagcaga catcacgtgc cctccccca tg 32

<210> 13
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 13
 ccttggtgct agctctaata catttgagac tgggggtgt cc 42

<210> 14
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

 <400> 14
 ccagtctcaa atgtattaga gctagcacca agggcccacg ggtc 44

<210> 15
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

 <400> 15
 gtaatattct agacgcgttc attatttacc aggagacagg gagaggctct tc 52

<210> 16
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

 <400> 16
 gacttcaagc ttaattaagc caccatggac agacttactt ctcc 44

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

 <400> 17
 caccagttg tctgctctac cccaggctc 30

<210> 18
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 18

ctggggtaga gcagacaact gggatgaatgt aataagtgat ttg

43

<210> 19

<211> 49

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 19

cctcatgcat togaatccgg atcattaaga agtgttgatg aacatttgg

49

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 20

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1

5

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 22

<211> 53

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 22

gtgagttttg tcacaagatt tcggctctct aatgcatttg agactggggg ttg

53

<210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 23
 gagccgaaat cttgtgacaa aactcac

27

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> **Virus de la estomatitis vesicular**

<400> 26
 Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
 1 5

<210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27
 Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
 20 25

<210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 28
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
 20 25

<210> 29
 <211> 25
 <212> **Secuencia Artificial**

<220> **fuelle**
 <221> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29
 Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> **fuelle**
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 31
 Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
 1 5 10 15

Pro Thr Arg

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 32
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Asp
 1 5 10

<210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 33
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 34
 <211> 2397
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 34
 atggacagac ttacttcttc attcctgctc ctgattgtcc ctgcgtacgt cttgtcccag 60
 tcagtgcagc agcccgatgc tcgctcact gtctctgaag ggcctctct gcagctgaga 120

ES 2 579 077 T3

tgcaagtatt cctactctgg gacaccttat ctgttctggt atgtccagta cccgcggcag	180
gggctgcagc tgctcctcaa gtactattca ggagaccagc tggttcaagg agtgaatggc	240
ttcgaggctg agttcagcaa gagtaactct tccttccacc tgcggaaagc ctctgtgcac	300
tggagcgact ctgtctgtga cttctgtggt ttgagcgagg atagcaacta tcagttgatc	360
tggggctctg ggaccaagct aattataaag ccagacacta gtggtggcgg tggcagcggc	420
ggtggtggtt ccggtggcgg cggttctggc ggtggcgggt cctcgagcaa ttcaaaagtc	480
attcagactc caagatatct ggtgaaaggg caaggacaaa aagcaaagat gaggtgtatc	540
cctgaaaagg gacatccagt tgtattctgg tatcaacaaa ataagaacaa tgagtttaaa	600
tttttgatta actttcagaa tcaagaagtt cttcagcaaa tagacatgac tgaaaaacga	660
ttctctgctg agtgtccttc aaactcacct tgcagcctag aaattcagtc ctctgaggca	720
ggagactcag cactgtacct ctgtgccagc agtctgtcag ggggcggcac agaagttttc	780
tttggtaaag gaaccaggct cacagttgta gaggacctga acaaggtggt cccacccgag	840
gtcgtctgtg ttgagccatc agaagcagag atctcccaca cccaaaaggc cacactggtg	900
tgcttgcca caggcttctt ccctgaccac gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag	960
gaggtgcaca gtggggtcag cacggaccgc cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat	1020
gactccagat actgcctgag cagccgcctg aggtctcgg ccaccttctg gcagaacccc	1080
cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc tacgggctct cggagaatga cgagtggacc	1140
caggataggg ccaaaccogt caccagatc gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac	1200
gaattcatca cgtgccctcc ccccatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc	1260
tacagcttgt actccaggga goggtacatt tghtaactctg gtttcaagcg taaagccggc	1320
acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgcca ctggacaacc	1380
cccagtctca aatgcattag agaattogcc tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg	1440
gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcgccc tgggctgcct ggtcaaggac	1500
tacttccccg aaccggtgac ggtgtogtgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac	1560
acettccccg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg	1620
ccctccagca gcttggggac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac	1680
accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg	1740
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag	1800
gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac	1860
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa	1920
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc	1980
ctgcaccagg actggtgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagcctc	2040

ES 2 579 077 T3

ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 2100
 tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 2160
 gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 2220
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 2280
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2340
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaa 2397

<210> 35
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35
 Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val Ser
 20 25 30
 Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly Thr
 35 40 45
 Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln Leu
 50 55 60
 Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg Lys
 85 90 95
 Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu Ser
 100 105 110
 Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu Ile
 115 120 125
 Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys Val
 145 150 155 160

ES 2 579 077 T3

Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys
 165 170 175

Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln
 180 185 190

Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln
 195 200 205

Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu
 210 215 220

Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu Ala
 225 230 235 240

Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly
 245 250 255

Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp
 260 265 270

Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu
 275 280 285

Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr
 290 295 300

Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln
 325 330 335

Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val
 340 345 350

Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val
 355 360 365

Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala
 370 375 380

Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 385 390 395 400

Glu Phe Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile

ES 2 579 077 T3

				405					410					415			
Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn		
			420					425					430				
Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val		
		435					440					445					
Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys		
	450					455					460						
Cys	Ile	Arg	Glu	Phe	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		
465					470					475					480		
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys		
				485					490					495			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
			500					505					510				
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		
		515					520					525					
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
	530					535					540						
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
545					550					555					560		
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
				565					570					575			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
			580					585					590				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
		595					600					605					
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
	610					615					620						
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
625					630					635					640		
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
				645					650					655			

ES 2 579 077 T3

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
660 665 670

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
675 680 685

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
690 695 700

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
705 710 715 720

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
725 730 735

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
740 745 750

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
755 760 765

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
770 775 780

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
785 790 795

<210> 36

<211> 2391

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 36

```

atggagacag acacactoct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccaccggt      60
cagtcagtga cgcagccoga tgctcgcgtc actgtctctg aaggagcctc tctgcagctg      120
agatgcaagt attcctactc tgggacacct tatctgttct ggtatgtcca gtaccgcggg      180
caggggctgc agctgctoct caagtactat tcaggagacc cagtgggtca aggagtgaat      240
ggcttcgagg ctgagttcag caagagtaac tcttccttcc acctgcggaa agcctctgtg      300
cactggagcg actctgctgt gtacttctgt gttttgagcg aggatagcaa ctatcagttg      360
atctggggct ctgggaccaa gctaattata aagccagaca ctagtgtggg cgggtggcagc      420
ggcggtggtg gttccgggtg cggcggttct ggcggtgggc gttcctcgag caattcaaaa      480
    
```

ES 2 579 077 T3

gtcattcaga ctccaagata tctggtgaaa gggcaaggac aaaaagcaaa gatgaggtgt 540
 atccctgaaa agggacatcc agttgtatcc tggatcaaac aaaataagaa caatgagttt 600
 aaatTTTTga ttaactttca gaatcaagaa gttcttcagc aaatagacat gactgaaaaa 660
 cgattctctg ctgagtgtcc ttcaaactca cettgcagcc tagaaattca gtcctctgag 720
 gcaggagact cagcactgta cctctgtgcc agcagtctgt cagggggcgg cacagaagtt 780
 ttctttggta aaggaaccag gtcacagtt gttagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc 840
 gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 900
 gtgtgcctgg ccacaggctt cttccctgac cacgtggagc tgagctggtg ggtaacggg 960
 aaggaggtgc acagtggggt cagcacggac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgcctc 1020
 aatgactcca gatactgctt gagcagccgc ctgagggctt cggccacctt ctggcagaac 1080
 ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg 1140
 acccaggata gggccaaacc cgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 1200
 gacatcacgt gccctcccc catgtccgtg gaacacgcag acatctgggt caagagctac 1260
 agcttgact ccagggagcg gtacatttgt aactctggtt tcaagcgtaa agccggcacg 1320
 tccagcctga cggagtgcgt gttgaacaag gccacgaatg tcgcccactg gacaaccccc 1380
 agtctcaaat gtattagagc tagcaccaag ggcccatdgg tcttccccct ggcaccctcc 1440
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 1500
 gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc gccctgacca gggcgctgca caccttcccg 1560
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 1620
 agcttgggca cccagacctt catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 1680
 gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgccacc gtgcccagca 1740
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 1800
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 1860
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 1920
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctt cctgcaccag 1980
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 2040
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 2100
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 2160
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 2220
 aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 2280
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2340
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaata a 2391

<210> 37
 <211> 796
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

 <400> 37
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

 Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20 25 30

 Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35 40 45

 Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50 55 60

 Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65 70 75 80

 Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85 90 95

 Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 100 105 110

 Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

 Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145 150 155 160

 Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 165 170 175

 Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180 185 190

 Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195 200 205

Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210 215 220
 Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225 230 235 240
 Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 260 265 270
 Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275 280 285
 Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290 295 300
 Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 325 330 335
 Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 340 345 350
 Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365
 Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380
 Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400
 Asp Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp
 405 410 415
 Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser
 420 425 430
 Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu
 435 440 445
 Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys

ES 2 579 077 T3

450						455										460
Ile	Arg	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
465					470					475					480	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	
				485					490					495		
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
			500					505					510			
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
		515					520					525				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
	530					535					540					
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	
545					550					555					560	
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
				565					570					575		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
			580					585					590			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
		595					600					605				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
	610					615					620					
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
625					630					635					640	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
				645					650					655		
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
			660					665					670			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
		675					680					685				
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
	690					695					700					

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
705 710 715 720

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
725 730 735

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
740 745 750

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
755 760 765

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
770 775 780

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
785 790 795

<210> 38

<211> 1539

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 38

atggacagac ttacttcttc attcctgctc ctgattgtcc ctgcgtacgt cttggcccag	60
aagtaaacac agactcagac ttcaatttct gtgatggaga agacaacggt gacaatggac	120
tgtgtgtatg aaaccggga cagttcttac ttcttattct ggtacaagca aacagcaagt	180
ggggaaatag ttttccttat tctcaggac tcttcaaaa aggaaaatgc aacagaaggt	240
cattattctc tgaactttca gaagcaaaa agtccatcg gactcatcat cactgccaca	300
cagattgagg actcagcagt atatttttgt gctatgagag acacaaatgc ttacaaagtc	360
atctttggaa aaggacaca tcttcatggt ctgcctacta gtggtggcgg tggcagcggc	420
ggtggtggtt ccctggtgg cggcggttct ggcggtggcg gttcctcgag cgaggctgca	480
gtcaccctaaa gtccaagaag caagtgga gtaacaggag gaaaggtgac attgagctgt	540
caccagacta ataaccatga ctatatgtac tggtatggc aggacacggg gcatgggctg	600
aggctgatcc attactcata tctcgtgac agcacggaga aaggagatat ccctgatggg	660
tacaaggcct ccagaccaag ccaagagaat ttctctctca ttctggagtt ggcttcctt	720
tctcagacag ctgtatattt ctgtgccagc agccccact cctatgaaca gtacttoggt	780
cccgccacca ggctcacggt tttagaggac ctgaacaagg tgttcccacc cgaggctcgt	840

ES 2 579 077 T3

gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg 900
 gccacaggct tottccctga ccacgtggag ctgagctggt gggttaacgg gaaggaggtg 960
 cacagtgggg tcagcacgga cccgcagccc ctcaaggagc agcccgcctt caatgactcc 1020
 agatactgcc tgagcagccg cctgagggtc tgggccacct tctggcagaa cccccgcaac 1080
 cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg ctctcggaga atgacgagtg gaccaggtat 1140
 agggccaaac ctgtcaccca gatcgtcagc gccgaggcct ggggtagagc agacaactgg 1200
 gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt gaagatctta ttcaatctat gcatattgat 1260
 gctactttat atacggaaag tgatgttcac cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc 1320
 tttctcttgg agttacaagt tatttcaact gagtcggag atgcaagtat tcatgatata 1380
 gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacgac agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa 1440
 tctggatgca aagaatgta ggaactggag gaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt 1500
 tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac acttcttaa 1539

<210> 39

<211> 512

<212> PRT

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

<221> **fuelle**

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 39

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Val Leu Ala Gln Lys Val Thr Gln Thr Gln Thr Ser Ile Ser Val Met
 20 25 30

Glu Lys Thr Thr Val Thr Met Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg Asp Ser
 35 40 45

Ser Tyr Phe Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Thr Ala Ser Gly Glu Ile Val
 50 55 60

Phe Leu Ile Arg Gln Asp Ser Tyr Lys Lys Glu Asn Ala Thr Glu Gly
 65 70 75 80

His Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Pro Lys Ser Ser Ile Gly Leu Ile
 85 90 95

Ile Thr Ala Thr Gln Ile Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Met
 100 105 110

Arg Asp Thr Asn Ala Tyr Lys Val Ile Phe Gly Lys Gly Thr His Leu
 115 120 125
 His Val Leu Pro Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Val Thr Gln Ser Pro Arg Ser Lys Val Ala Val Thr Gly Gly Lys Val
 165 170 175
 Thr Leu Ser Cys His Gln Thr Asn Asn His Asp Tyr Met Tyr Trp Tyr
 180 185 190
 Arg Gln Asp Thr Gly His Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Tyr Val
 195 200 205
 Ala Asp Ser Thr Glu Lys Gly Asp Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Ala Ser
 210 215 220
 Arg Pro Ser Gln Glu Asn Phe Ser Leu Ile Leu Glu Leu Ala Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Gln Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro His Ser Tyr Glu
 245 250 255
 Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Asn
 260 265 270
 Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu
 275 280 285
 Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe
 290 295 300
 Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val
 305 310 315 320
 His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala
 325 330 335
 Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
 340 345 350
 Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
 355 360 365

ES 2 579 077 T3

Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro
 370 375 380

Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Asn Trp
 385 390 395 400

Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser
 405 410 415

Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser
 420 425 430

Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile
 435 440 445

Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu
 450 455 460

Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu
 465 470 475 480

Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu
 485 490 495

Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 500 505 510

<210> 40
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens.

<400> 40
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 41

<211> 2097

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 41

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccaccggt	60
cagtcagtga cgcagcccga tgctcgcgctc actgtctctg aaggagcctc tctgcagctg	120
agatgcaagt attcctactc tgggacacct tatctgttct ggtatgtcca gtaccgcggg	180
caggggctgc agctgctcct caagtactat tcaggagacc cagtggttca aggagtgaat	240
ggcttcgagg ctgagttcag caagagtaac tcttccttcc acctgcggaa agcctctgtg	300
cactggagcg actctgctgt gtacttctgt gttttgagcg aggatagcaa ctatcagttg	360

ES 2 579 077 T3

atctgggget ctgggaccaa gctaattata aagccagaca ctagtggtgg cggtggcagc 420
 ggcggtggtg gttccgggtg cggcggttct ggcggtgggc gttcctcgag caattcaaaa 480
 gtcattcaga ctccaagata tctggtgaaa gggcaaggac aaaaagcaaa gatgaggtgt 540
 atccctgaaa agggacatcc agttgtatc tggtatcaac aaaataagaa caatgagttt 600
 aaatthttga ttaactttca gaatcaagaa gttcttcagc aaatagacat gactgaaaaa 660
 cgattctctg ctgagtgctc ttcaaactca ccttgagacc tagaaattca gtcctctgag 720
 gcaggagact cagcactgta cctctgtgcc agcagctctg cagggggcgg cacagaagtc 780
 ttctttggta aaggaaccag gctcacagtt gtagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc 840
 gaggtcgctg tgthttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 900
 gtgtgcctgg ccacaggctt cttccctgac cacgtggagc tgagctggtg ggttaacggg 960
 aaggaggtgc acagtggggc cagcacggac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc 1020
 aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac 1080
 ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtg 1140
 acccaggata gggccaaacc cgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 1200
 gacatcacgt gccctcccc catgtccgtg gaacacgcag acatctgggt caagagctac 1260
 agcttgact ccaggagcg gtacatttgt aactctggtt tcaagcgtaa agccggcacg 1320
 tccagcctga cggagtgctg gttgaacaag gccacgaatg tcgcccactg gacaaccccc 1380
 agtctcaaat gcattagaga gccgaaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccacogtgc 1440
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1500
 accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1560
 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1620
 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct cacogtctg 1680
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaaca agccctocca 1740
 gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1800
 accctgccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1860
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 1920
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1980
 ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2040
 gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctcctgg taaataa 2097

<210> 42
 <211> 678
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

Gln	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Asp	Ala	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Leu	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Gly	Thr	Pro	Tyr	Leu
			20					25					30		
Phe	Trp	Tyr	Val	Gln	Tyr	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu	Lys
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asp	Pro	Val	Val	Gln	Gly	Val	Asn	Gly	Phe	Glu	Ala
	50					55					60				
Glu	Phe	Ser	Lys	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	His	Leu	Arg	Lys	Ala	Ser	Val
65					70					75					80
His	Trp	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser
				85					90					95	
Asn	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys	Pro
			100					105						110	
Asp	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Lys	Val	Ile	Gln	Thr
	130					135					140				
Pro	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Met	Arg	Cys
145					150					155					160
Ile	Pro	Glu	Lys	Gly	His	Pro	Val	Val	Phe	Trp	Tyr	Gln	Gln	Asn	Lys
				165					170					175	
Asn	Asn	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Ile	Asn	Phe	Gln	Asn	Gln	Glu	Val	Leu
			180					185					190		
Gln	Gln	Ile	Asp	Met	Thr	Glu	Lys	Arg	Phe	Ser	Ala	Glu	Cys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Ala	Gly	Asp	Ser
	210					215					220				

Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val
 225 230 235 240

Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 245 250 255

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile
 260 265 270

Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe
 275 280 285

Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His
 290 295 300

Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu
 305 310 315 320

Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
 325 330 335

Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr
 340 345 350

Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val
 355 360 365

Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Ile Thr Cys
 370 375 380

Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr
 385 390 395 400

Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg
 405 410 415

Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr
 420 425 430

Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro
 435 440 445

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 450 455 460

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 465 470 475 480

ES 2 579 077 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 485 490 495

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 500 505 510

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 515 520 525

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 530 535 540

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 545 550 555 560

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 565 570 575

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 580 585 590

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 595 600 605

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 610 615 620

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 625 630 635 640

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 645 650 655

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 660 665 670

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 675

<210> 43

<211> 1140

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 43
atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactgggt ccagcagaag 180
ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcct 240
gttcgcttca gtggcagtggt gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat caaaagtgga ggtggcggat caggaggcgg aggttctggc 420
ggaggtggga gtcaggtaca actgcagcag cctggggctg agctggtgaa gcctggggcc 480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540
gtaaaacaga cacctggctg gggcctggaa tggattggag ctatttatcc cggaaatggt 600
gatacttctc acaatcagaa gttcaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc 660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctattactgt 720
gcaagatcga cttactacgg cggtgactgg tacttcaatg tctggggcgc agggaccacg 780
gtcaccgtct ctgcaaaactg ggtgaatgta ataagtgatt tgaaaaaat tgaagatctt 840
attcaatcta tgcattatga tgctacttta tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc 900
aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg gagttacaag ttatttact tgagtcogga 960
gatgcaagta ttcattgatac agtagaaaat ctgatcatcc tagcaaacga cagtttctct 1020
tctaattggga atgtaacaga atctggatgc aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaat 1080
attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat attgtccaaa tgttcatcaa cacttcttaa 1140

<210> 44
<211> 357
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

ES 2 579 077 T3

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125

Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
145 150 155 160

Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly
165 170 175

Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
180 185 190

Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
195 200 205

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr
210 215 220

Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
245 250 255

Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
260 265 270

Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
275 280 285

Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp
290 295 300

Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn
305 310 315 320

Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu
325 330 335

Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met
340 345 350

Phe Ile Asn Thr Ser
355

<210> 45

<211> 1689

<212> DNA

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 45

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc	60
agaggacaaa ttgttctctc ccagttctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag	120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactggtt ccagcagaag	180
ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggettc tggagtcctt	240
gttcgcttca gtggcagtgg gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag	300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc caggttcgga	360
ggggggacca agctggaaat caaaagtgga ggtggcggat ccggaggtgg aggttctggt	420
ggaggtggga gtcaggtaca actgcagcag cctggggctg agctggtgaa gcctggggcc	480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg	540
gtaaaacaga cacctggtcg gggcctggaa tggattggag ctatttatcc cggaaatggt	600
gatacttctt acaatcagaa gttcaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc	660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctattactgt	720
gcaagatcga cttactacgg cgggtgactgg tacttcratg tctggggcgc agggaccacg	780
gtcacmgtct ctgcaatcac gtgcctccc cccatgtccg tggaacacgc agacatctgg	840
gtcaagagct acagcttgta ctccagggag cggtagattt gtaactctgg tttcaagcgt	900
aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtggtgaaca aggccacgaa tgctgcccac	960
tggacaaccc ccagttctca atgcattaga gagccgaaat cttgtgacaa aactcacaca	1020

tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttccccca 1080
 aaaccaag acaccctcat gatctccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 1140
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 1200
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1260
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1320
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaag ccaaaggca gccccgagaa 1380
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1440
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1500
 cagccggaga acaactataa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1560
 ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1620
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctcct 1680
 ggtaaataa 1689

<210> 46

<211> 540

<212> PRT

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

<221> **fuelle**

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 46

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

ES 2 579 077 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 115 120 125
 Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
 145 150 155 160
 Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly
 165 170 175
 Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 180 185 190
 Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
 195 200 205
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 225 230 235 240
 Val Ser Ala Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp
 245 250 255
 Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys
 260 265 270
 Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys
 275 280 285
 Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu
 290 295 300
 Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 305 310 315 320
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 325 330 335
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 340 345 350
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 355 360 365

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 370 375 380

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 385 390 395 400

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 405 410 415

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 420 425 430

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 435 440 445

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 450 455 460

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 465 470 475 480

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 485 490 495

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 500 505 510

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 515 520 525

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535 540

<210> 47

<211> 1050

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 47

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctctc ccagctctcca gcaatcctgt ctgcatctoc aggggagaag 120

gtcacaaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactgggt ccagcagaag 180

ES 2 579 077 T3

ccaggatcct cccccaacc ctggatztat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt 240
gttcgcttca gtggcagtgg gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat caaacgtacg gttgctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagtgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgccaagt cacccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtaactg ggtgaatgta 720
ataagtgatt tgaaaaaaat tgaagatctt attcaatcta tgcatttga tgctacttta 780
tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg 840
gagttacaag ttatttcaact tgagtccgga gatgcaagta ttcatgatac agtagaaaat 900
ctgatcatcc tagcaaacga cagtttgtct tctaattggga atgtaacaga atctggatgc 960
aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaat attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat 1020
attgtccaaa tgttcatcaa cacttcttaa 1050

<210> 48
<211> 327
<212> PRT
<213> **Secuencia Artificial**

<220>
<221> **fuelle**
<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 48
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

<210> 49
 <211> 1608
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 49
 atgggttgga gtctcatctt gctcttcctt gtcgctggtg ctacacgtgt cctgtcccag 60
 gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct 180
 ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccggaa atggtgatac ttctacaat 240
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac 360
 tacggcggtg actggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca 420
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttatcacg 720
 tgcctcccc ccatgtcogt ggaacacgca gacatctggg tcaagagcta cagcttgtac 780
 tccagggagc ggtacatttg taactctggt ttcaagcgta aagccggcac gtccagcctg 840
 acggagtgcg tgttgaacaa ggccacgaat gtcgcccact ggacaacccc cagtctcaaa 900
 tgcattagag agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcact 960
 gaactcctgg ggggacogtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 1020
 atctcccga ccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 1080
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg 1140
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1200
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1260
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc 1320
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgctggt caaaggcttc 1380
 tatcccagcg acatgcctgt ggagtgagg agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1440
 accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg 1500
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1560

cacaaccact acacgcagaa gaggctctcc ctgtctctg gtaaataa

1608

<210> 50

<211> 516

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> / nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

ES 2 579 077 T3

	195					200						205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu
225					230					235					240
Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala
				245				250						255	
Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val
			260					265					270		
Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Pro	Lys	Ser
		275					280					285			
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
	290					295					300				
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
305					310					315					320
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				325					330						335
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
			340					345					350		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
		355					360						365		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
	370					375					380				
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
385					390					395					400
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				405					410					415	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
			420					425					430		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
		435					440					445			

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 450 455 460

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 465 470 475 480

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 485 490 495

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 500 505 510

Ser Pro Gly Lys
 515

<210> 51
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110

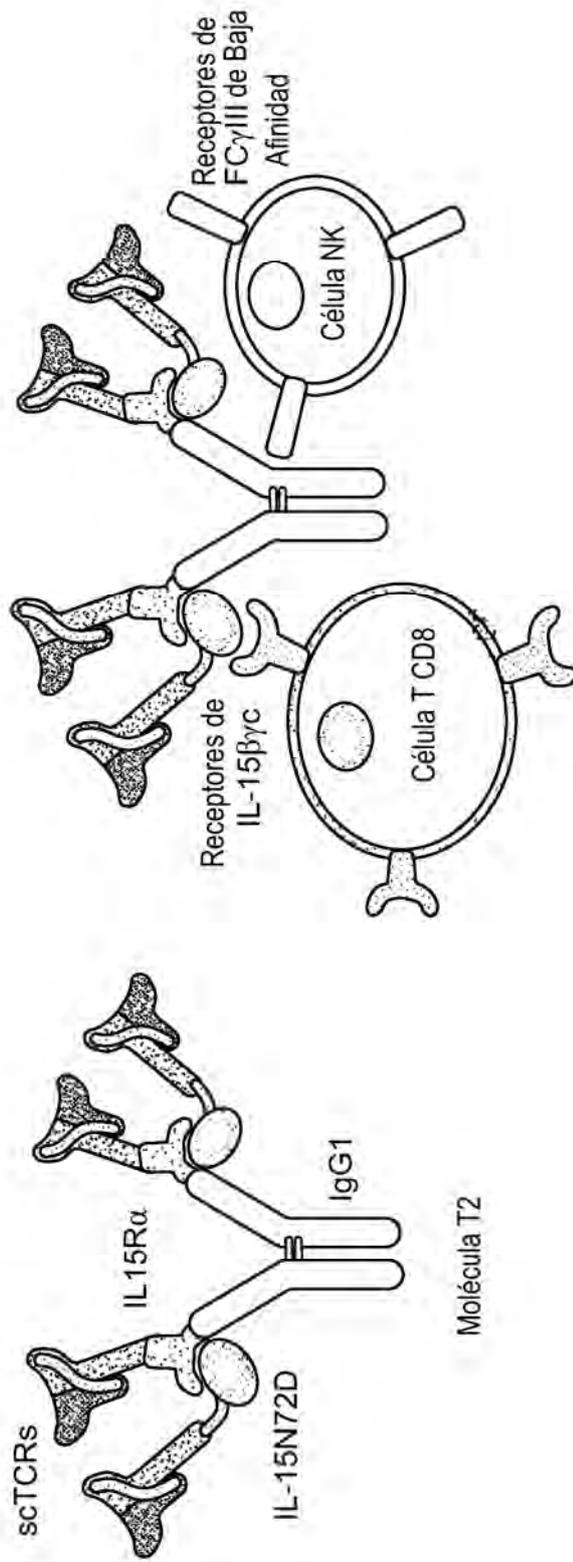
Thr Ser

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de proteínas de fusión solubles que comprende al menos dos proteínas de fusión solubles, en el que la primera proteína de fusión comprende (a) un primer polipéptido biológicamente activo conectado covalentemente a (b) polipéptido de interleucina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo; y
- 5 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo péptido biológicamente activo conectado covalentemente a (d) polipéptido de receptor de interleucina-15 α (IL-15R α) soluble o un fragmento funcional del mismo
 en el que una o ambas de las proteínas de fusión primera y segunda comprenden además un dominio Fc de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo;
- 10 en donde el dominio de IL-15 de la primera proteína de fusión se une al dominio de IL-15R α soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles, y en donde el polipéptido de IL-15 es una variante de IL-15 que tiene una sustitución de N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura y en donde el polipéptido de IL-15R α comprende el dominio sushi de IL-15R α .
- 15 2. El complejo de proteínas de fusión solubles según la reivindicación 1, en el que uno de los polipéptidos biológicamente activos primero y segundo comprende un primer receptor de células T (TCR) soluble o un fragmento funcional del mismo o en el que el otro polipéptido biológicamente activo comprende un segundo TCR soluble o un fragmento funcional del mismo diferente del primer TCR soluble.
3. El complejo de proteínas de fusión solubles según la reivindicación 1, que comprende un dominio sushi de IL-15 α fusionado a un dominio Fc (IL-15R α Su/Fc) y un polipéptido de interleucina-15 variante que comprende una mutación N72D (IL-15N72D) (complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc) .
- 20 4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un vector de ADN o una célula que comprende las secuencias de ácido nucleico según las reivindicaciones 4 y 5.
- 25 7. Un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles según la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 - a) introducir en una primera célula hospedadora un vector de ADN según la reivindicación 6 que codifica la primera proteína de fusión,
 - 30 b) cultivar la primera célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la primera proteína de fusión en la célula o el medio;
 - c) purificar la primera proteína de fusión de las células hospedadoras o el medio,
 - d) introducir en una segunda célula hospedadora un vector de ADN según la reivindicación 6 que codifica la segunda proteína de fusión,
 - 35 e) cultivar la segunda célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar la segunda proteína de fusión en la célula o el medio; y
 - f) purificar la segunda proteína de fusión de las células hospedadoras o el medio, y
 - g) mezclar la proteína de fusión primera y segunda bajo condiciones suficientes para permitir la unión entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles.
- 40 8. Un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles según la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 - a) introducir en una célula hospedadora un vector de ADN según la reivindicación 6 que codifica la primera proteína de fusión y un vector de ADN según la reivindicación 6 que codifica la segunda proteína de fusión,
 - 45 b) cultivar la célula hospedadora en un medio bajo condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio de IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio de IL-15R α soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles;
 - c) purificar el complejo de proteínas de fusión solubles de las células hospedadoras o el medio.

9. Un método in vitro para destruir una célula diana, comprendiendo el método:
- a) poner en contacto una pluralidad de células con un complejo de proteínas de fusión solubles según las reivindicaciones 1 - 3, en donde la pluralidad de células comprende además células inmunitarias portadoras de las cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio de IL-15 según la reivindicación 1 o células inmunitarias portadoras de las cadenas del receptor de Fc reconocidas por el dominio Fc según la reivindicación 1 y las células diana portadoras de un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos según la reivindicación 1,
- 5 b) formar un complejo de unión (puente) específico entre el antígeno en las células diana y las cadenas de IL-15R o receptor de Fc en las células inmunitarias suficiente para unirse a y activar las células inmunitarias; y
- 10 c) destruir las células diana mediante las células inmunitarias activadas unidas.
10. El complejo de proteínas de fusión solubles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a una enfermedad para el uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a una enfermedad.
- 15 11. Una mezcla de célula inmunitaria-complejo de proteínas de fusión obtenida al mezclar células inmunitarias portadoras de cadenas de IL-15R o cadenas de receptor de Fc con un complejo de proteínas de fusión solubles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a una enfermedad para el uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a una enfermedad.
- 20 12. El complejo para el uso según la reivindicación 10 u 11, en el que la enfermedad es cáncer o una infección viral.
13. El complejo de proteínas de fusión solubles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, para el uso en un método para estimular o suprimir respuestas inmunitarias en un mamífero.
14. Un complejo de proteínas de fusión solubles según la reivindicación 1, que es un complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado que comprende una IL-15R α Su/Fc dímera y dos moléculas de IL-15N72D en el que opcionalmente la IL-15N72D y/o la proteína de fusión IL-15R α Su/Fc está glicosilada.
- 25 15. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el complejo según la reivindicación 14.
16. Un vector de ADN o una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 15.
17. El complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado según la reivindicación 14, para el uso en un método para incrementar o disminuir una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- 30 18. El complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado según la reivindicación 14, para el uso en un método para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene neoplasia.
19. El complejo IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc totalmente ocupado según la reivindicación 14, para el uso en una inmunoterapia antiviral.

FIG. 1



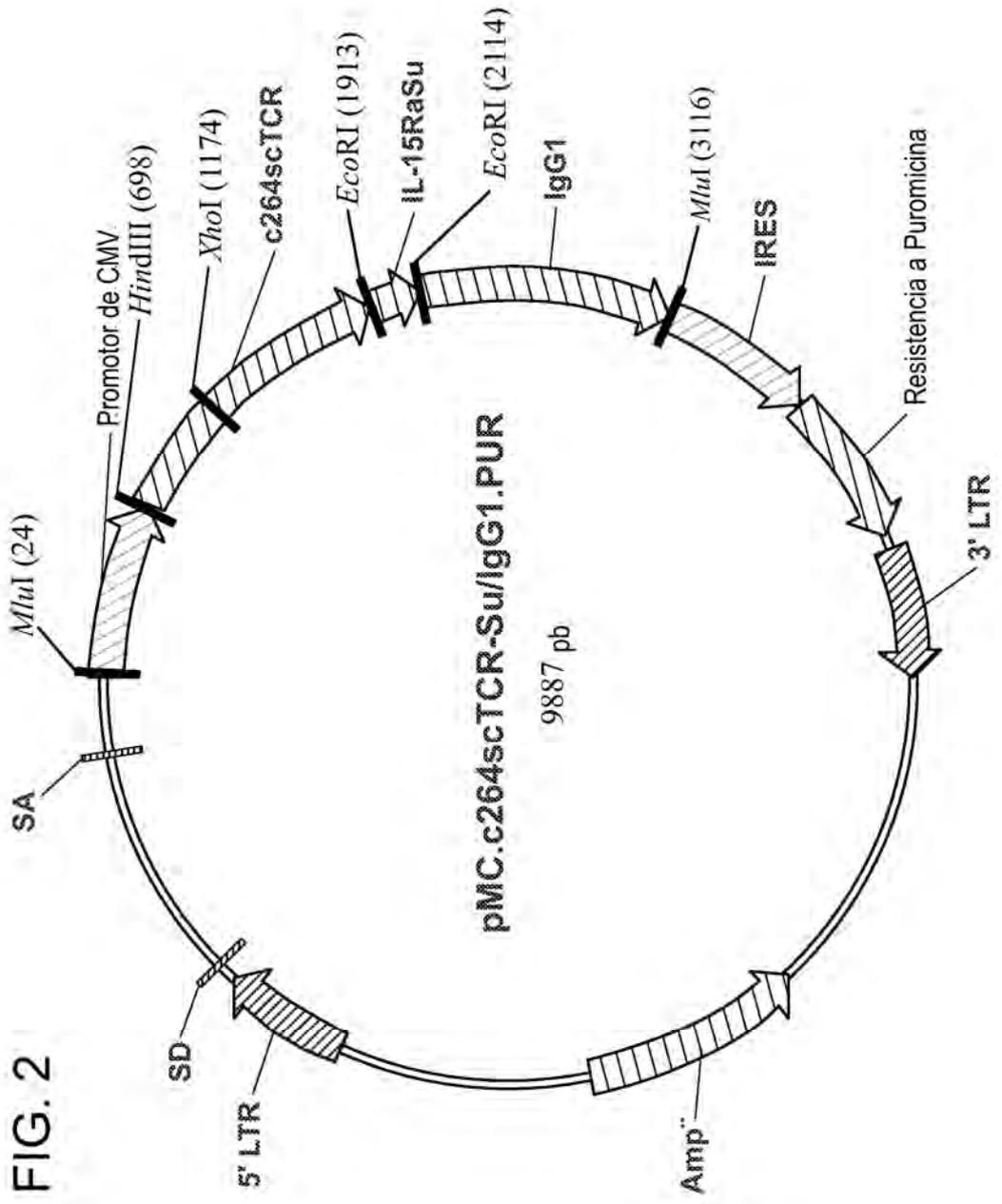


FIG.3

atggacagacttacttcttcattcctgctcctgattgtccctgcgtacgtcttgtcccagtc
 agtgacgcagcccgatgctcgcgtcactgtctctgaaggagcctctctgcagctgagatgca
 agtattcctactctgggacaccttatctgtttctggatgtccagtaccgcggcaggggctg
 cagctgctcctcaagtactattcaggagaccagtggttcaaggagtgaatggcttcgaggc
 tgagttcagcaagagtaactcttccctccacctgcggaaagcctctgtgactggagcgact
 ctgctgtgtacttctgtgttttgagcgaggatagcaactatcagttgatctggggctctggg
 accaagctaattataaagccagacactagtgggtggcgggtggcagcggcgggtgggttccgg
 tggcggcgggttctggcgggtggcgggttccctcgagcaattcaaaagtcatcagactccaagat
 atctgggtgaaagggcaaggacaaaagcaagatgaggtgtatccctgaaaaggacatcca
 gttgtattctgggtatcaacaaaataagaacaatgagtttaaatttttgattaacttccagaa
 tcaagaagttctcagcaaatagacatgactgaaaaacgattctctgctgagtgctccttcaa
 actcaccttgcagcctagaaattcagtcctctgaggcaggagactcagcactgtacctctgt
 gccagcagctctgtcagggggcggcacagaagtttcttggtaaaggaaccaggctcacagt
 tgtagaggacctgaacaaggtgttcccaccgaggtcgtctgtttgagccatcagaagcag
 agatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgctggccacaggcttcttccctgaccac
 gtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggggtcagcacggaccgcga
 gccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgaggg
 tctcggccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagtctacggg
 ctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccctcaccagatcgtcagcgc
 cgaggcctggggtagagcagacgaattcatcacgtgccctcccccatgtccgtggaacacg
 cagacatctgggtcaagagctacagctgtactccaggagcgggtacatttgtaactctgg
 ttcaagcgtaaagccggcacgtccagcctgacggagtgctgttgtaacaaggccacgaatgt
 cgcccactggacaacccccagctctcaaatgcattagagaattcgcctccaccaagggccat
 cggcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgc
 ctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgcctgaccag
 cggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtgg
 tgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc
 agcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcc
 accgtgccagcactgaaactcctggggggaccgtcagcttctccttccccccaaaaccca
 aggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctgtggtgggtggacgtgagccac
 gaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgc
 accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacct
 gccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctgggtcaaaggct
 tctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaag
 accacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctgga
 caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca
 accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

FIG. 4

mdrltssflllivpayvlsqsvtqpdarvtvsegaslqlrckysysqtpylfwyvqypr

<

><

líder de Ig

TCR-V α

qglqlllkyysqdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwsdsavyfcvlsedsnyq

TCR-V α

liwsgtkliikpdtsgggsgggsgggsgggsgggssnskvigtprylvkqqgkakm

><

><

TCR-V α

conector

TCR-V β

rcipekghpvvfwyqqnknefkflinfqnqevlqqidmtekrfsaecpsnspcsleiq

TCR-V β

sseagdsalylcasslsgggtevfqgkqtrltvvedlnkvfppevavfepseaeishtq

><

TCR-V β

TCR-C β

katlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdpqpakeqpalndsryclssrlrvsa

TCR-C β

tfwqnrnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradeffitcpppmsveh

> <

FIG. 4 (Continuación)



FIG. 6

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCA
 GTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGAT
 GCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGG
 CTGCAGCTGCTCCTCAAGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGA
 GGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGGAGCG
 ACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCT
 GGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTC
 CGGTGGCGGCGGTTCGGCGGTGGCGGTTCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAGACTCCAA
 GATATCTGGTGAAAGGGCAAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACAT
 CCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACCTTCA
 GAATCAAGAAGTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTT
 CAACTCACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCTC
 TGTGCCAGCAGTCTGTGAGGGGGCGGCACAGAAGTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGGCTCAC
 AGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGGCCATCAGAAG
 CAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCC
 GCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGA
 GGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTAC
 GGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAG
 CGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAG
 ACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTC
 AAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTGCG
 CCACTGGACAACCCCAAGTCTCAAATGTATTAGAGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
 GACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC
 CACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCCGTGCC
 AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACT
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAG
 AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATC
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

FIG. 7

metdtllllwvllllwvpgstgqsvtqpdarvtvsegaslqlrckysysgtpylfwyvqyp

< ><

líder de Ig

TCR-V α

rqglqlllkyysgdpvvqgvngfeaefsksnssfhlrkasvhwsdsavyfcvlseedsny

TCR-V α

qliwsgtkliikpdtsgggsgggsgggsgggsgggssnskviqtprylvkqqgkak

>< ><

TCR-V α

conector

TCR-V β

mrcipekghpvvfwyqqnknnefkflinfqnqevlqqidmtekrfsaecpsnspcslei

TCR-V β

gsseagdsalylcasslsgggtevfvgkgrltvvedlnkvfppevavfepseaeisht

><

TCR-V β

TCR-C β

qkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdpqpkeqpalndsryclssrlrvs

TCR-C β

atfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgraditcpppmsveha

><

FIG. 7 (Continuación)

TCR-C β	huIL-15R α Su
<u>diwvksyslysreryicnsgfkrkagtssltecvl\lnkatnvahwt\lnslkcirastk\lngp</u>	><
huIL-15R α Su	huIgG1
<u>svfplapssk\lnstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpav\lnqssglysl</u>	
región constante de huIgG1	
<u>ssvvtvpssslgtq\lntyicnvnhkpsntkvd\lnkkvepkscdk\lnhtc\lnppcpapellg\lngpsvf</u>	
región constante de huIgG1	
<u>lfppkpkdtl\lnmisrtpevtcvvvdvshedpevk\lnwyvdgvevhnakt\lnkpreeq\lnynsty</u>	
región constante de huIgG1	
<u>rvvsvltvlhq\lndwl\lngkeykckvsnk\lnpapiek\lntiskakg\lnpprepq\lnvytlppsrdelt</u>	
región constante de huIgG1	
<u>knqvs\lntlc\lnlvkgfypsdiavewesng\lnqpennykt\lnppv\lndsdgsfflysk\lnltvdksrwg</u>	
región constante de huIgG1	
<u>qgnvfscsv\lnmeal\lnnhytqks\lnslslspgk</u>	
	>
región constante de huIgG1	

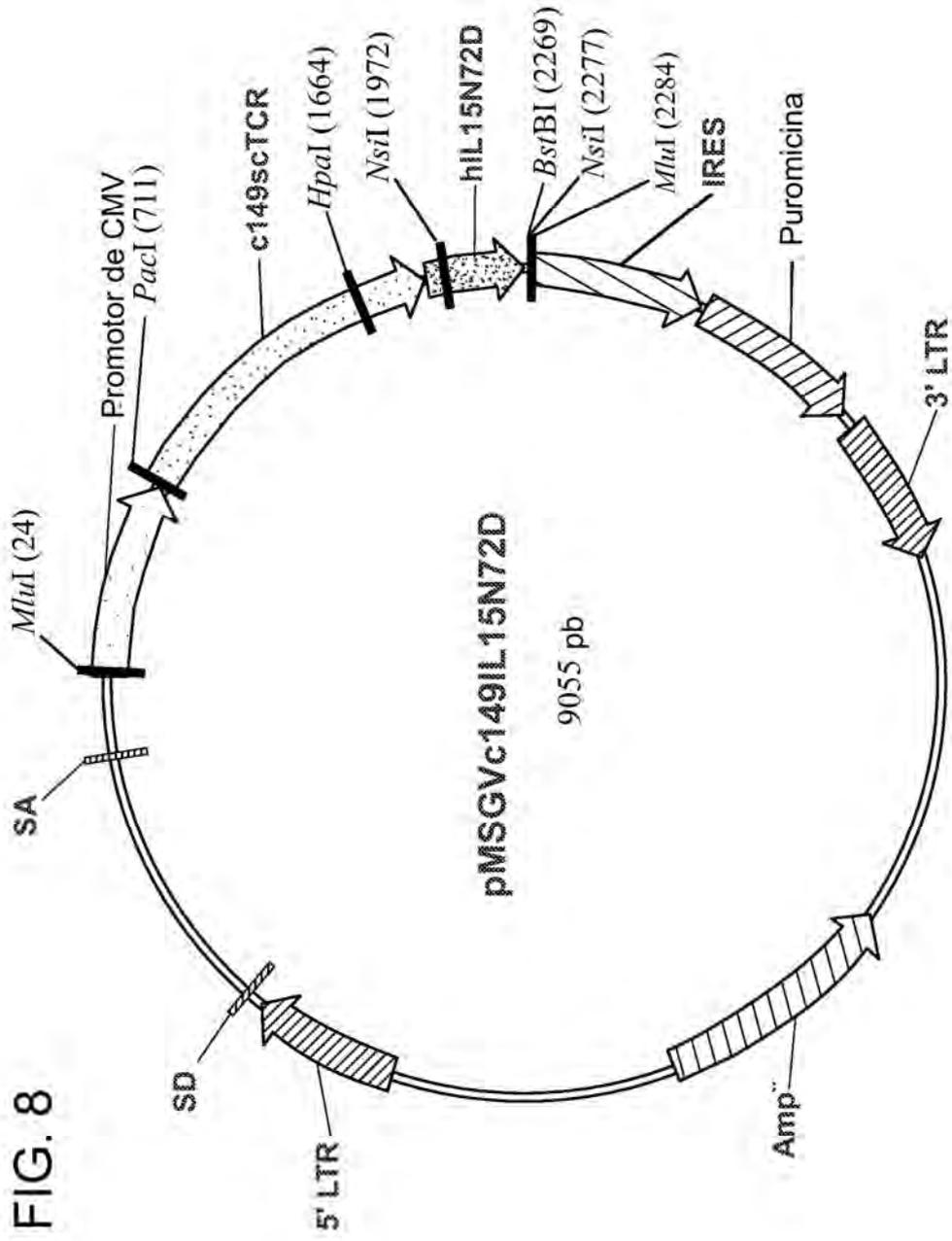


FIG. 9

ATGGACAGACTTACTTCTTCATTCCCTGCTCCTGATTGTCCCTGCGTACGTCTTGGCCCAGAA
 GGTAACACAGACTCAGACTTCAATTTCTGTGATGGAGAAGACAACGGTGACAATGGACTGTG
 TGTATGAAACCCGGGACAGTTCTTACTTCTTATTCTGGTACAAGCAAACAGCAAGTGGGGAA
 ATAGTTTTCTTATTTCGTCAGGACTCTTACAAAAGGAAAATGCAACAGAAGGTCATTATTC
 TCTGAACTTTCAGAAGCCAAAAGTTCCATCGGACTCATCATCACTGCCACACAGATTGAGG
 ACTCAGCAGTATATTTCTGTGCTATGAGAGACACAAATGCTTACAAAGTCATCTTTGGAAAA
 GGGACACATCTTCATGTTCTGCCTACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCCC
 TGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCCTCGAGCGAGGCTGCAGTCACCCAAAGTCCAA
 GAAGCAAGGTGGCAGTAACAGGAGGAAAGGTGACATTGAGCTGTCACCAGACTAATAACCAT
 GACTATATGTACTGGTATCGGCAGGACACGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATA
 TGTCGCTGACAGCACGGAGAAAGGAGATATCCCTGATGGGTACAAGGCCTCCAGACCAAGCC
 AAGAGAATTTCTCTCTCATTCTGGAGTTGGCTTCCCTTTCTCAGACAGCTGTATATTTCTGT
 GCCAGCAGCCCCACTCCTATGAACAGTACTTCGGTCCCGGCACCAGGCTCACGGTTTTAGA
 GGACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCT
 CCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAG
 CTGAGCTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCCT
 CAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGG
 CCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
 GAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGC
 CTGGGGTAGAGCAGACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTA
 TTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAA
 GTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGC
 AAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATG
 GGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA
 TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

FIG. 10

mdrltssfllllivpayvlagkvtgtqtsismektvtmdcvyetrdsyflfwykqta

<

><

líder de Ig

TCR-V α

sgeivflirqdsykkenateghyslnfqkpkssigliitatqiedsavyfcamrdtnay

TCR-V α

kvifgkgthlhvlpstggggsggggspggggsggggssseaavtqsprskvavtggkvt

><

><

TCR-V α

conector

TCR-V β

lschqtnnhdymywyrqdtghglrlihysyvadstekgdipdgykasrpsqenflile

TCR-V β

laslsgtavycassphsyeqyfpggtrltvledlnkvfppevavfepseaeishtqka

><

TCR-V β

TCR-C β

tlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstppplkeqpalndsryclssrlrvsatf

TCR-C β

wqnprnhfrcqvqfyglsendwtqdrakpvtqivsaeawgradnwnvisdlkkiedl

TCR-C β

><

huIL-15N72D

iqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvislesgdasihdtvenliilandsl

huIL-15N72D

ssngnvtsgckeceeleeknikeflqsfvhivqmfinst

huIL-15N72D

>

FIG. 12

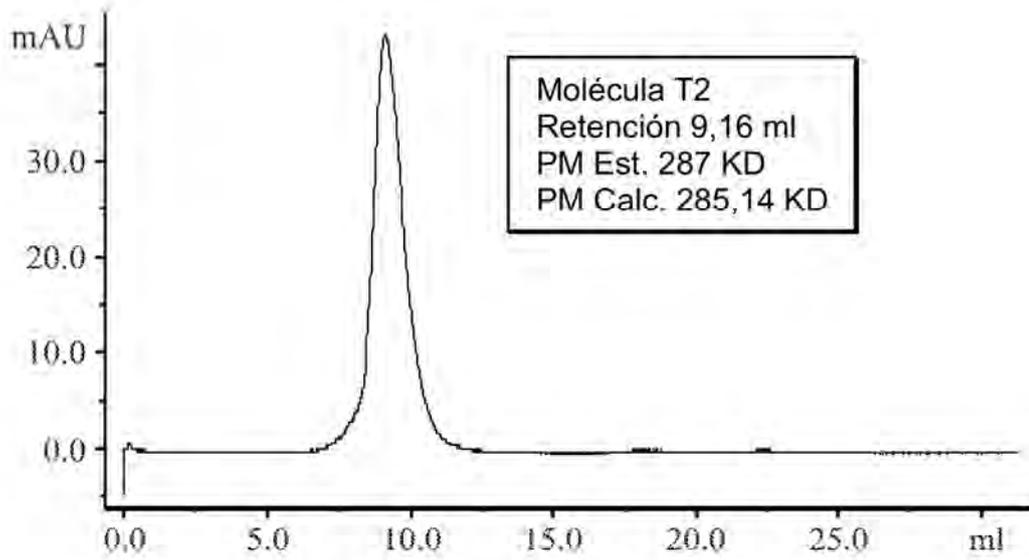


FIG. 13

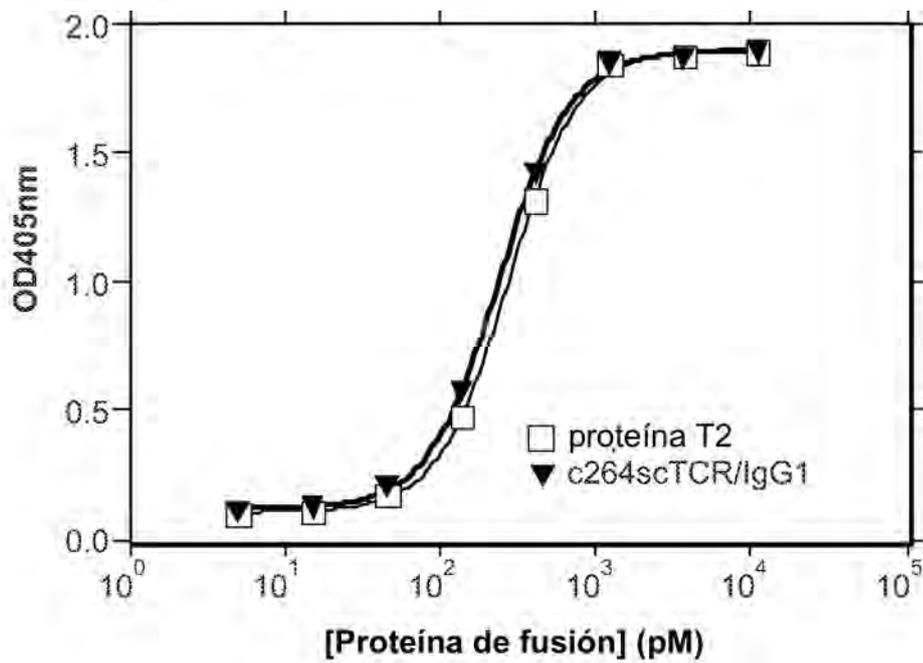
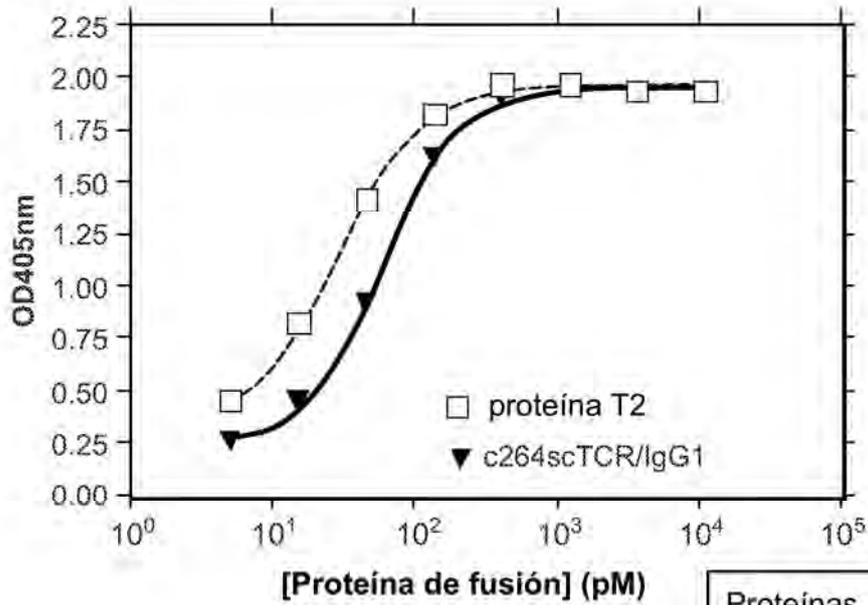
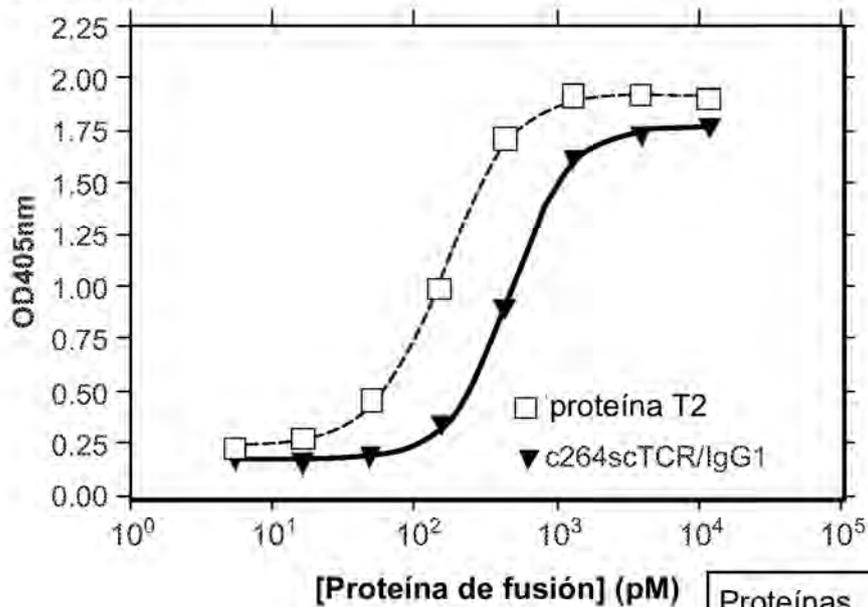


FIG. 14



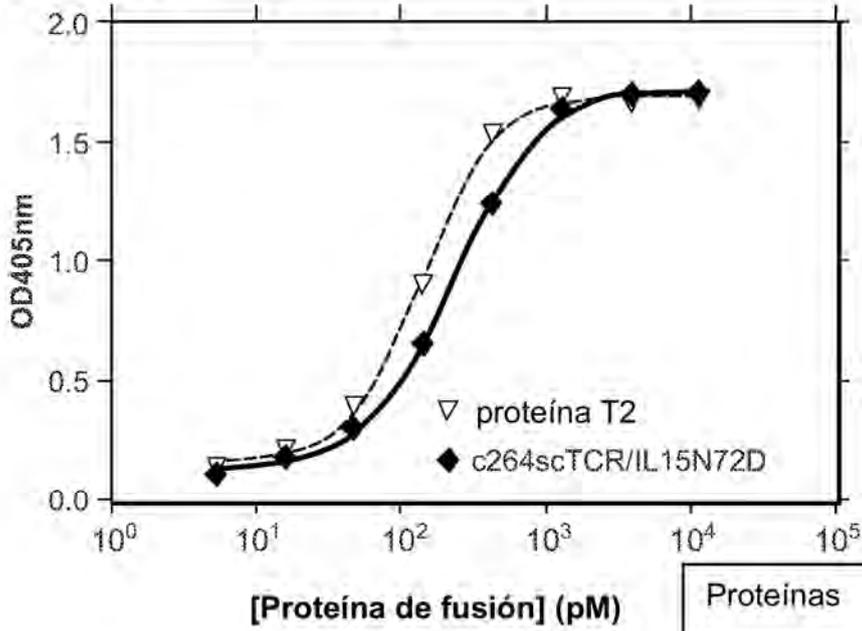
Proteínas	Actividad relativa (%)
264TCR-IgG1	100
T2M	209

FIG. 15



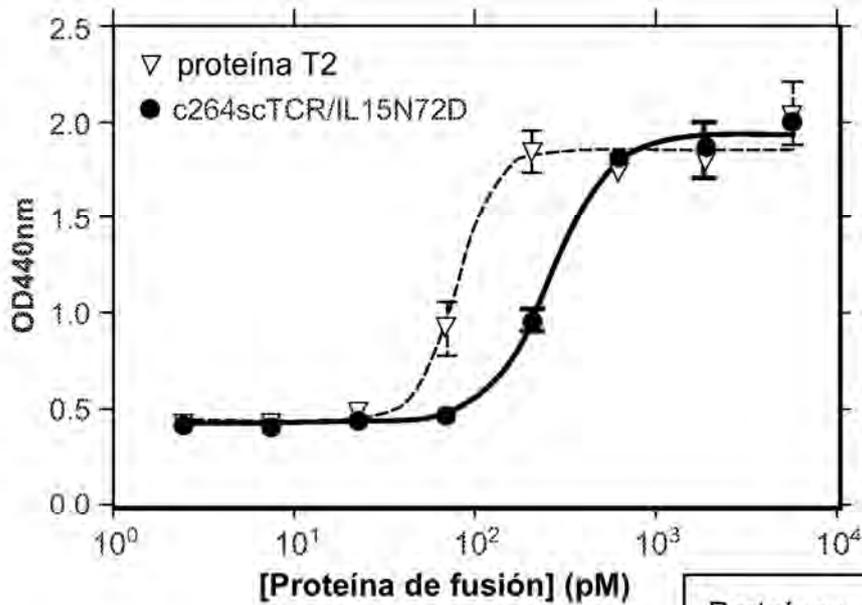
Proteínas	Actividad relativa (%)
264TCR-IgG1	100
T2M	299

FIG. 16

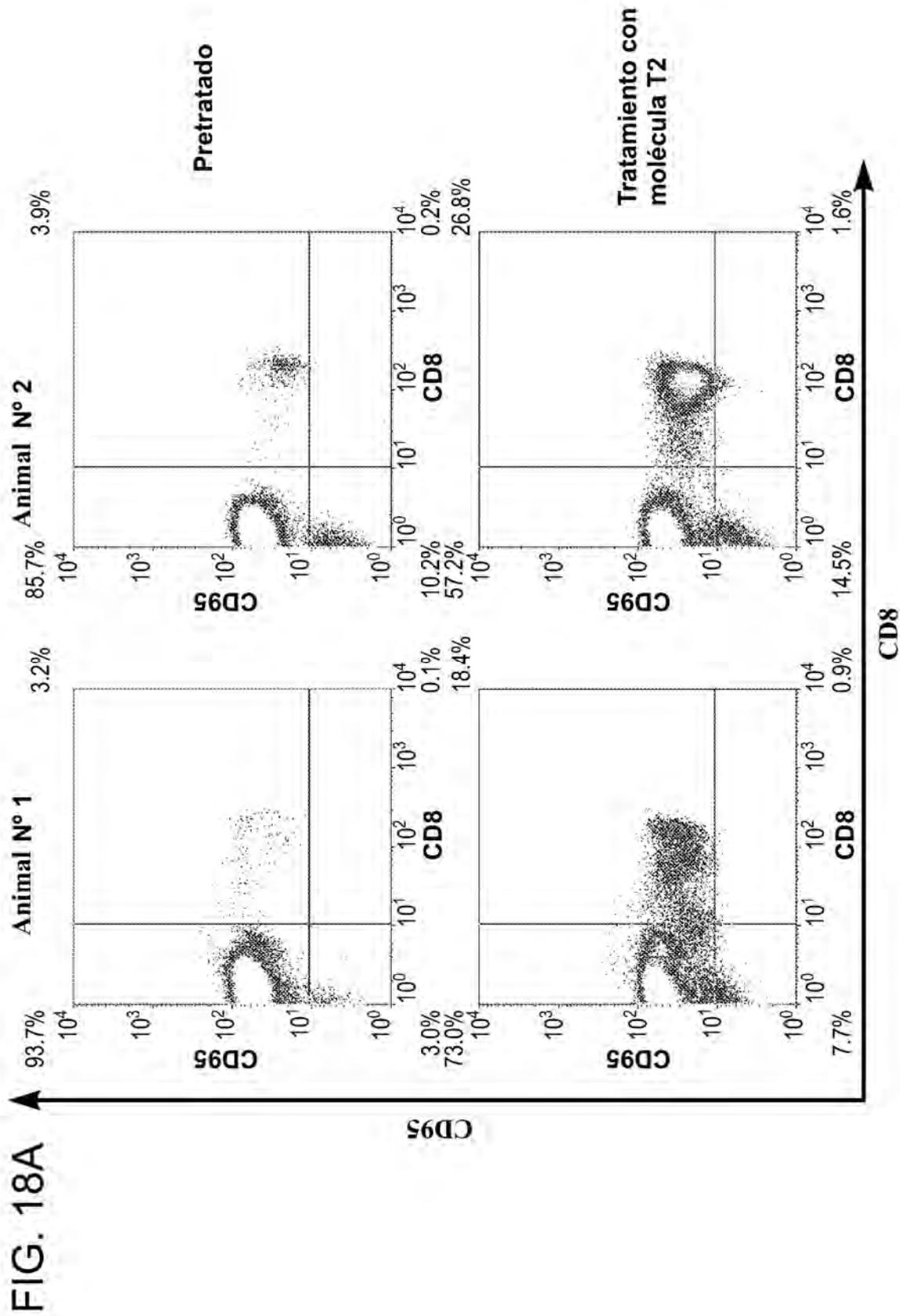


Proteínas	Actividad relativa (%)
264TCR-IL15N72D	100
T2M	161

FIG. 17



Proteínas	Actividad relativa (%)
264TCR-IL15N72D	100
T2M	322



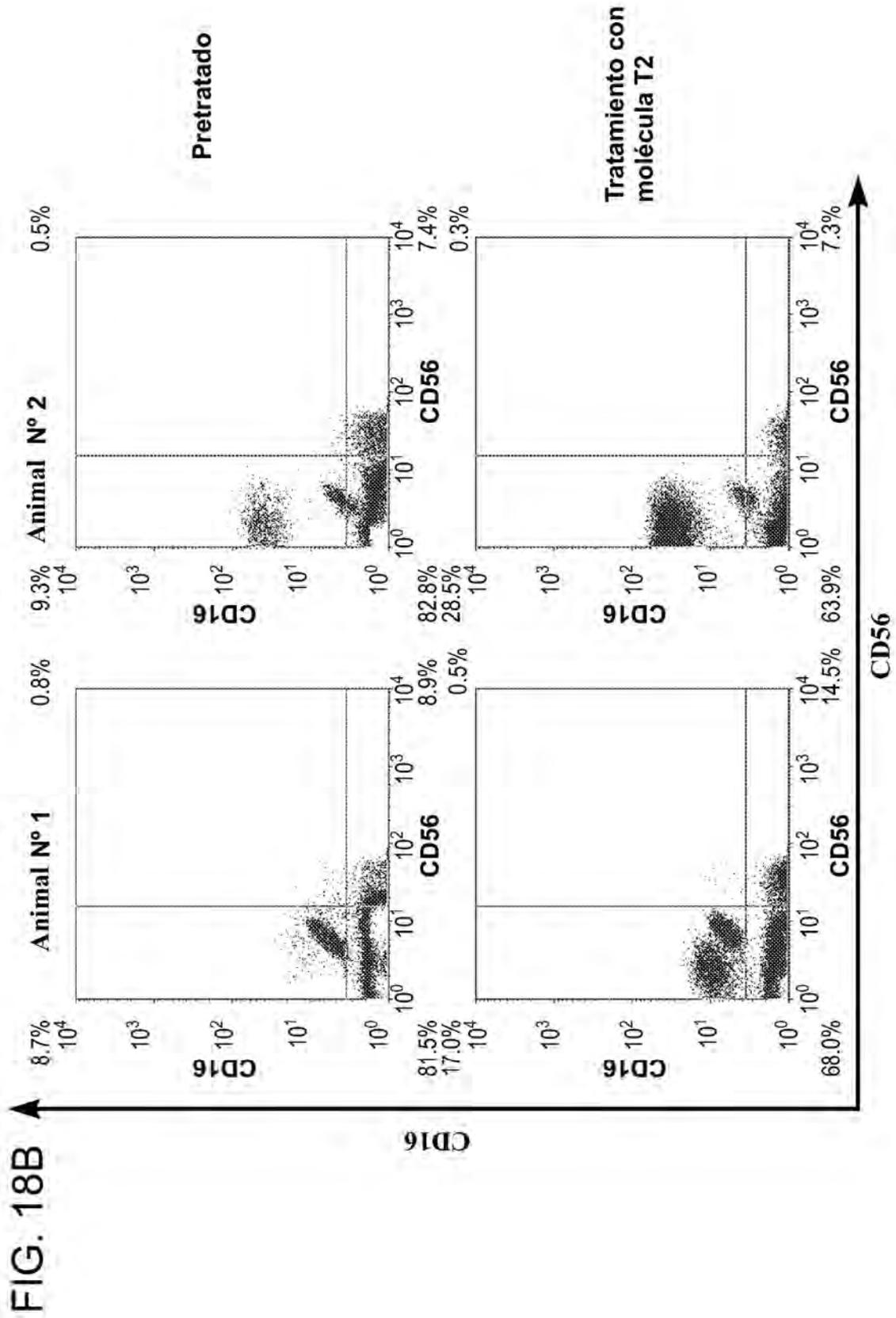


FIG. 19A

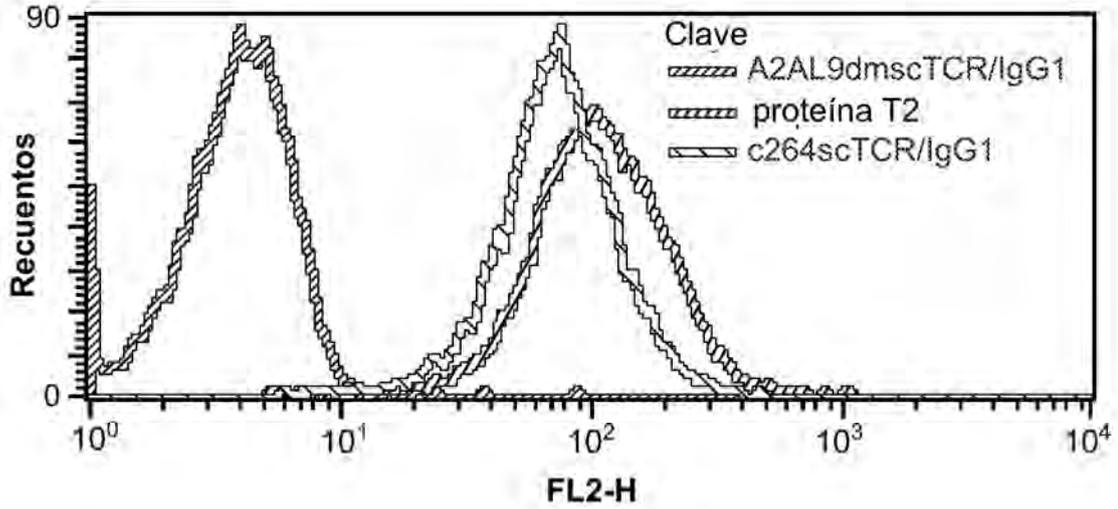
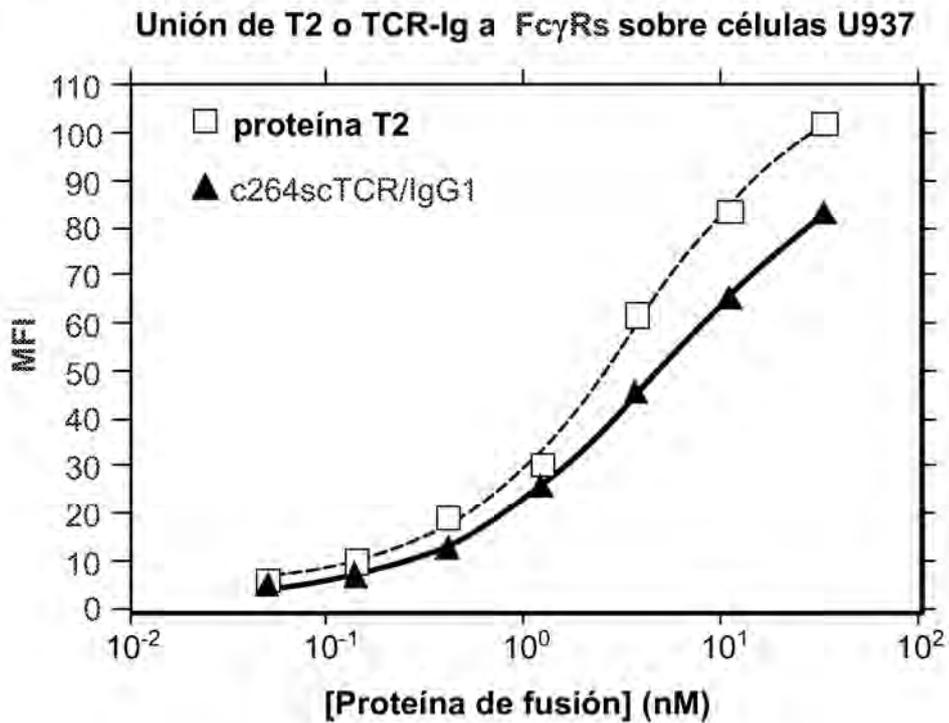


FIG. 19B



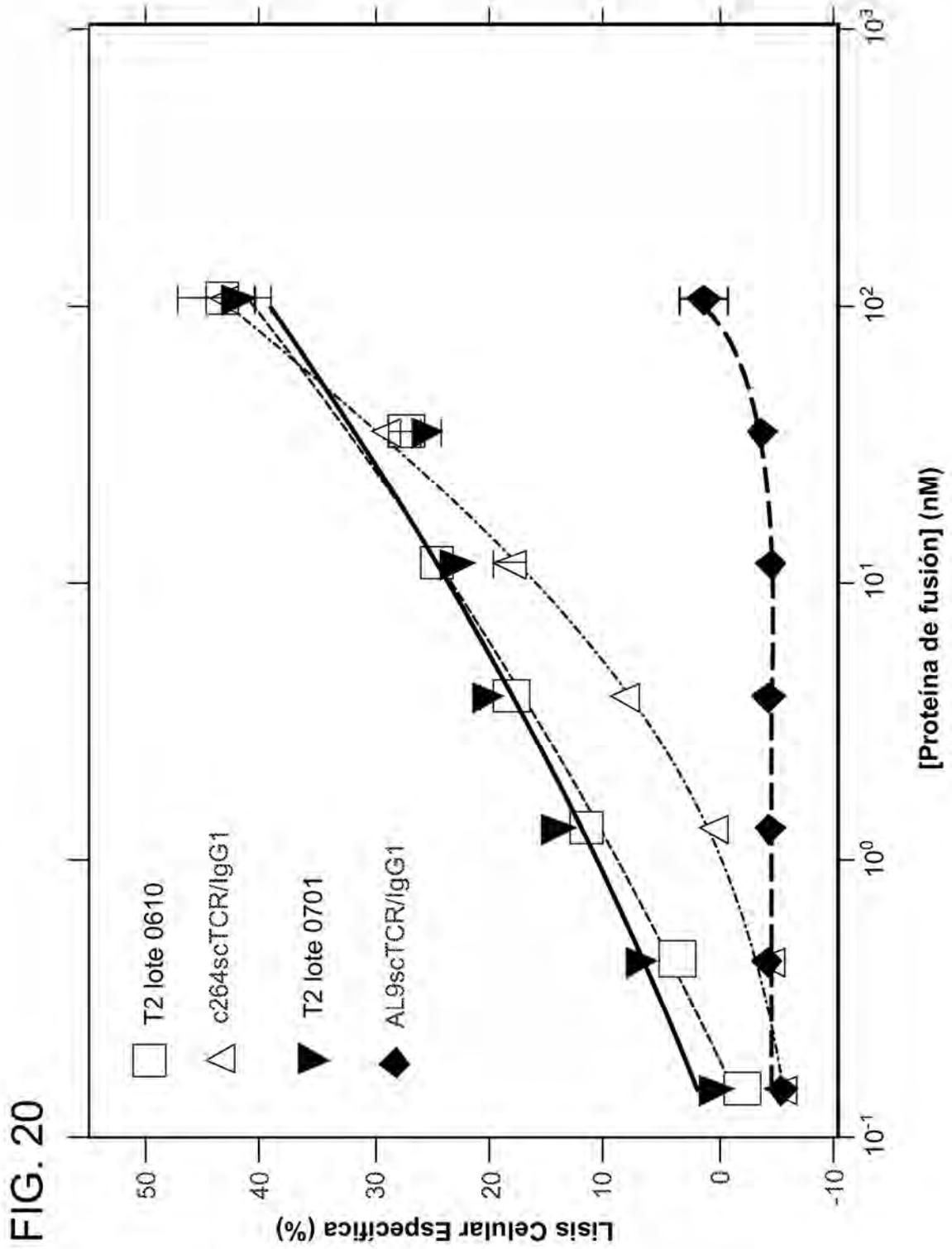


FIG. 21B

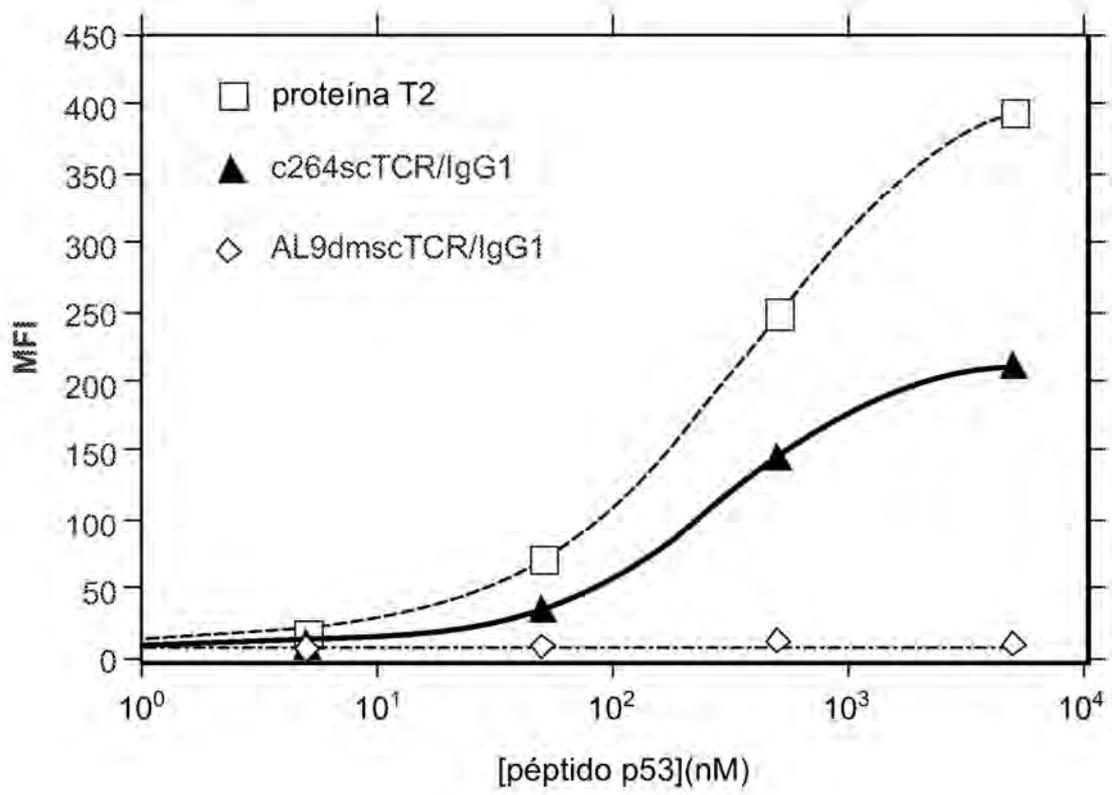


FIG. 22

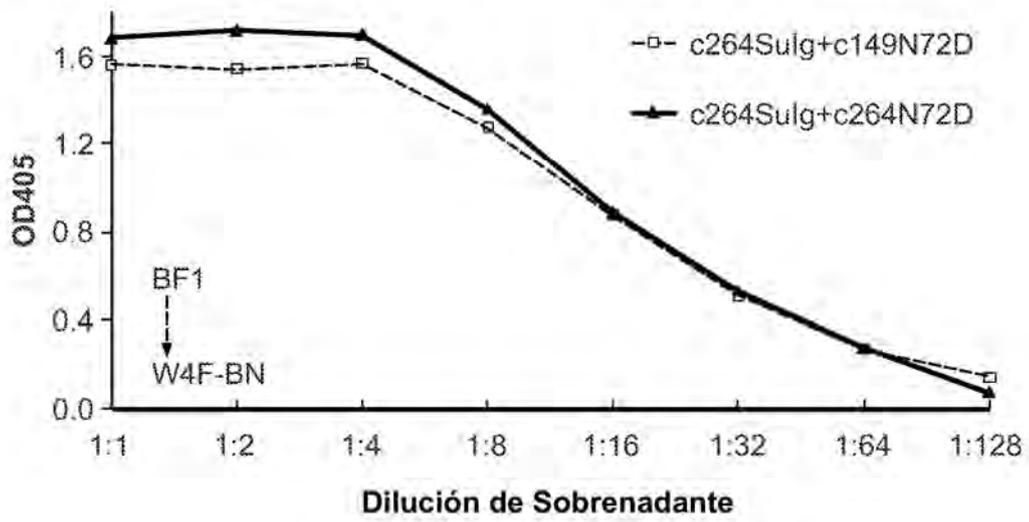


FIG. 23

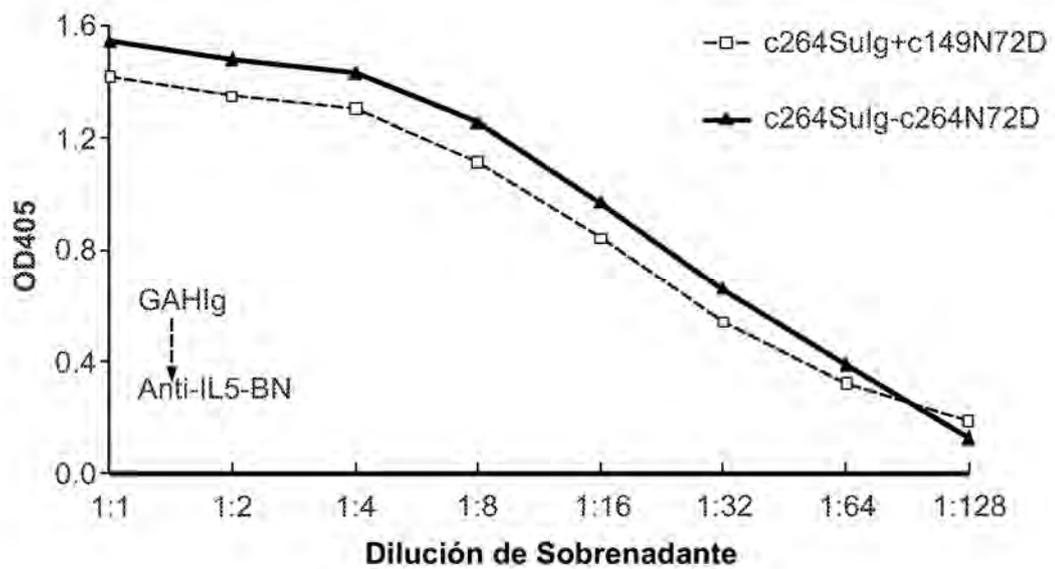


FIG. 24

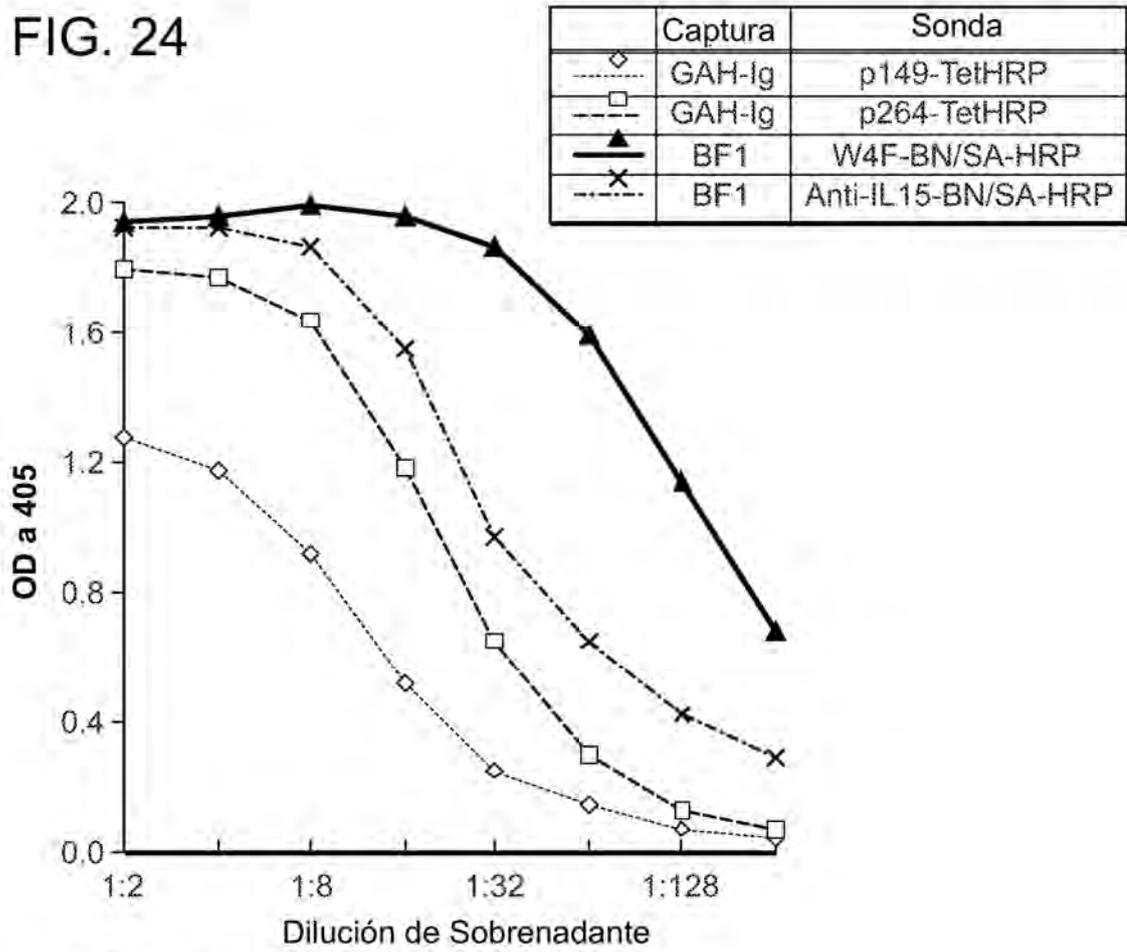


FIG. 25

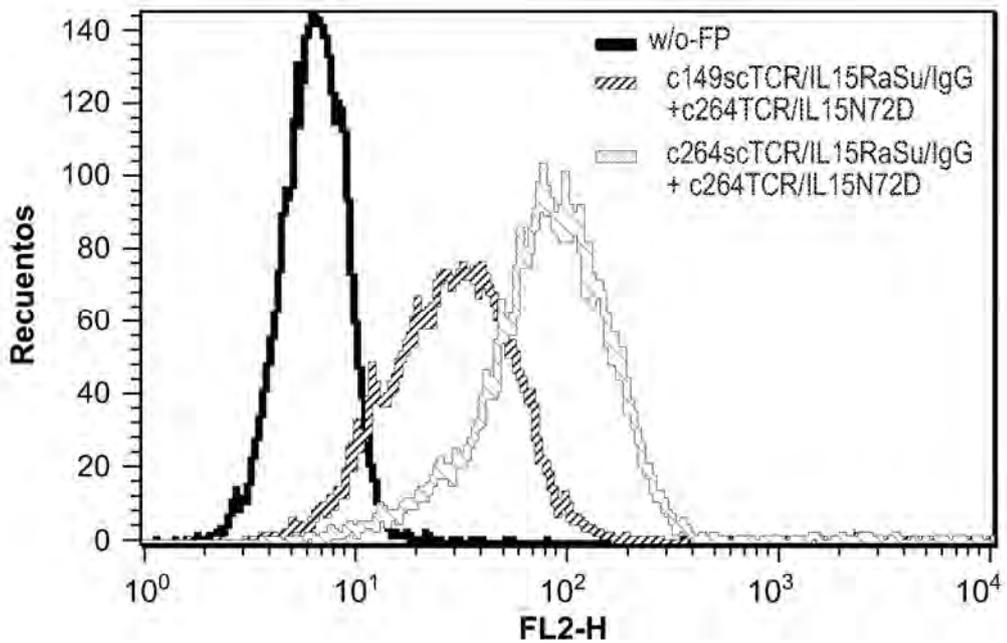


FIG. 26A

Estudio en ratones

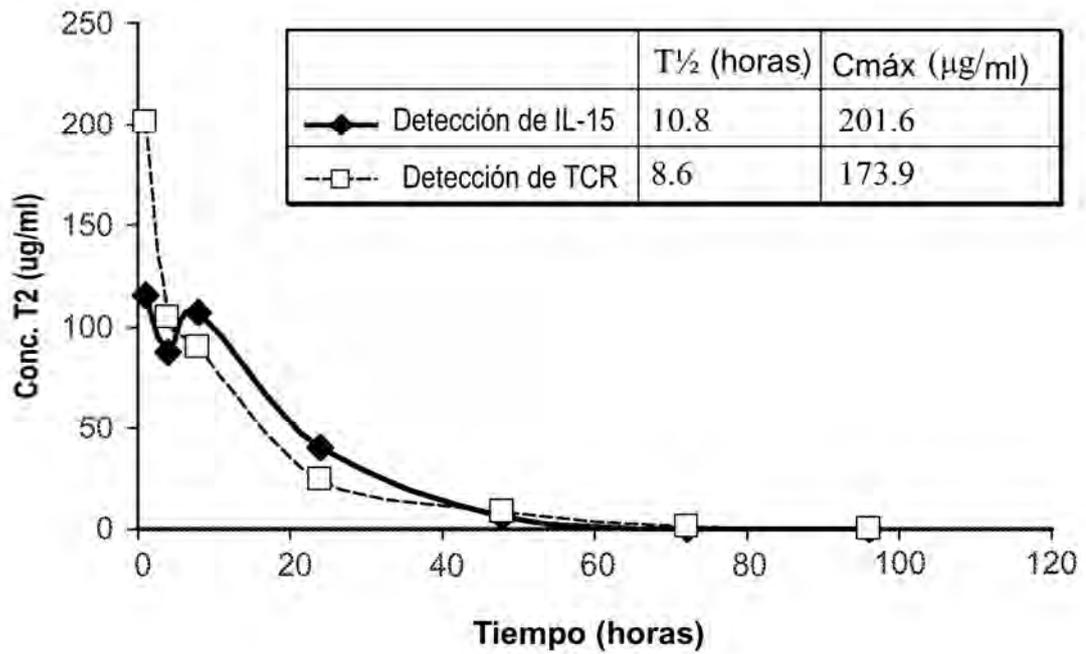


FIG. 26B

Estudio en monos

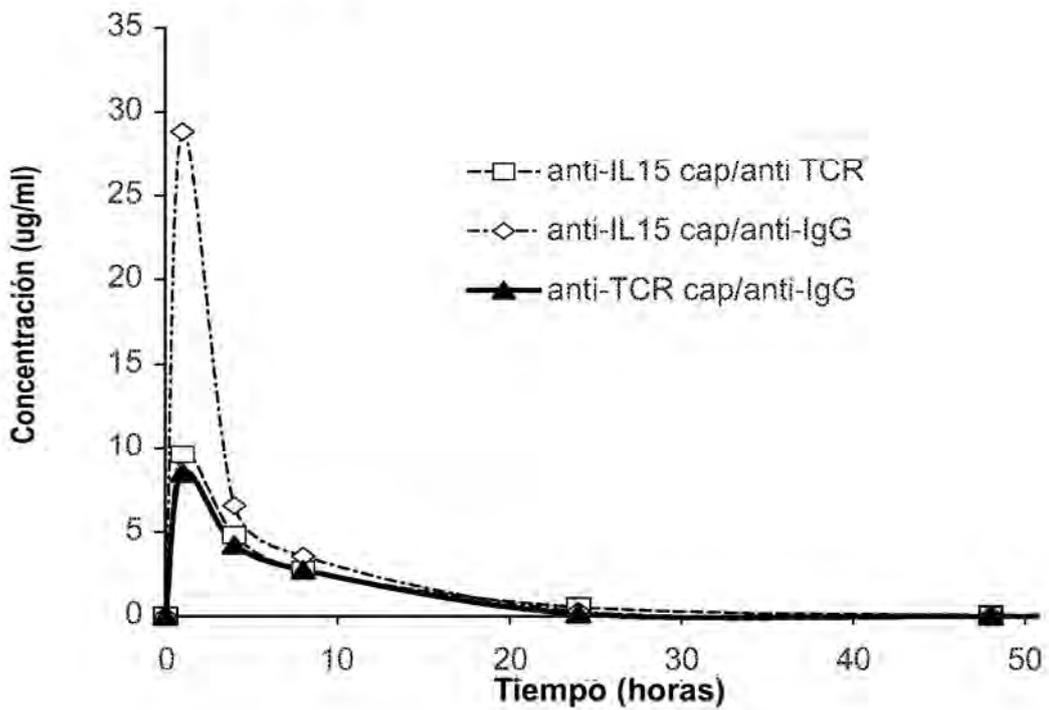


FIG. 27

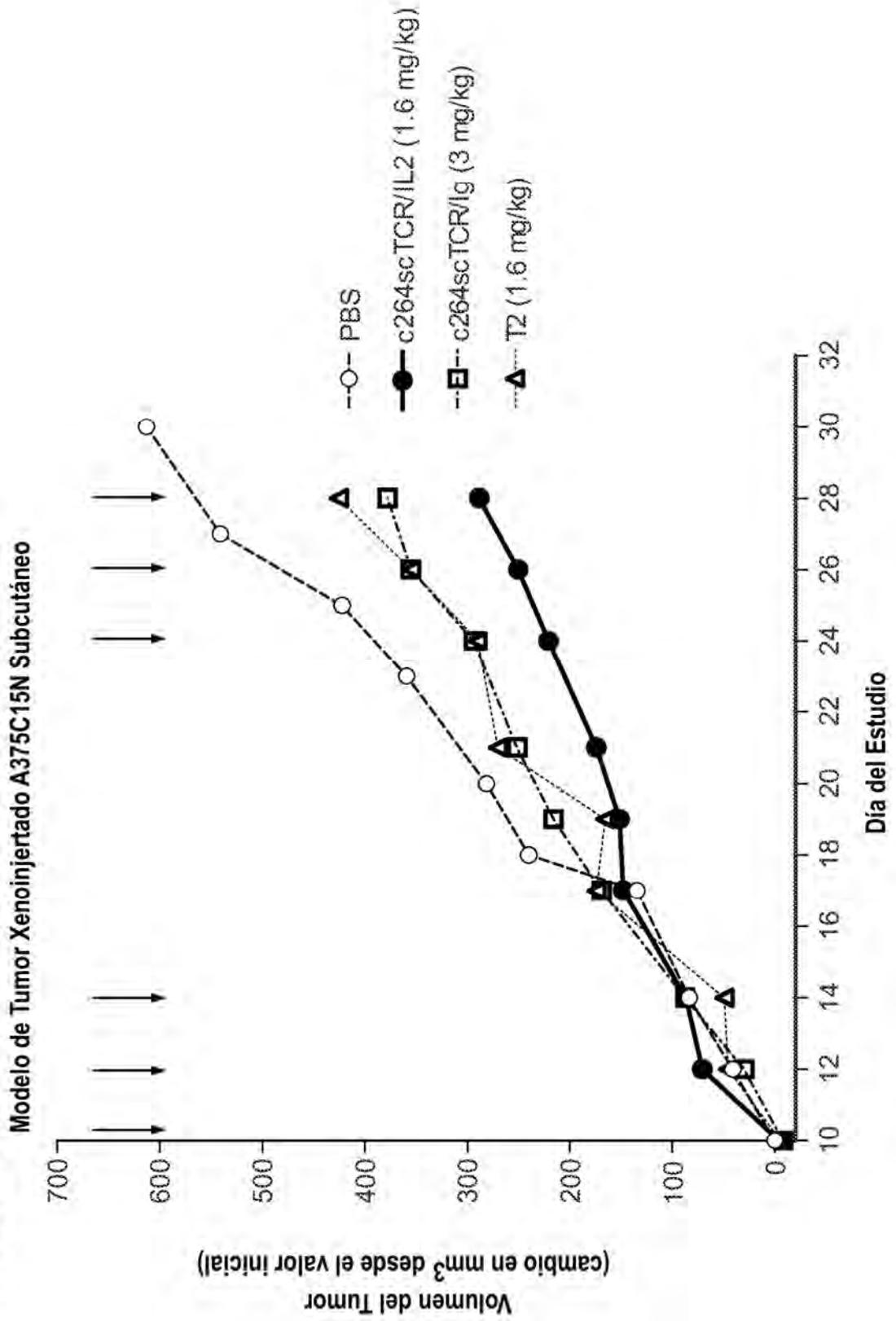


FIG. 28

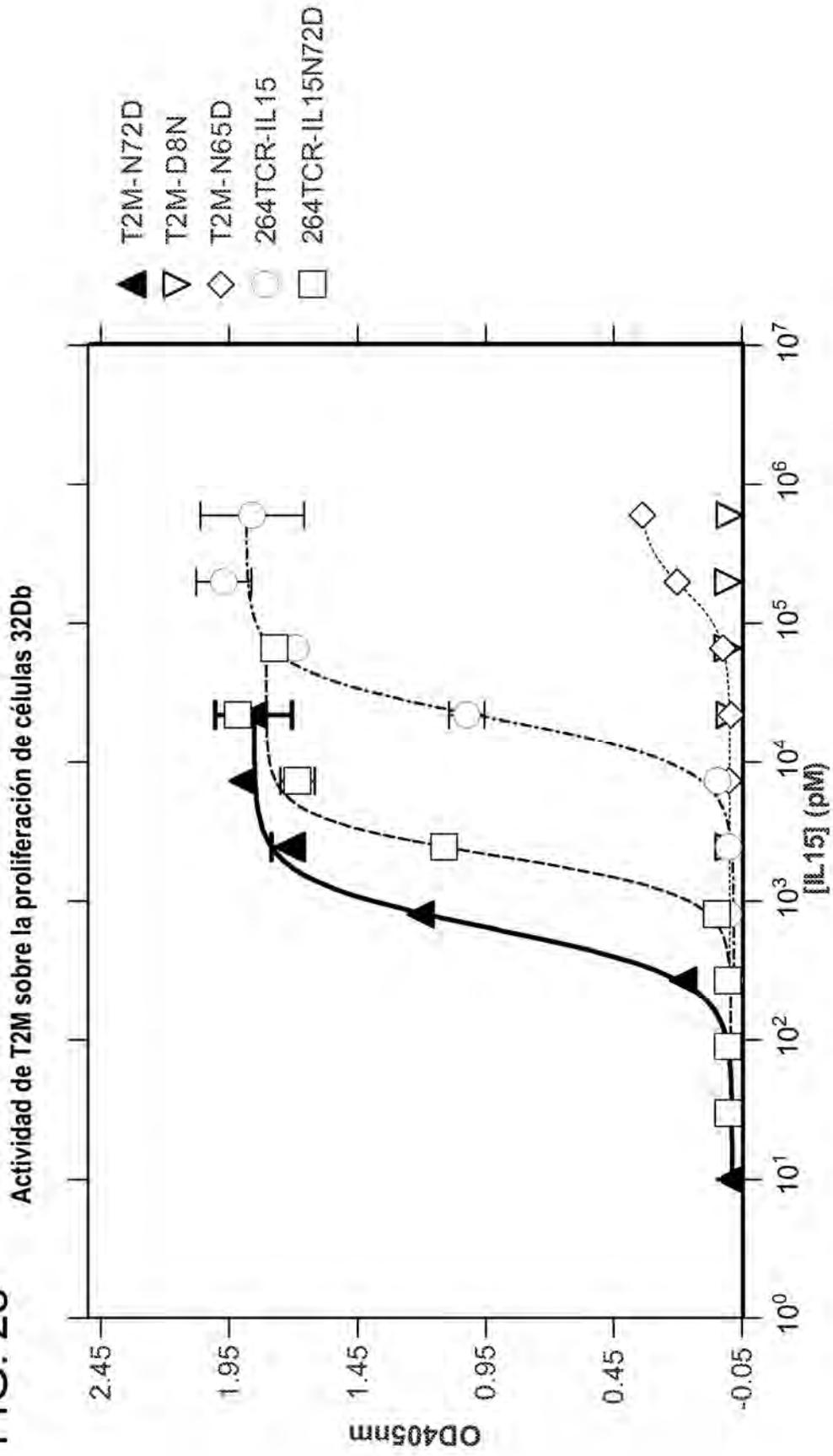


FIG. 29

Efecto similar a ADCC de T2M por PBMC humanas

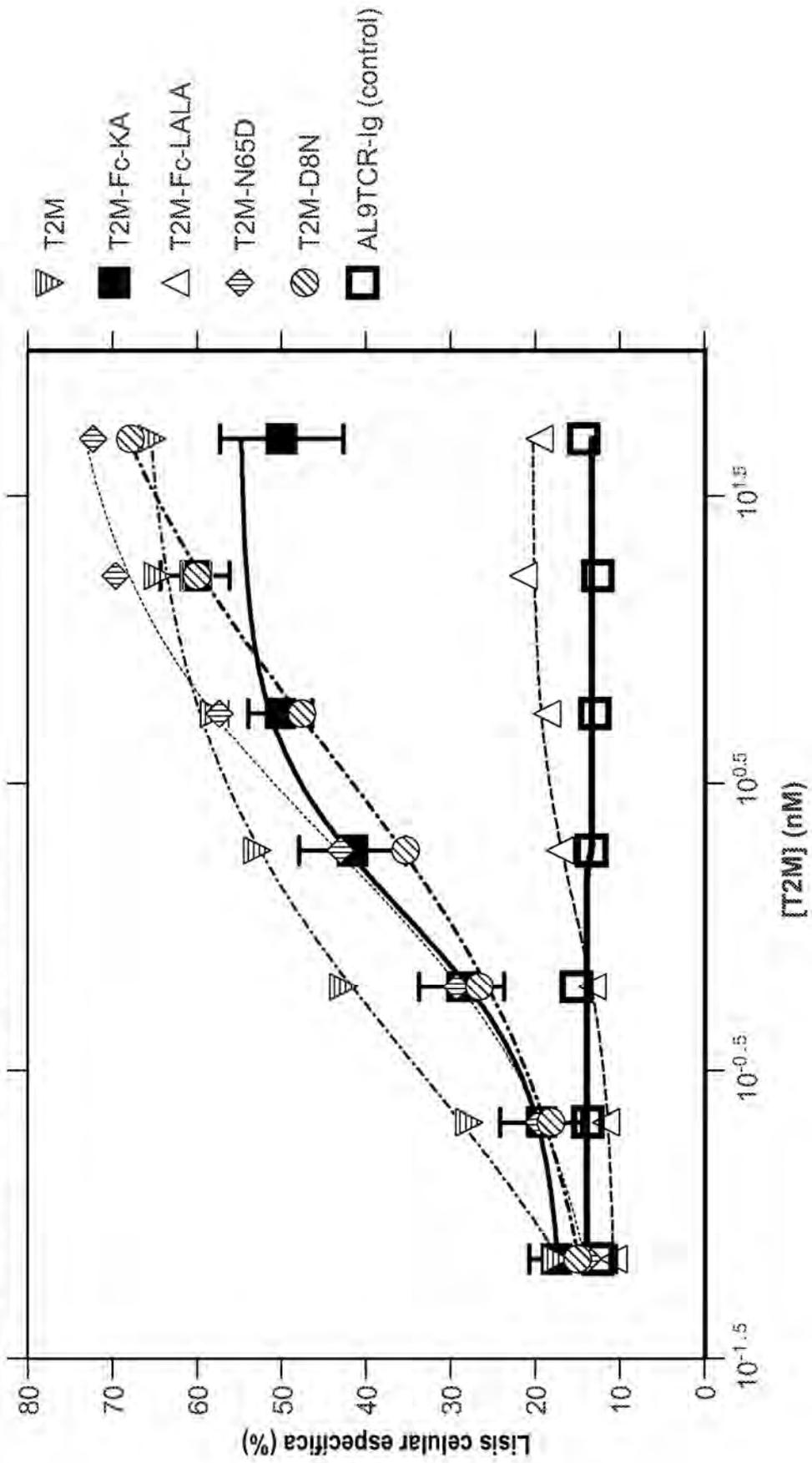


FIG. 30

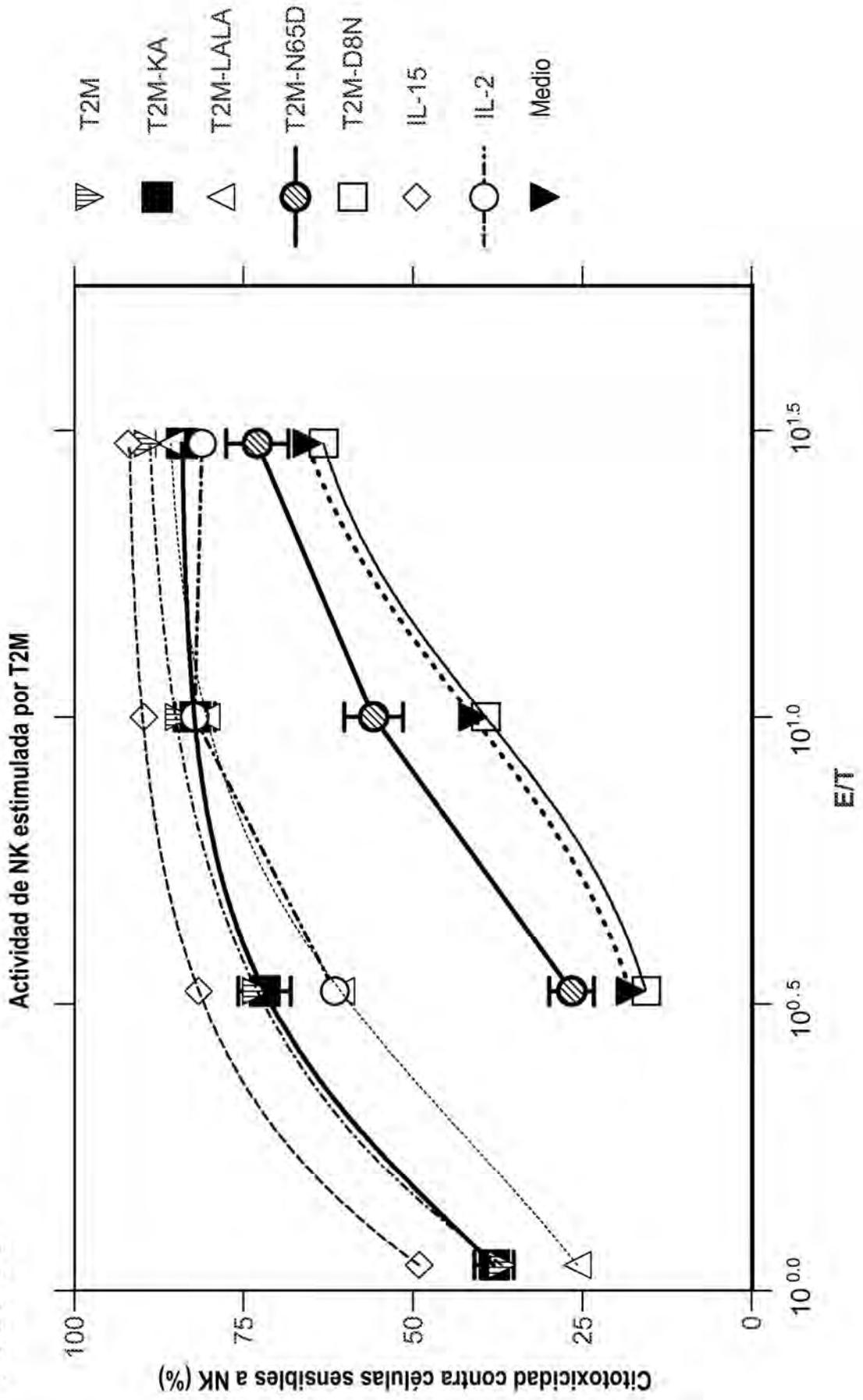


FIG. 31A FIG. 31B

FIG. 31

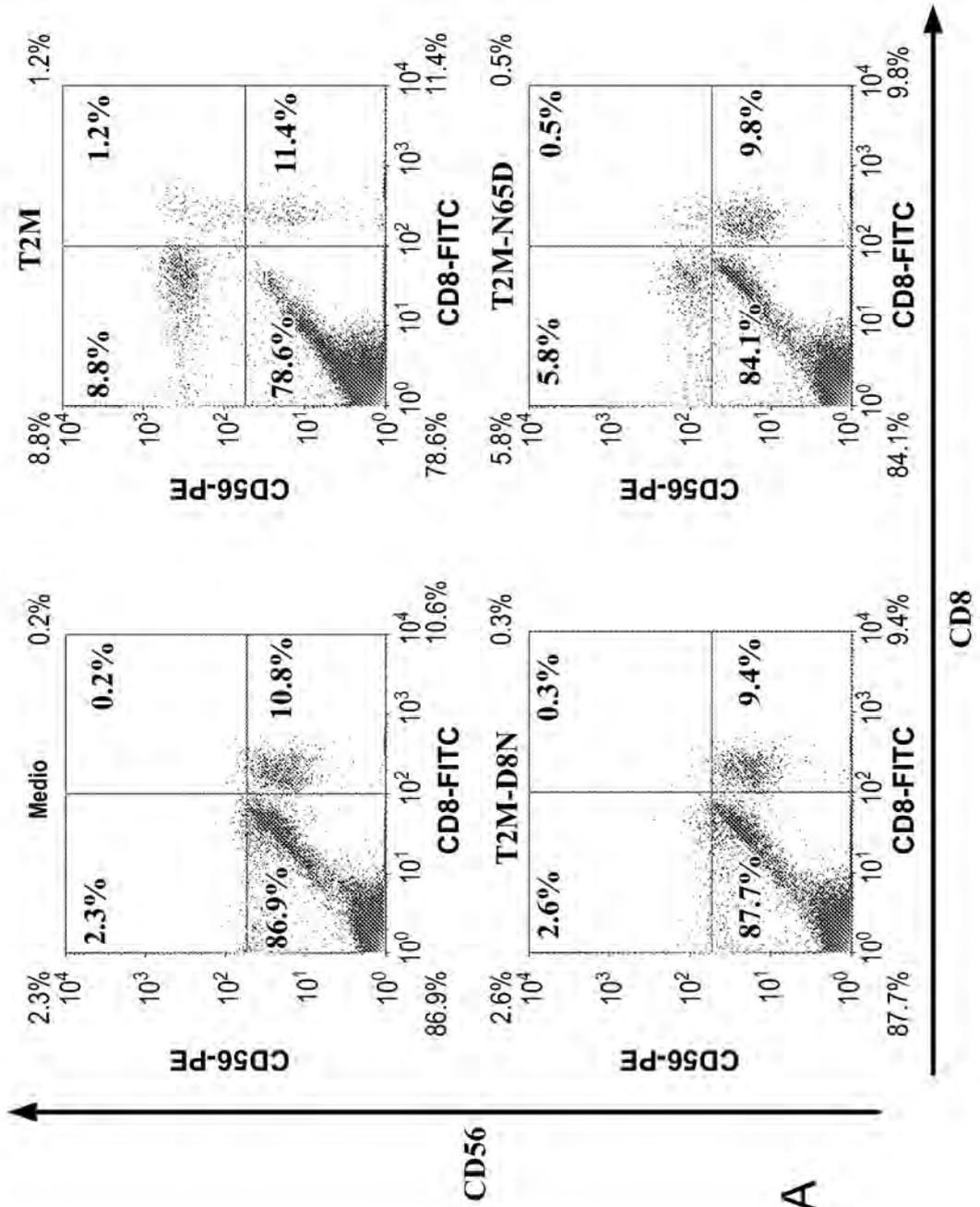


FIG. 31A

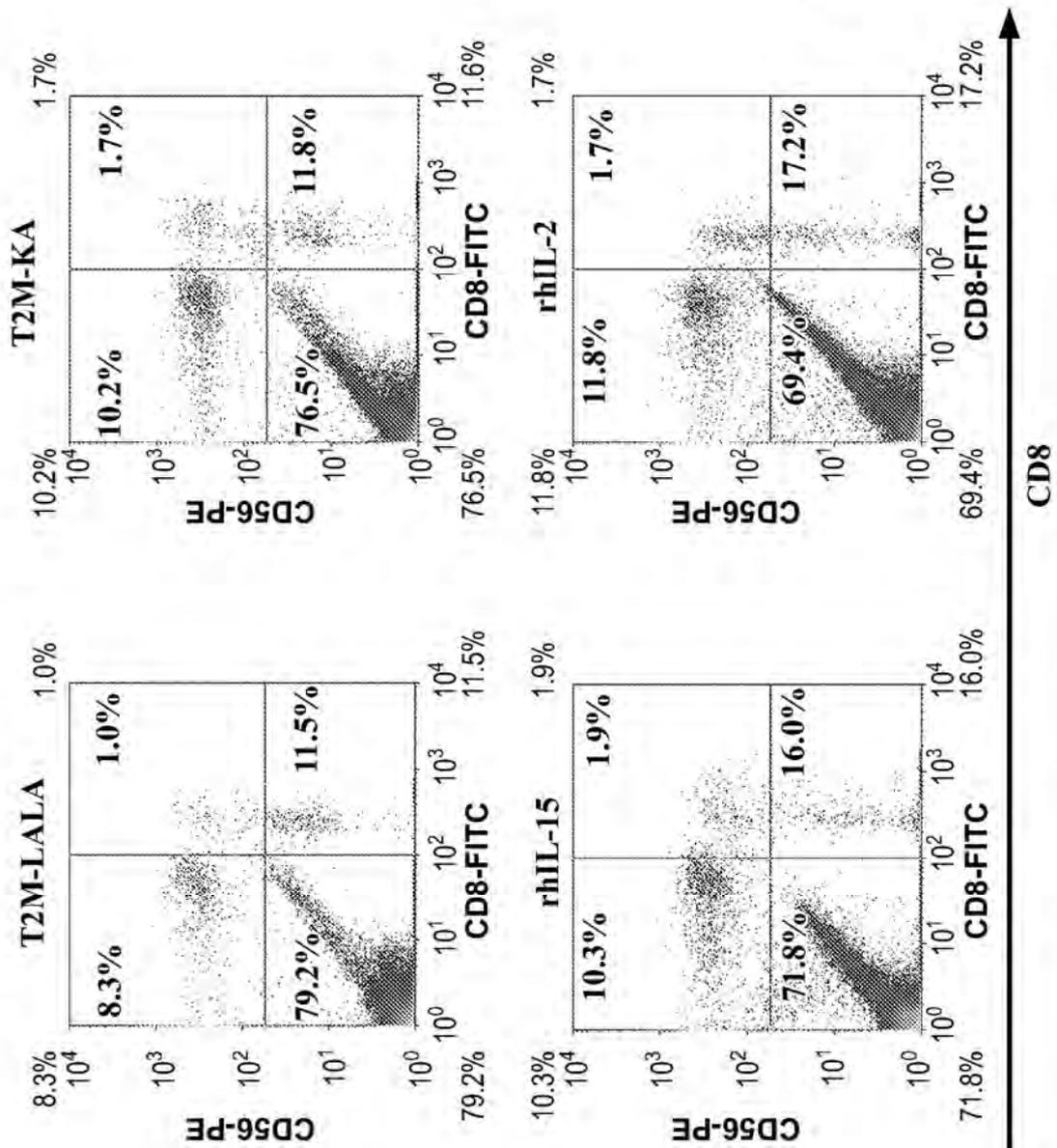


FIG. 31B

FIG. 32A

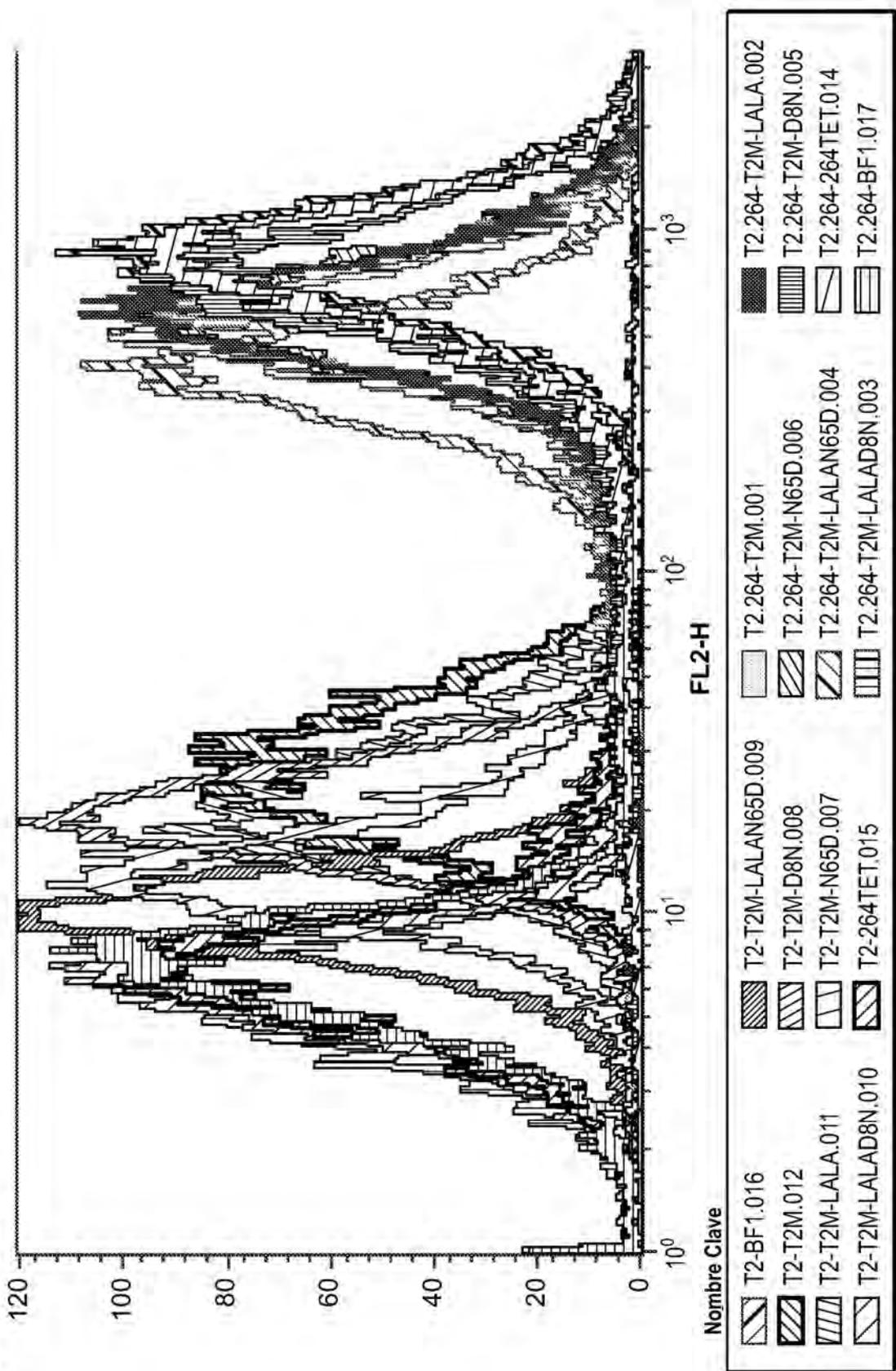


FIG. 32B

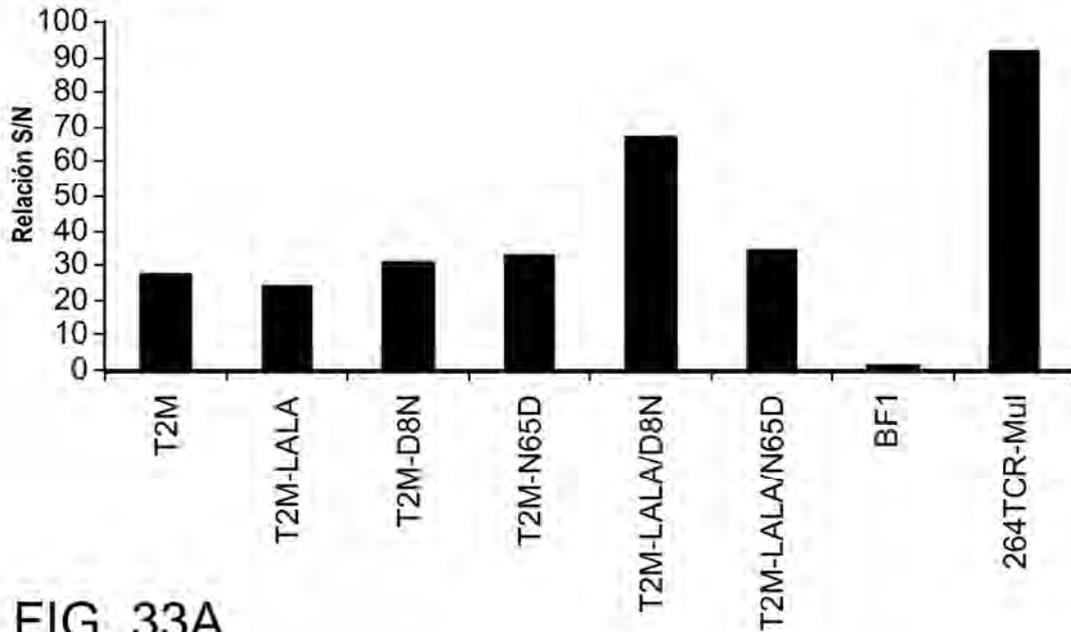
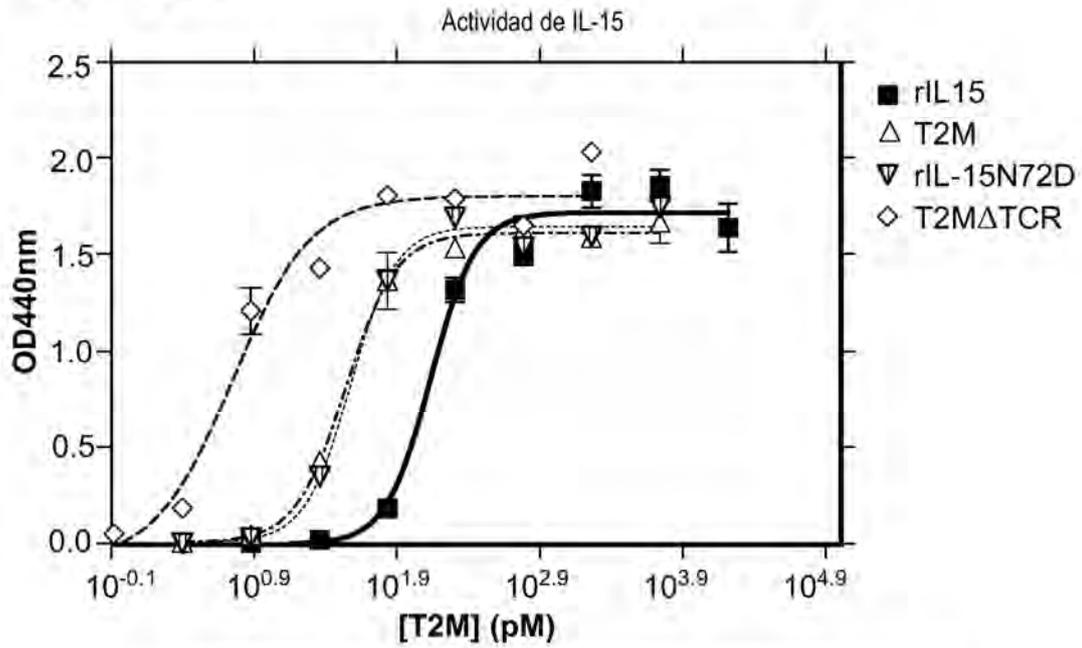


FIG. 33A



Proteínas	EC ₅₀ (pM)	Actividad relativa (%)	Actividad relativa (%)
rIL-15	136.7	100	28
rIL-15N72D	37.64	363	100
T2M	34.77	393	108
T2MΔTCR	5.633	2428	668

FIG. 33B

Incremento en nº de veces =
 % células en medio + tratadas con T2/
 % células en medio solo

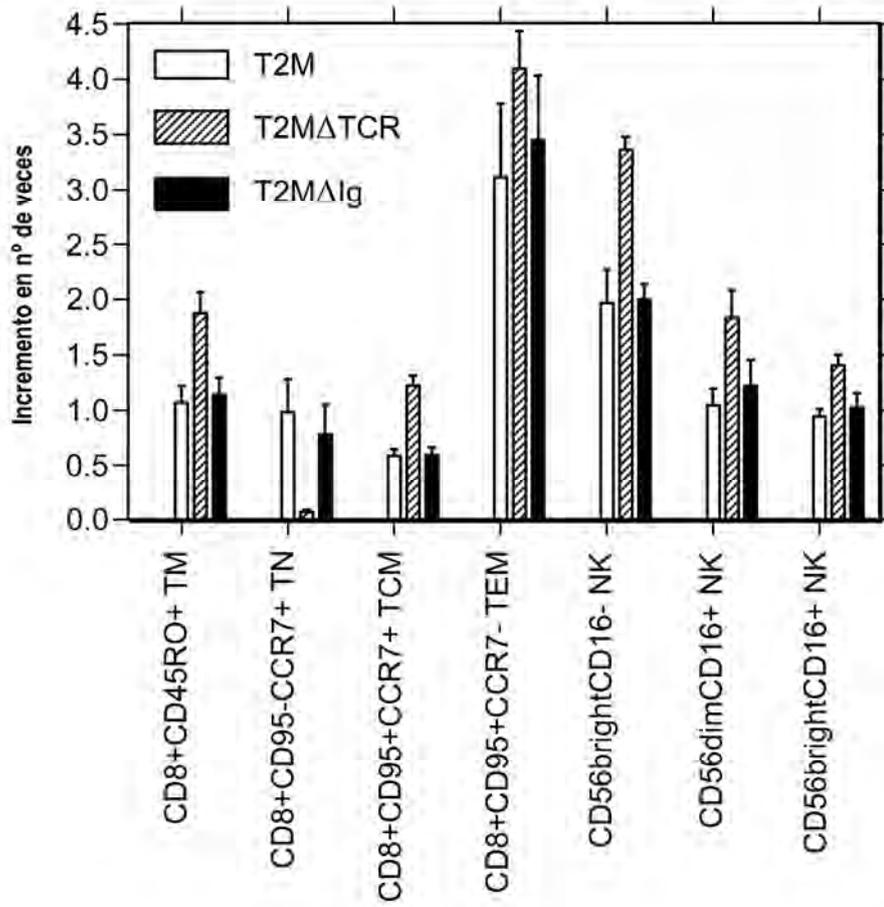
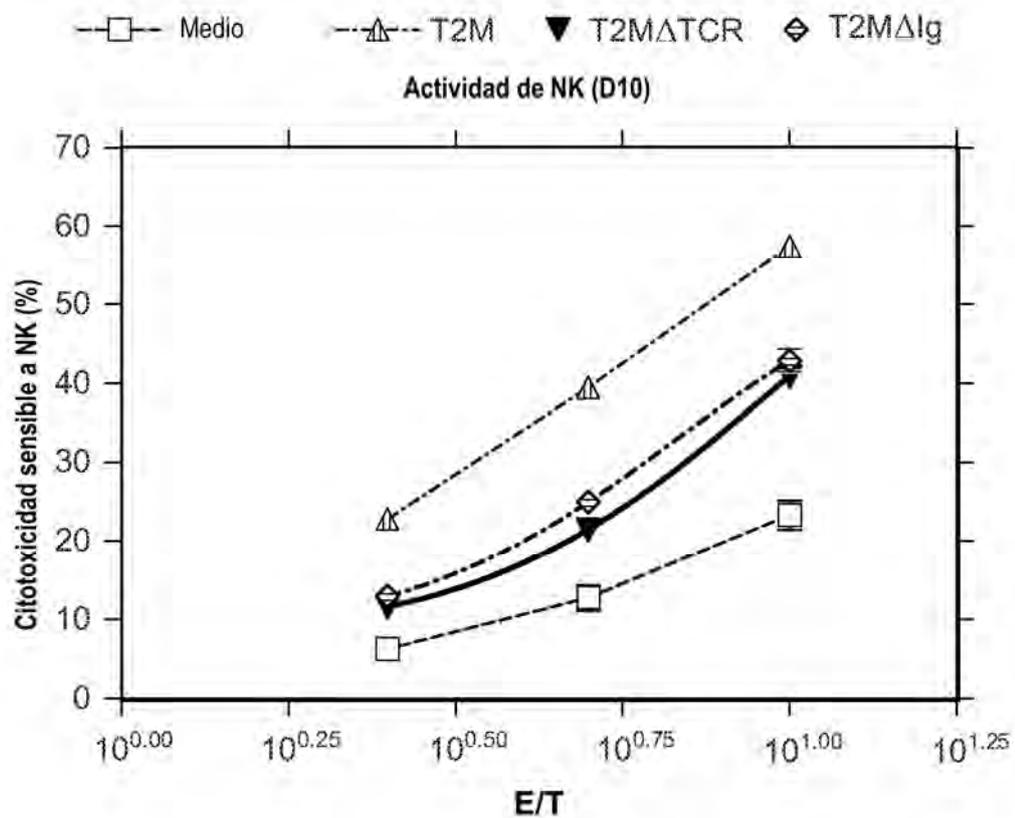
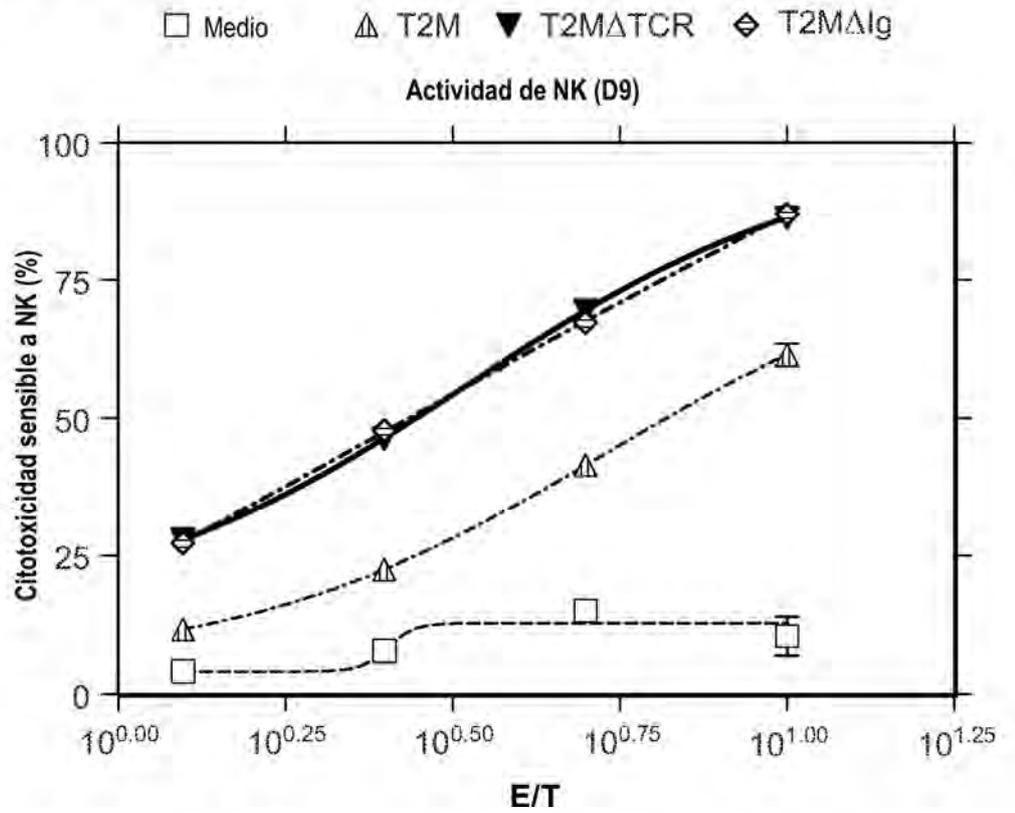
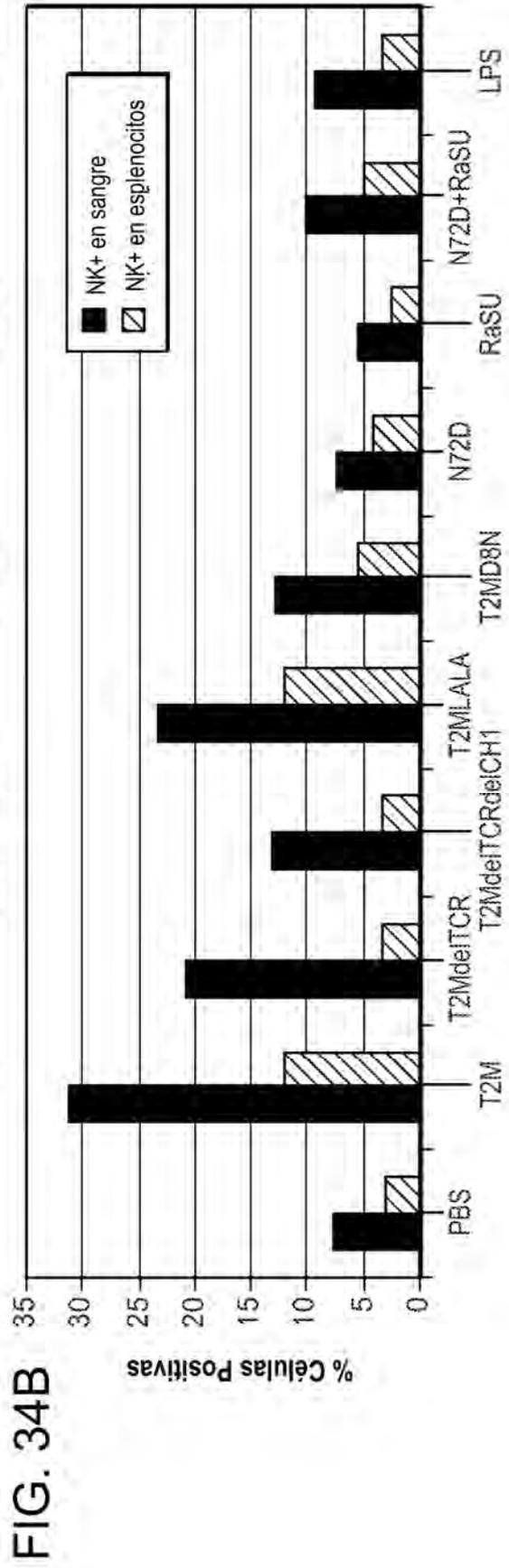
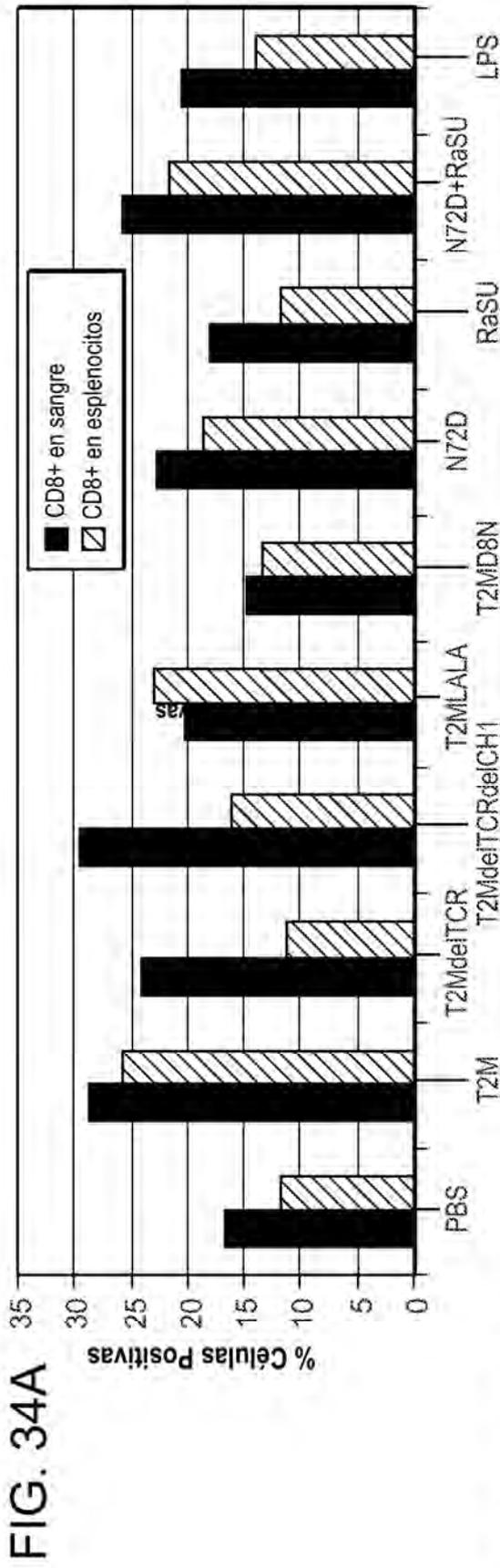


FIG. 33C





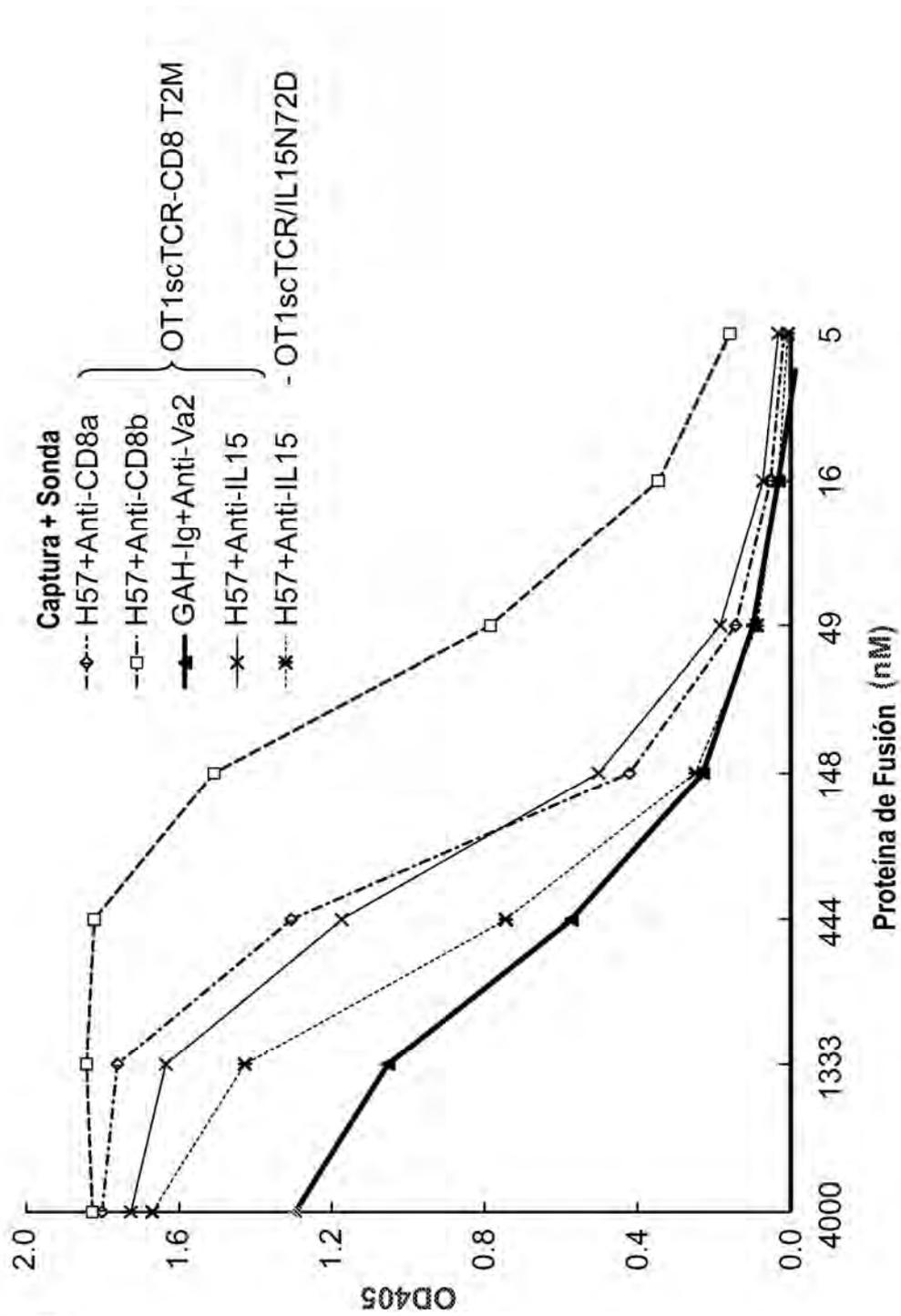
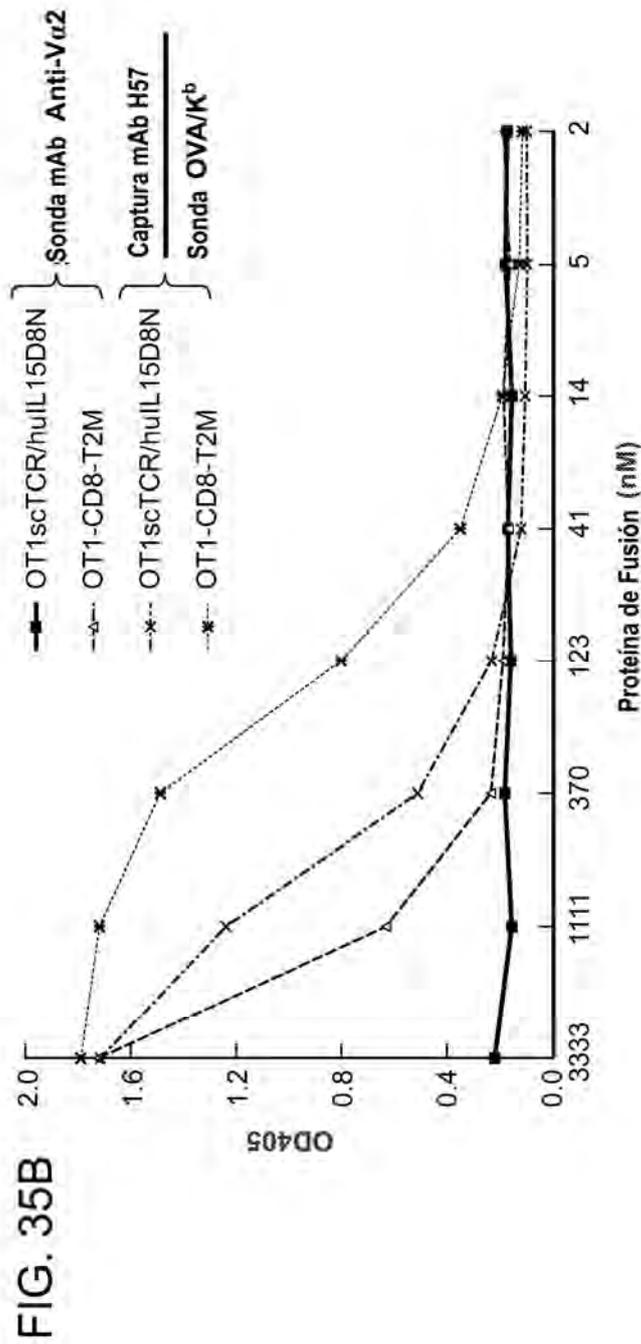


FIG. 35A



Dímero c264scTCR

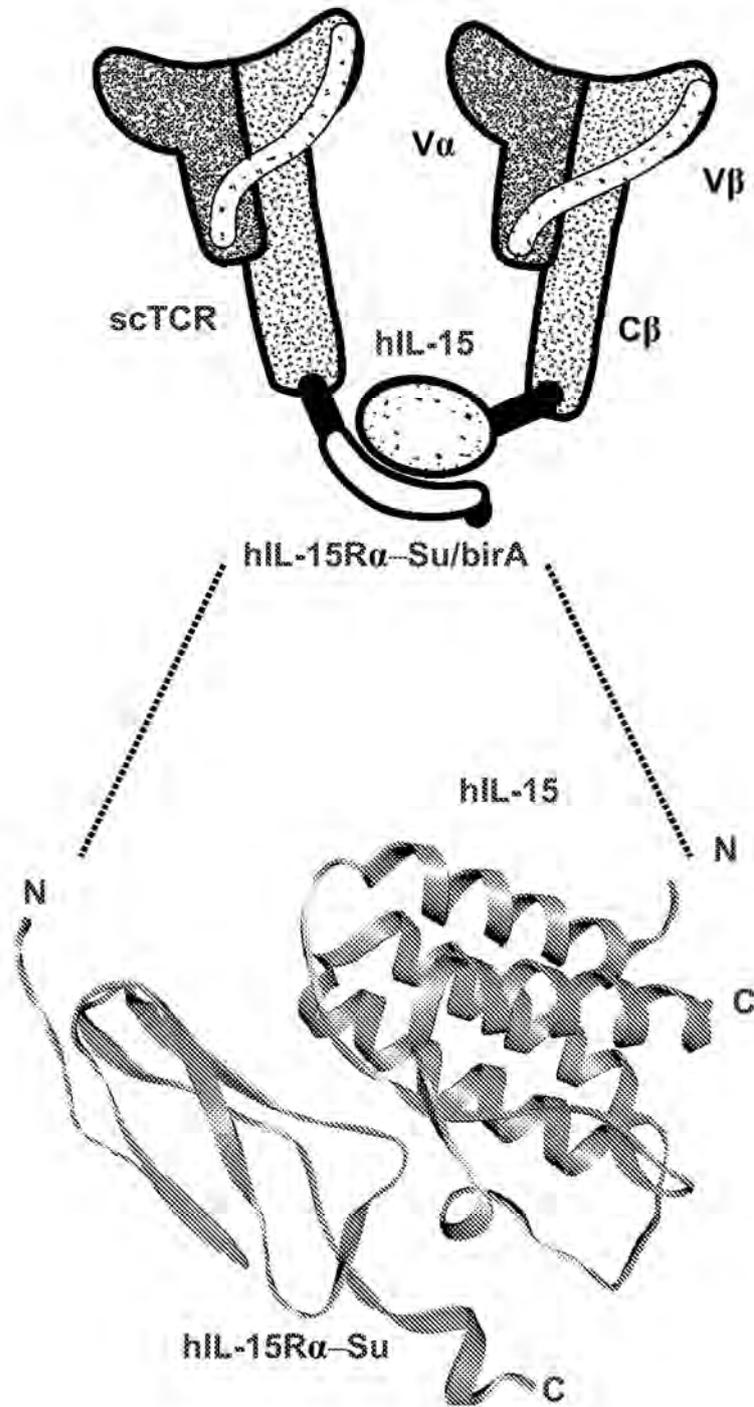


FIG. 36A

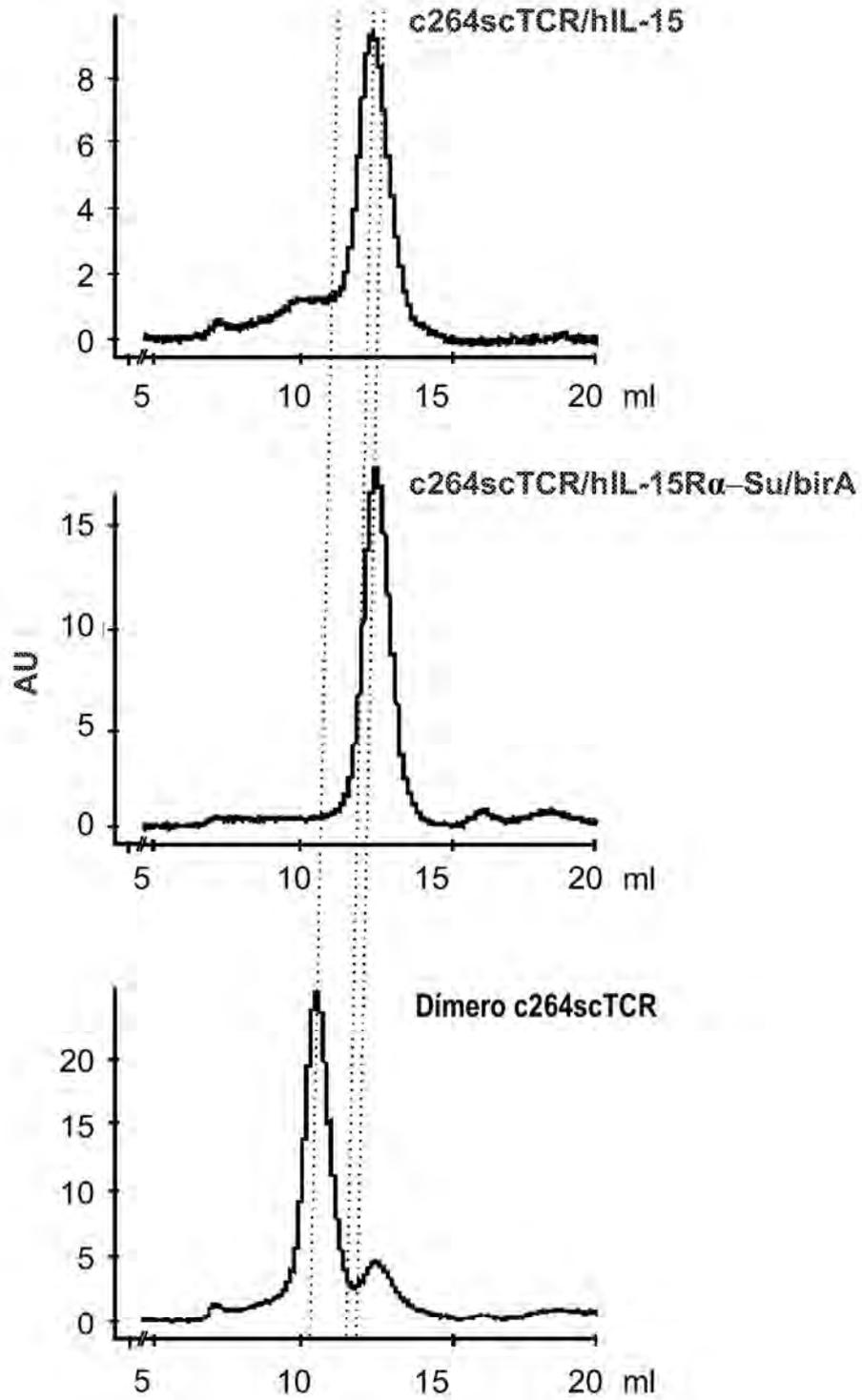


FIG. 36B

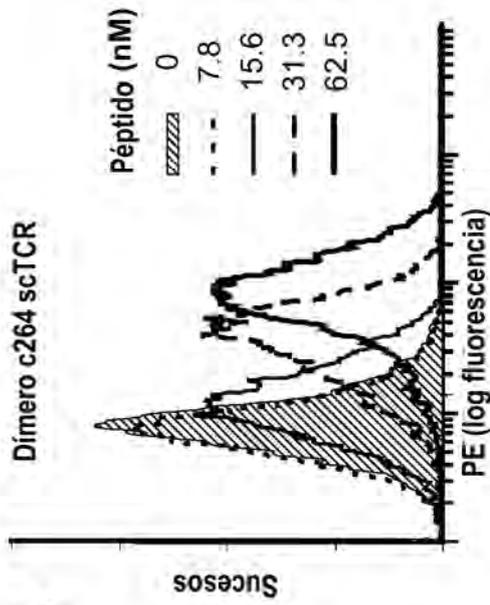


FIG. 37B

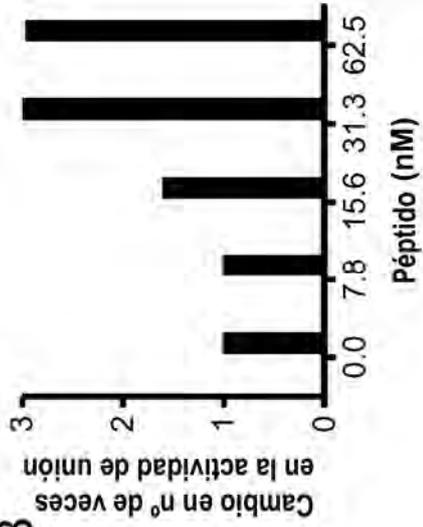


FIG. 37A

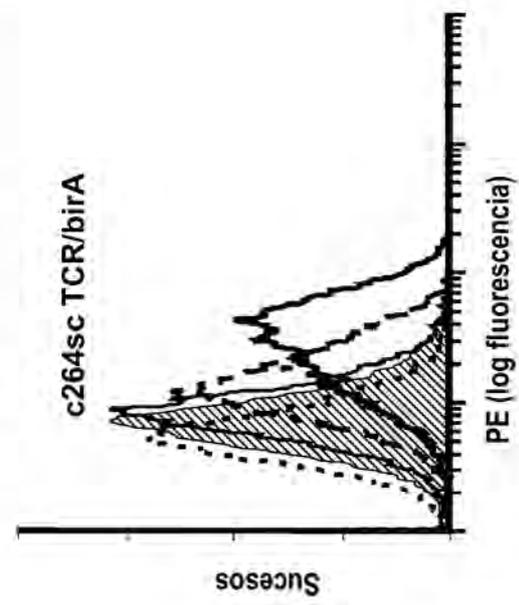
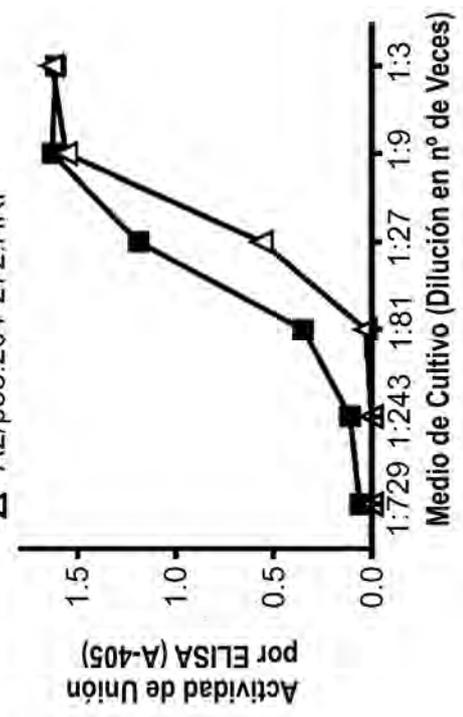


FIG. 37C



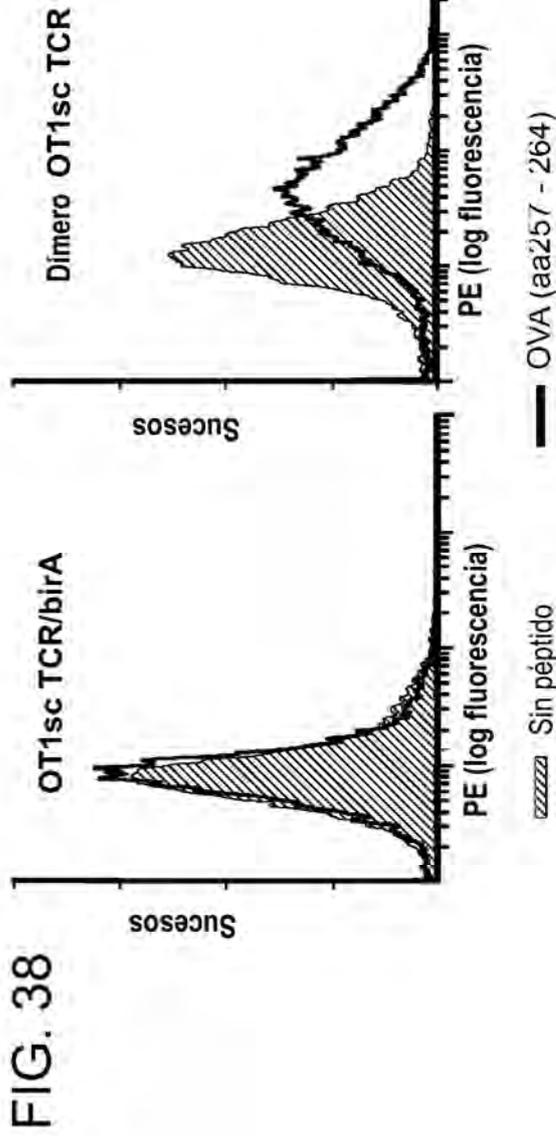


FIG. 39A

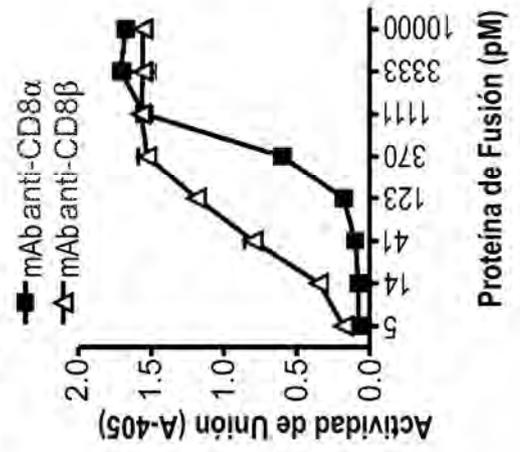


FIG. 39B

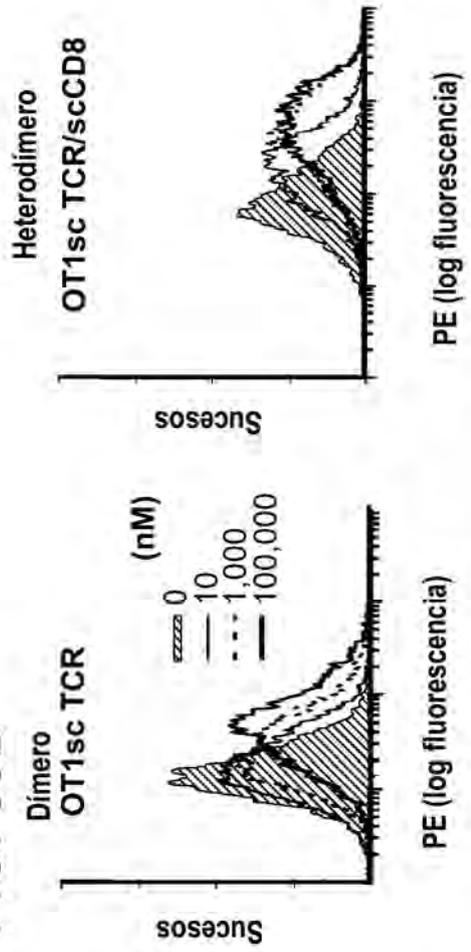


FIG. 40B

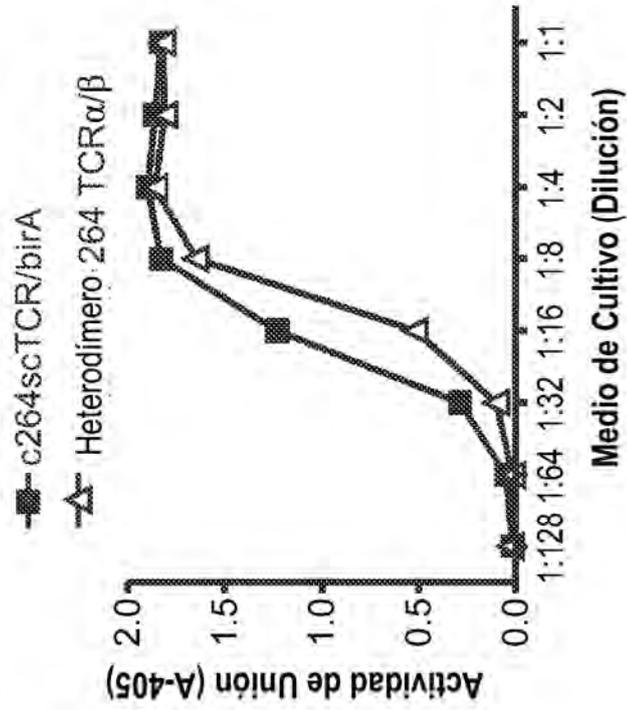


FIG. 40A

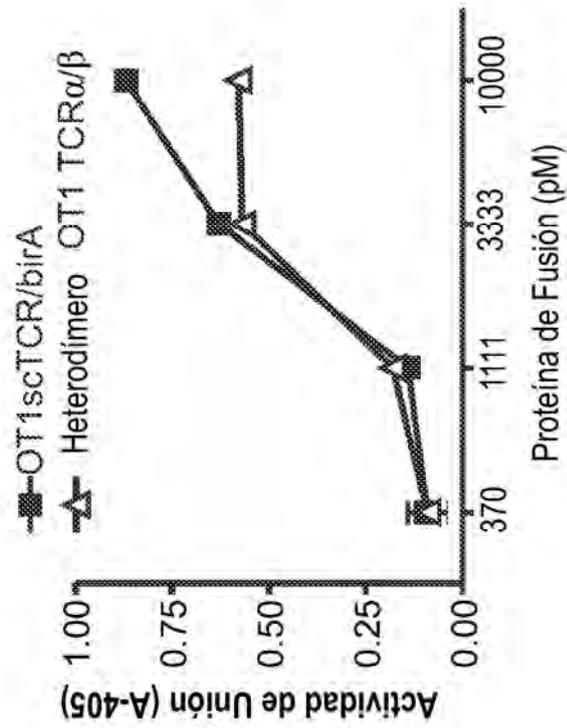
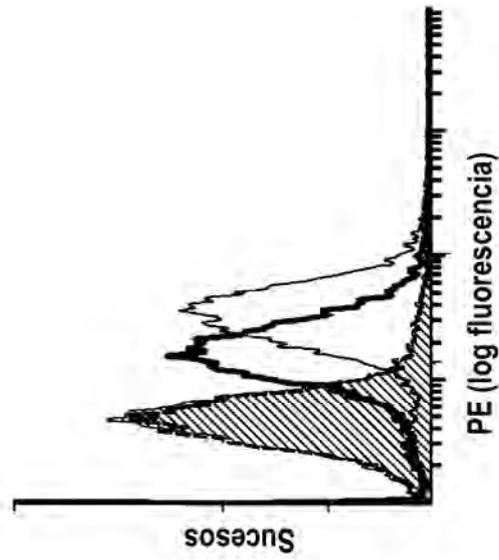
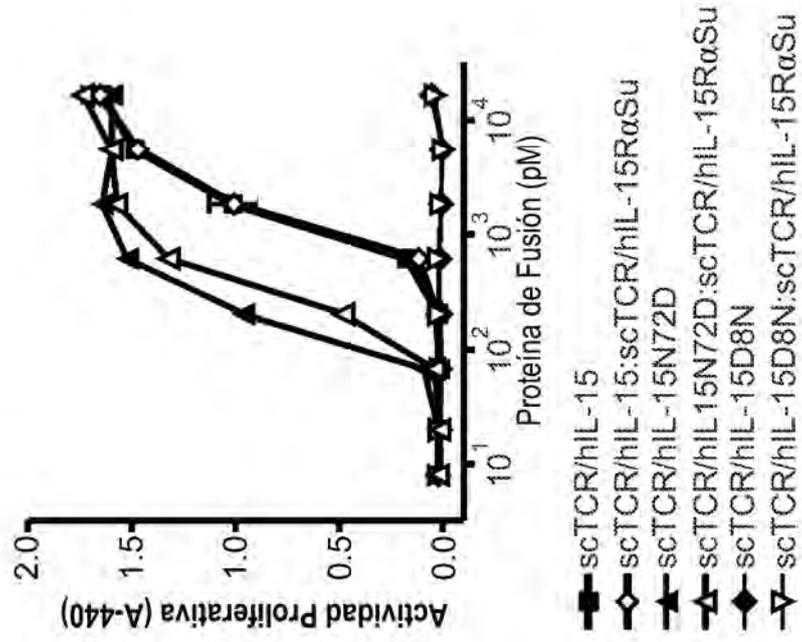


FIG. 41A



- 2° Ab solo
- scTCR/hIL-15-scTCR/hIL-15R α /Su
- scTCR/hIL-15N72D:scTCR/hIL-15R α /Su
- scTCR/hIL-15D8N:scTCR/hIL-15R α /Su

FIG. 41B



- scTCR/hIL-15
- ◇ scTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su
- ▲ scTCR/hIL-15N72D
- △ scTCR/hIL15N72D:scTCR/hIL-15R α Su
- ◆ scTCR/hIL-15D8N
- ▽ scTCR/hIL-15D8N:scTCR/hIL-15R α Su

FIG. 42

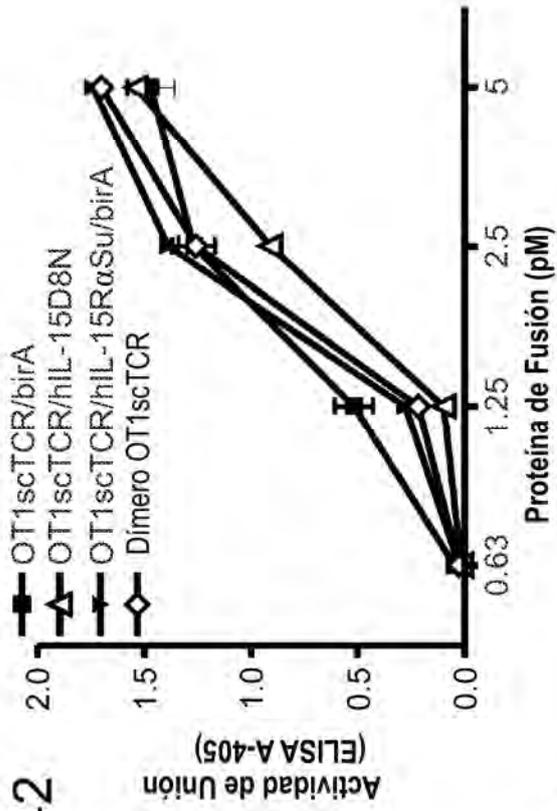
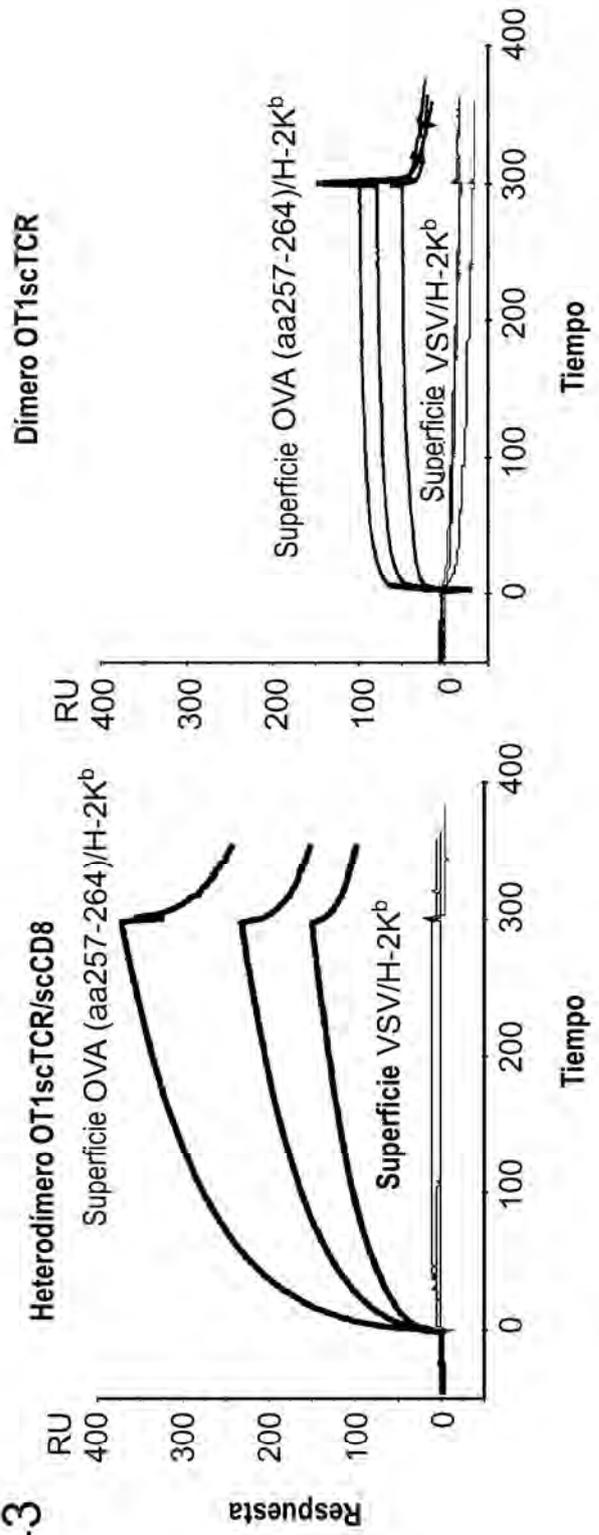
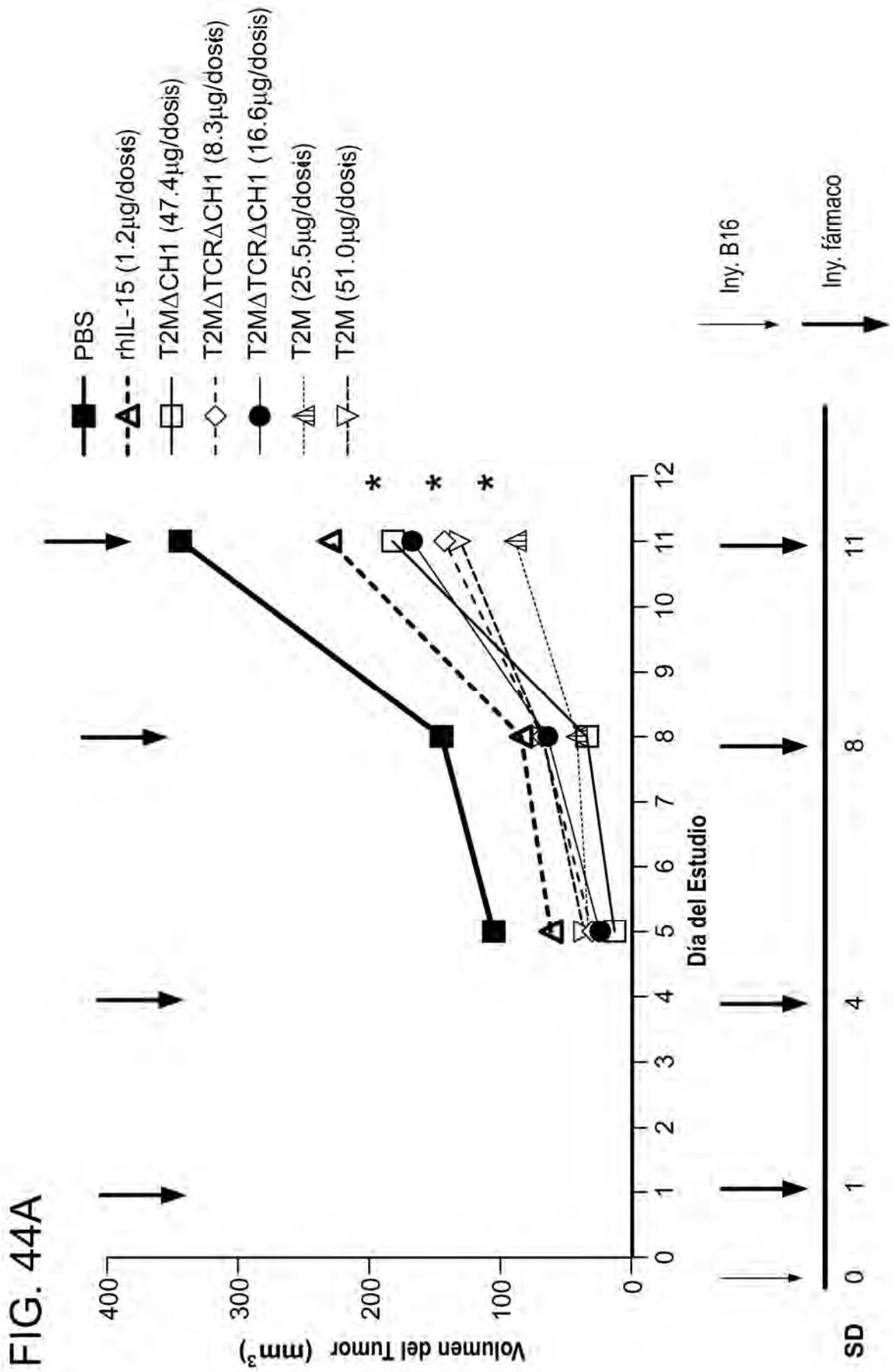


FIG. 43





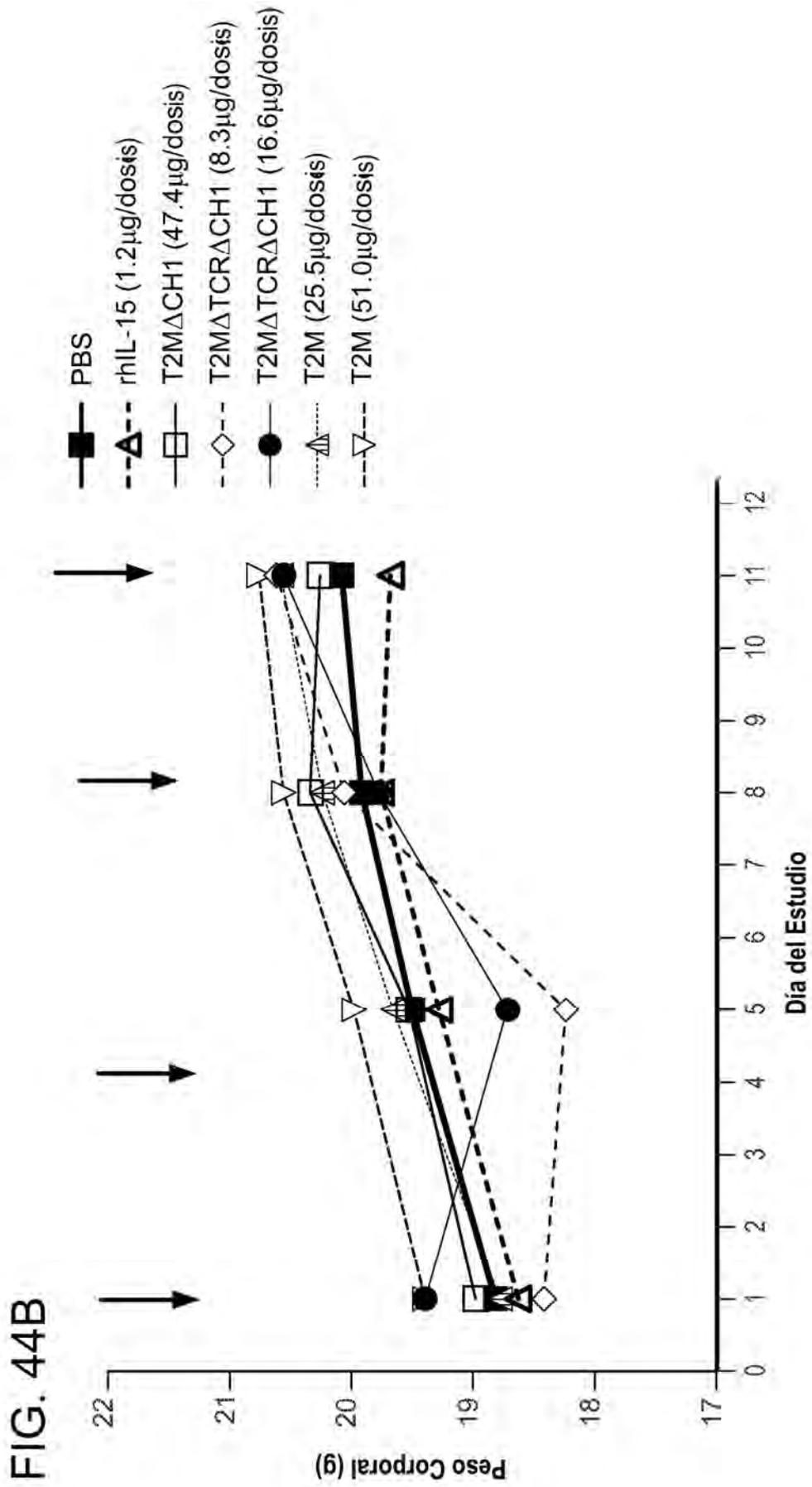


FIG. 45A

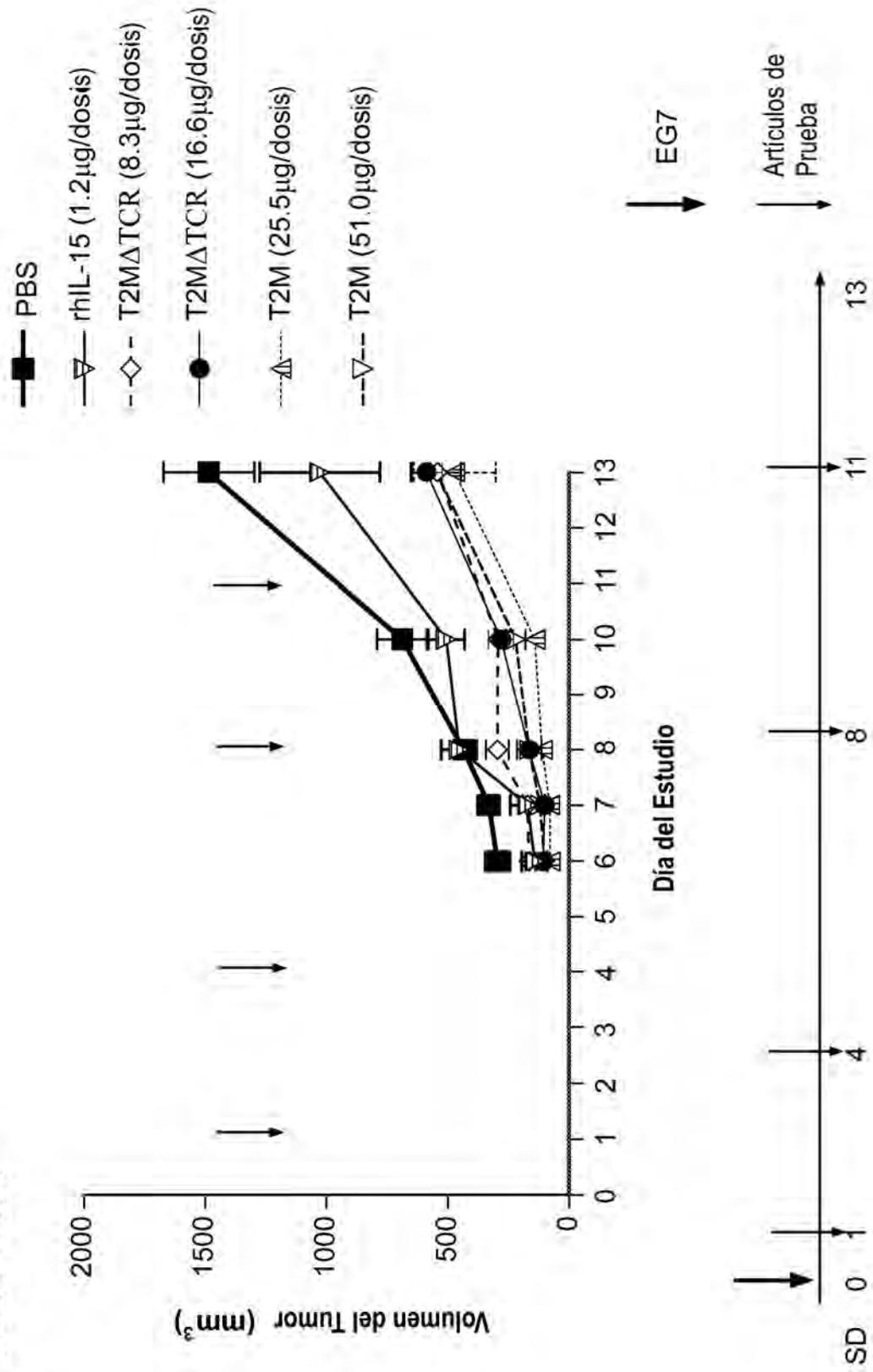


FIG. 45B

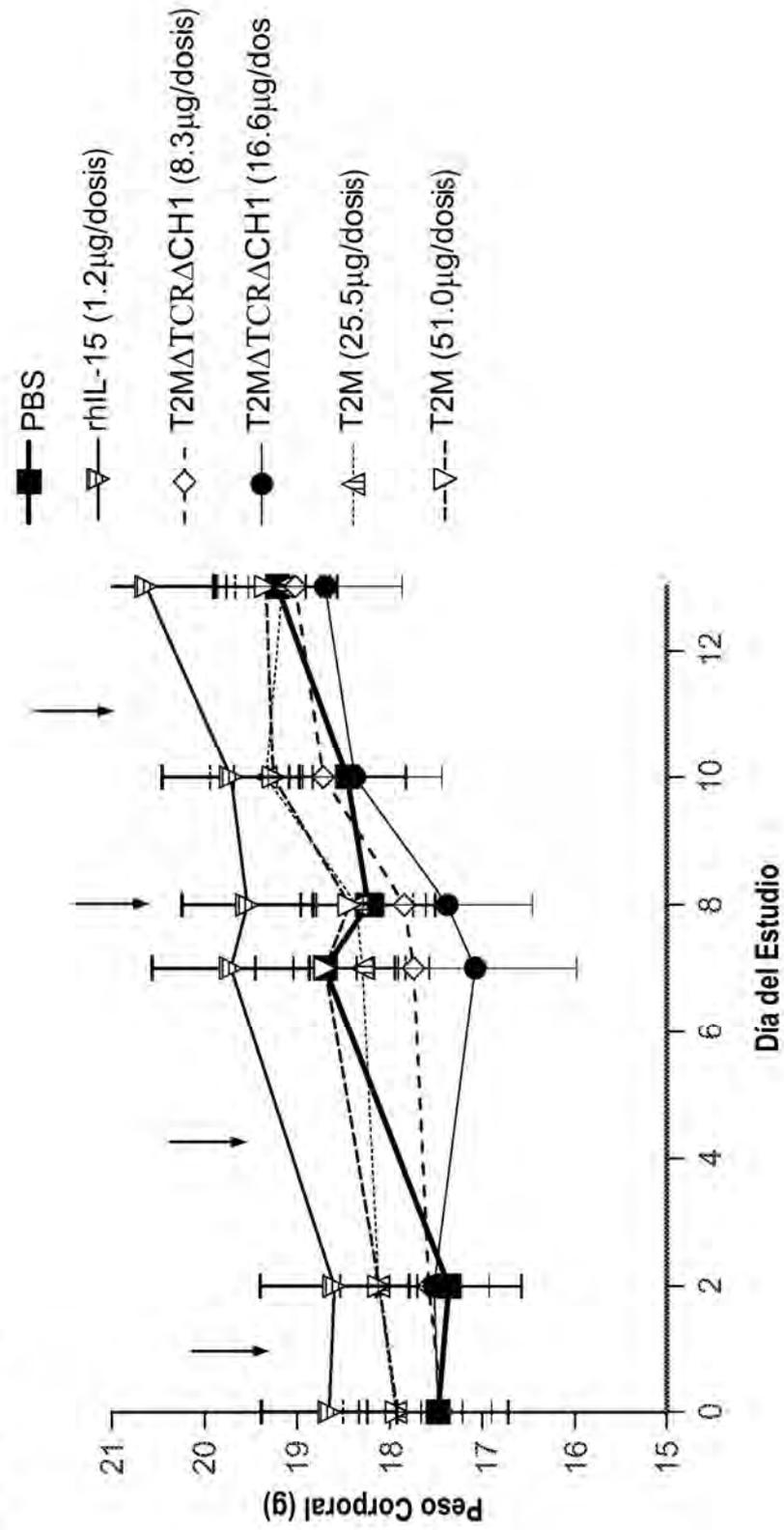


FIG. 46 epkscdkthtcppcpape1lggpsv1fppkpkdt1m1srtpevtcvvvdvshedpevkfnw
yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsv1tlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiska
kgpprepqvylppsrde1tknqvs1tc1vkgfypsdiavewesngqpennykttppv1dsd
gsfflysk1tvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqks1slspgk

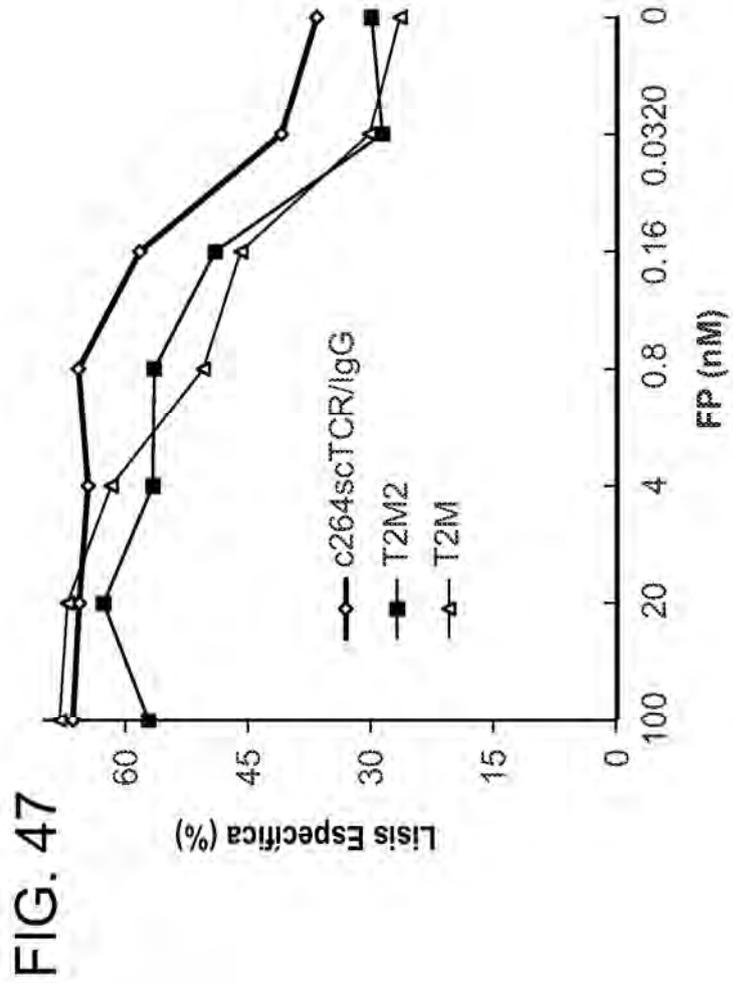


FIG. 48A

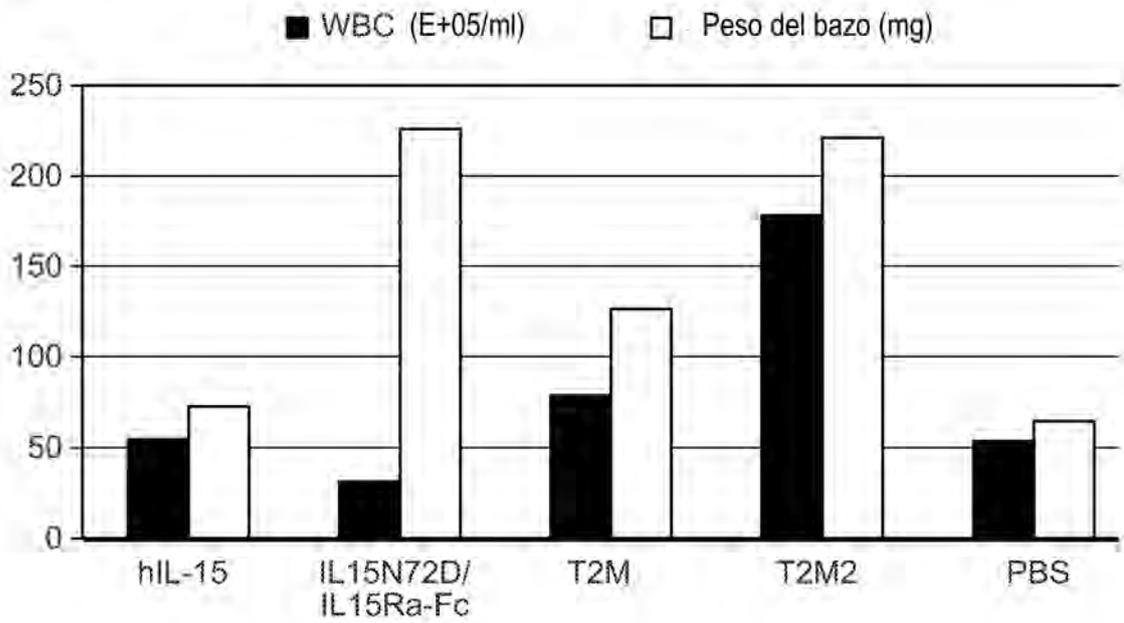
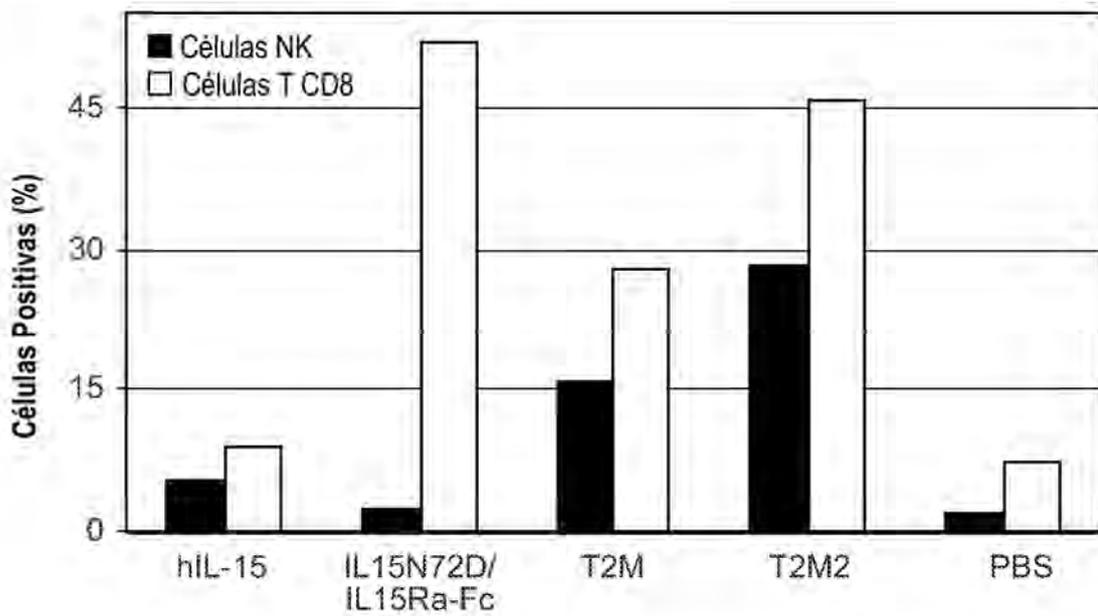


FIG. 48B



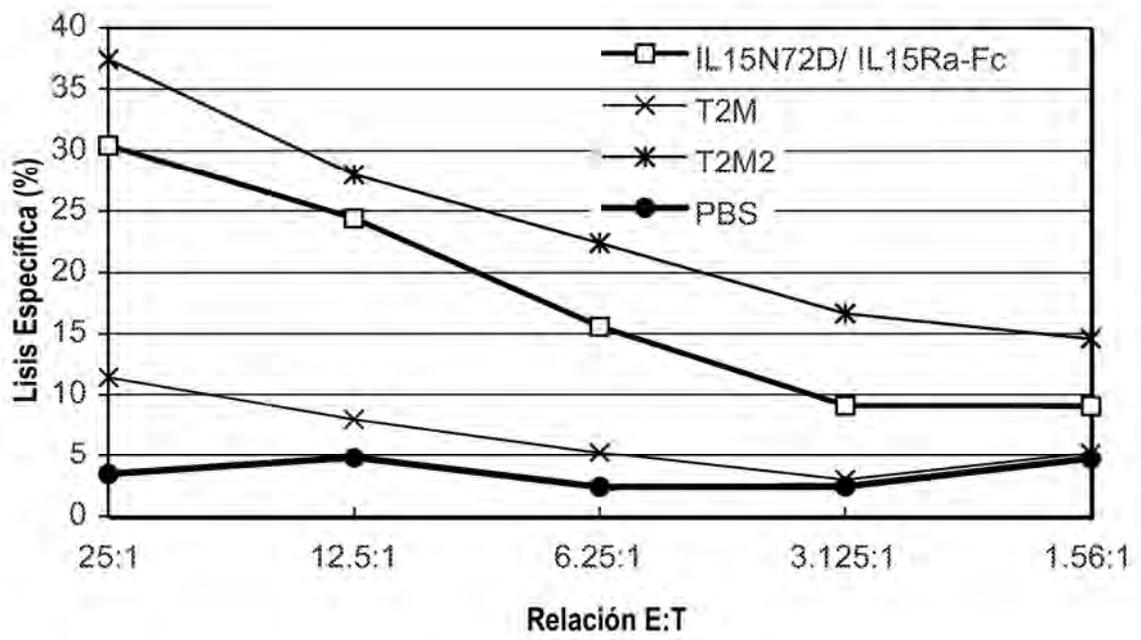


FIG. 48C

FIG. 49A

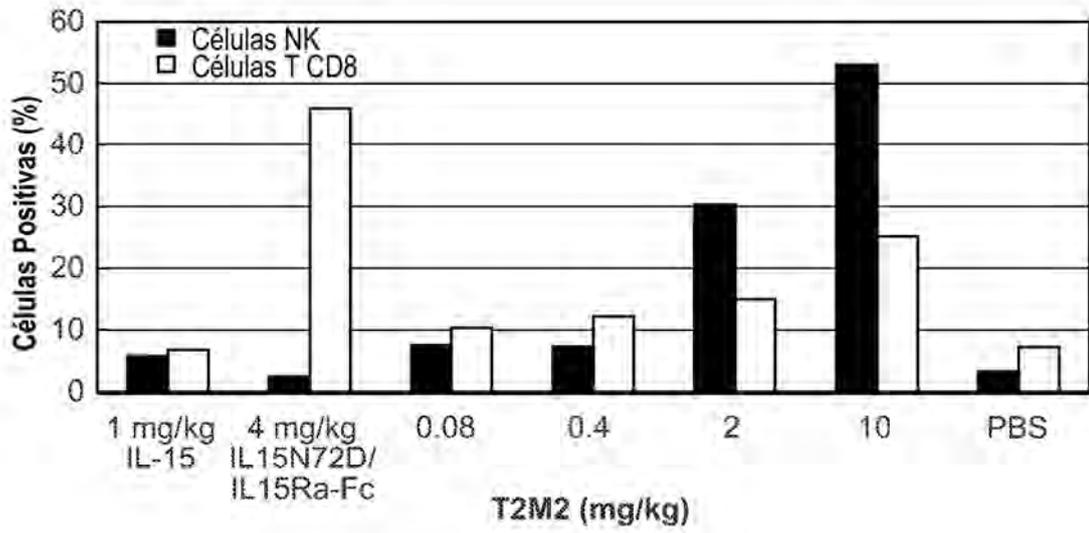


FIG. 49B

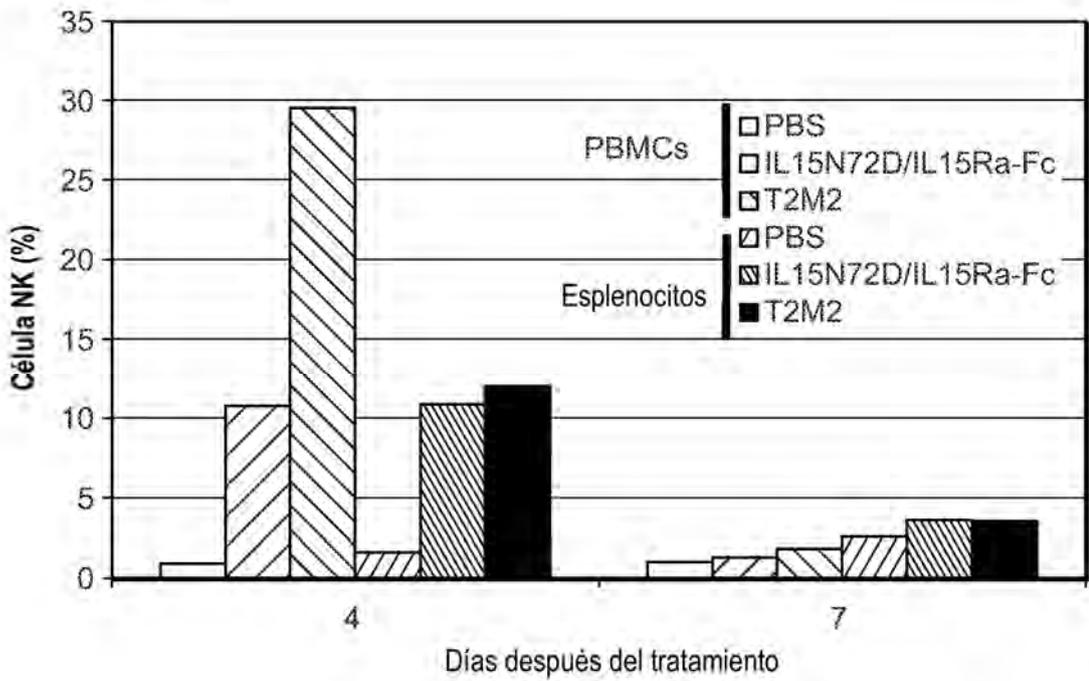


FIG. 50A

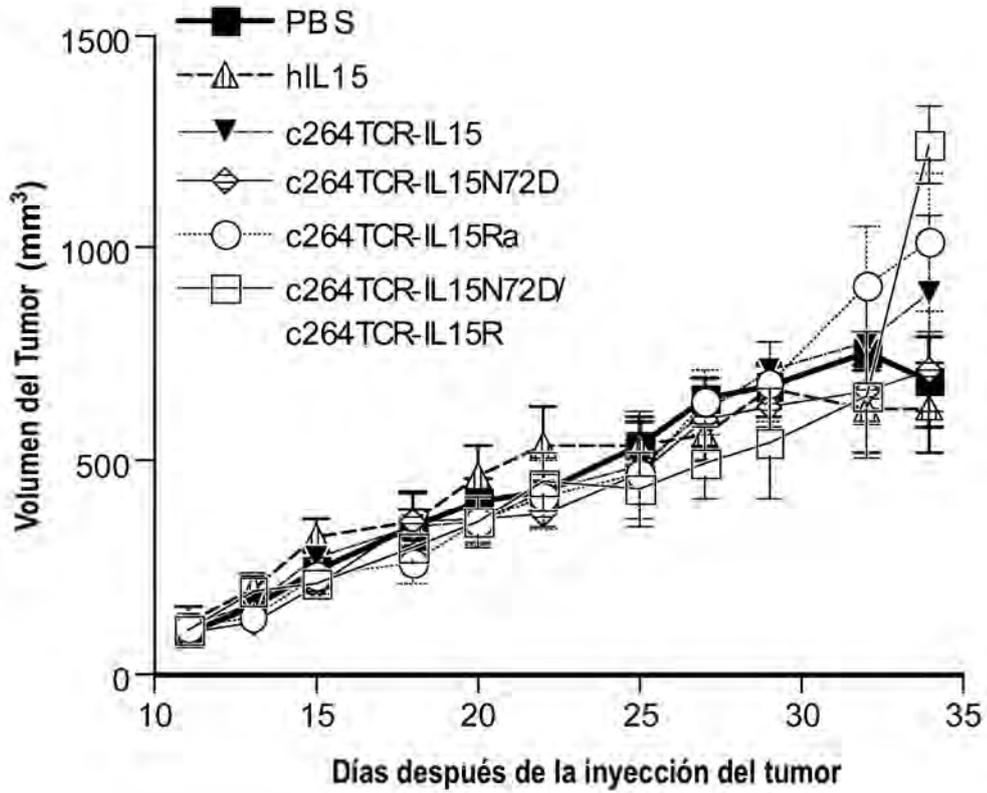
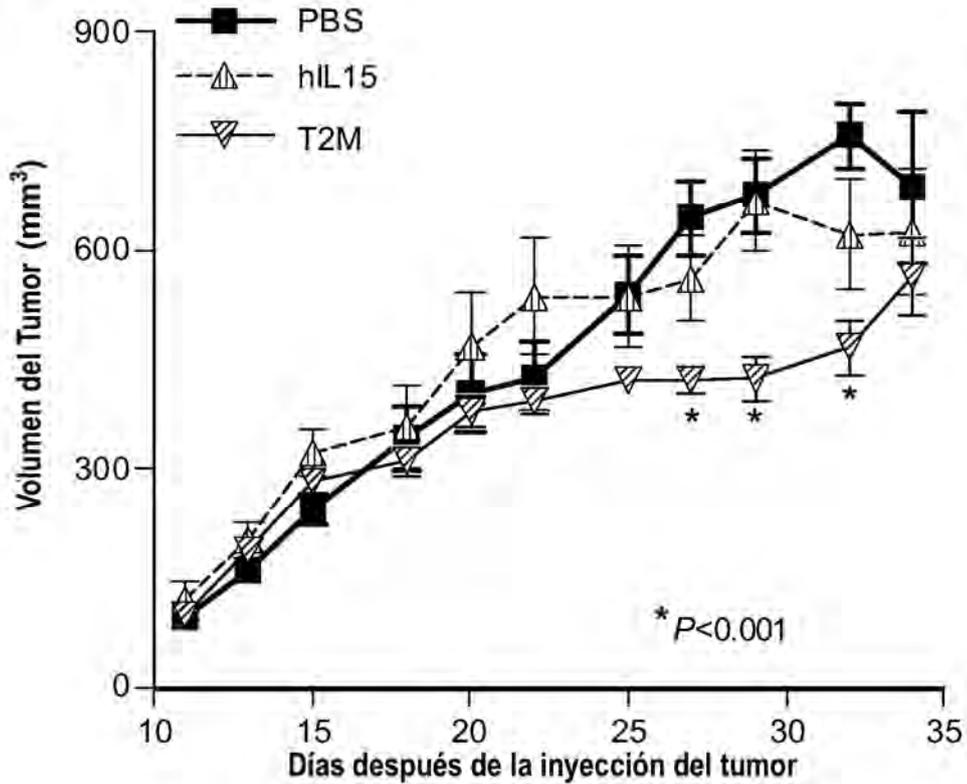


FIG. 50B



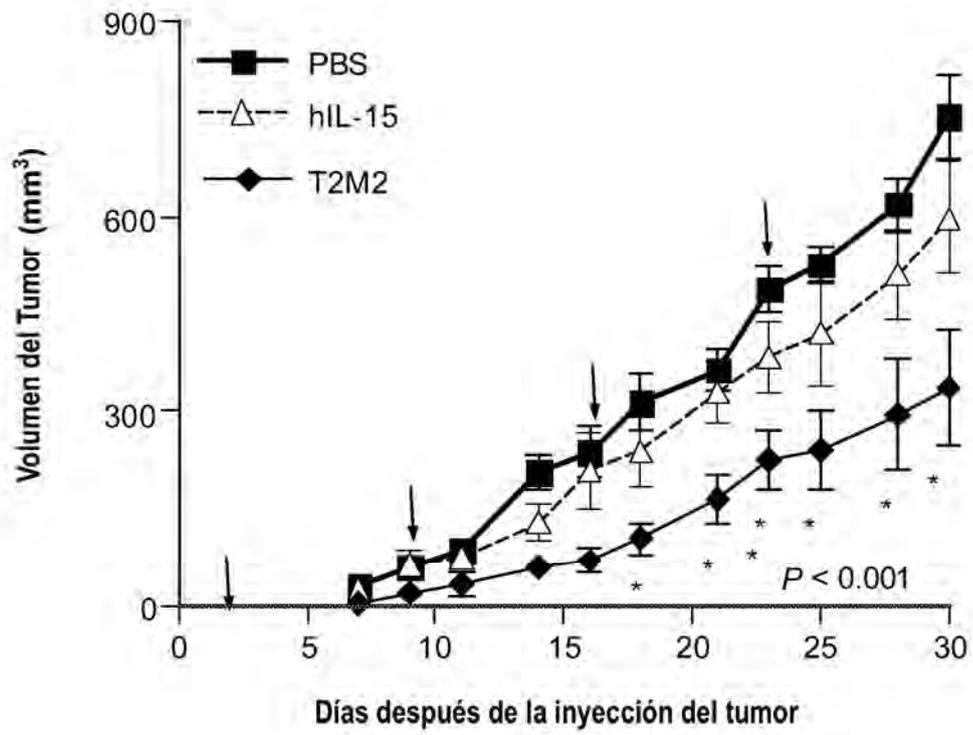


FIG. 50C

FIG. 51

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGG
 < sec. líder

TTCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTG
 >< c264scTCR

AAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
 TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCT
 CAAGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGG
 CTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTG
 CACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAA
 CTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACA
 CTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTCCGGTGGCGGCGGTCT
 GGCGGTGGCGGTTCCCTCGAGCAATTCAAAGTCATTCAGACTCCAAGATA
 TCTGGTGAAAGGGCAAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAA
 AGGGACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTT
 AAATTTTTGATTAACCTTTCAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACAT
 GACTGAAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTTGCAGCC
 TAGAAATTCAGTCCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCC
 AGCAGTCTGTCAGGGGGCGGCACAGAAGTCTTCTTTGGTAAAGGAACCAG
 GCTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTG
 TGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCCACTG
 GTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTG
 GGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCC
 TCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGC
 CTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTG
 TCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATA
 GGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCA
 GACATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGT
 >< dominio sushi de IL-15R α humana

CAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTT

FIG. 51 (Continuación)

TCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAG
GCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGAGA

><

GCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG

Dominio CH2CH3 (Fc) de IgG1 humana

AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

>

FIG. 52

qsvtqpdarvtvsegaslqlrckysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyysgdpvvqgvn
 < c264scTCR

gfeaefsksnssfhlrkasvhwsdsavyfcvlsedsnyqliwgsgtkliikpdtsggggs
 ggggsggggsggggssnskviqtprylvkgggqkakmrcipekghpvvfwyqqnknef
 kflinfqnqevlqqidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtev
 ffgkgtrltvvedlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwng
 kevhsqvstdpqpakeqpalndsryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendew
 tqdrakpvtqivsaeawgraditcppedmsvehadiwvksyslysreryicnsgfkrkagt
 >< dominio sushi de IL-15R α humana

ssltecvlnkatnvahwttpslkcirepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkd
 >< Dominio CH2CH3 (Fc) de IgG1 humana

tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl
 hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeitknqvsiltclv
 kgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmh
 ealhnhytqkslslspgk
 >

FIG. 53

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
 < sec. líder
 CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
 ><
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
 dominio V de cadena ligera de anti-CD20
 GTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACC
 CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
 CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGTGGAGGTGGCGGAT
 >< conector
 CAGGAGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGGAGTCAGGTACAACCTGCAGCAG
 ><
 CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAA
 dominio V de cadena pesada de anti-CD-20
 GGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGA
 CACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGT
 GATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
 ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
 TACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAAACCTG
 ><
 GGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
 IL-15N72D humana
 TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGC
 AAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACT
 TGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCC
 TAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGC
 AAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAG
 TTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA
 >

FIG. 54

```
qivlsqspailsaspgekvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkiwiyatsnlasgvpvr  
<                               dominio V de cadena ligera de anti-CD20  
fsgsgsgtsysltisrveaadaatyycqqtwnpftfgggtkleiksgggsgggsggg  
                               ><                               conector  
gsqvqlqqpgaelvkpgasvkmsckasgytfts ynmhwvkqtpgrglewigaiypngdt  
><                               dominio V de cadena pesada de anti-CD-20  
syngkfkgtatltadkssstaymqlssltsedsavyycarstyyggdwyfdvwgagttvt  
vsanwvvisdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvislesgda  
><                               IL-15N72D humana  
sihdtvenliilandslssngnvtsgckeceeleeknikeflqsfvhivqmfiints  
>
```

FIG. 55

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
 < sec. líder
 CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
 ><
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
 dominio V de cadena ligera de anti-CD20
 GTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACC
 CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
 CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGTGGAGGTGGCGGAT
 >< conector
 CCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTCAGGTACAACCTGCAGCAG
 ><
 CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAA
 dominio V de cadena pesada de anti-CD-20
 GGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGA
 CACCTGGTTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGT
 GATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
 ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
 TACTTCRATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACMGTCTCTGCAATCAC
 ><
 GTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCT
 dominio sushi de IL-15R α humana
 ACAGCTTGTA CTCCAGGGAGCGGTACATTTGTA ACTCTGGTTTCAAGCGT
 AAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGTAACAAGGCCACGAA
 TGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGAGAGCCGAAAT
 ><

FIG 55 (Continuación)

CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG
Dominio CH2CH3 (Fc) de IgG1 humana
GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA
>

FIG. 56

qivlsqspailsaspgkvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkipwiyatsnlasgvpr
<
dominio V de cadena ligera de anti-CD20
fsgsgsgtsysltisrveadaatyycqqtwnpftfgggtkleiksgggsgggsggg
>< conector
gsqvqlqqpaelvkpgasvkmsckasgytftsynmhwkqtpgrglewigaiypngdt
>< dominio V de cadena pesada de anti-CD-20
synqkfkgtatladkssstaymqlssltsedsavyyarstyyggdwynvwgagttvt
vsaitcpppmsvehadiwksyslvsrervicnsqfkrkaqtssltecvlkatnvahwt
>< dominio sushi de IL-15R α humana
tpslkci repkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs
>< Dominio CH2CH3 (Fc) de IgG1 humana
hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka
lpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltnqvsltclvkgfypsdiavewesngqp
ennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
>

FIG. 57

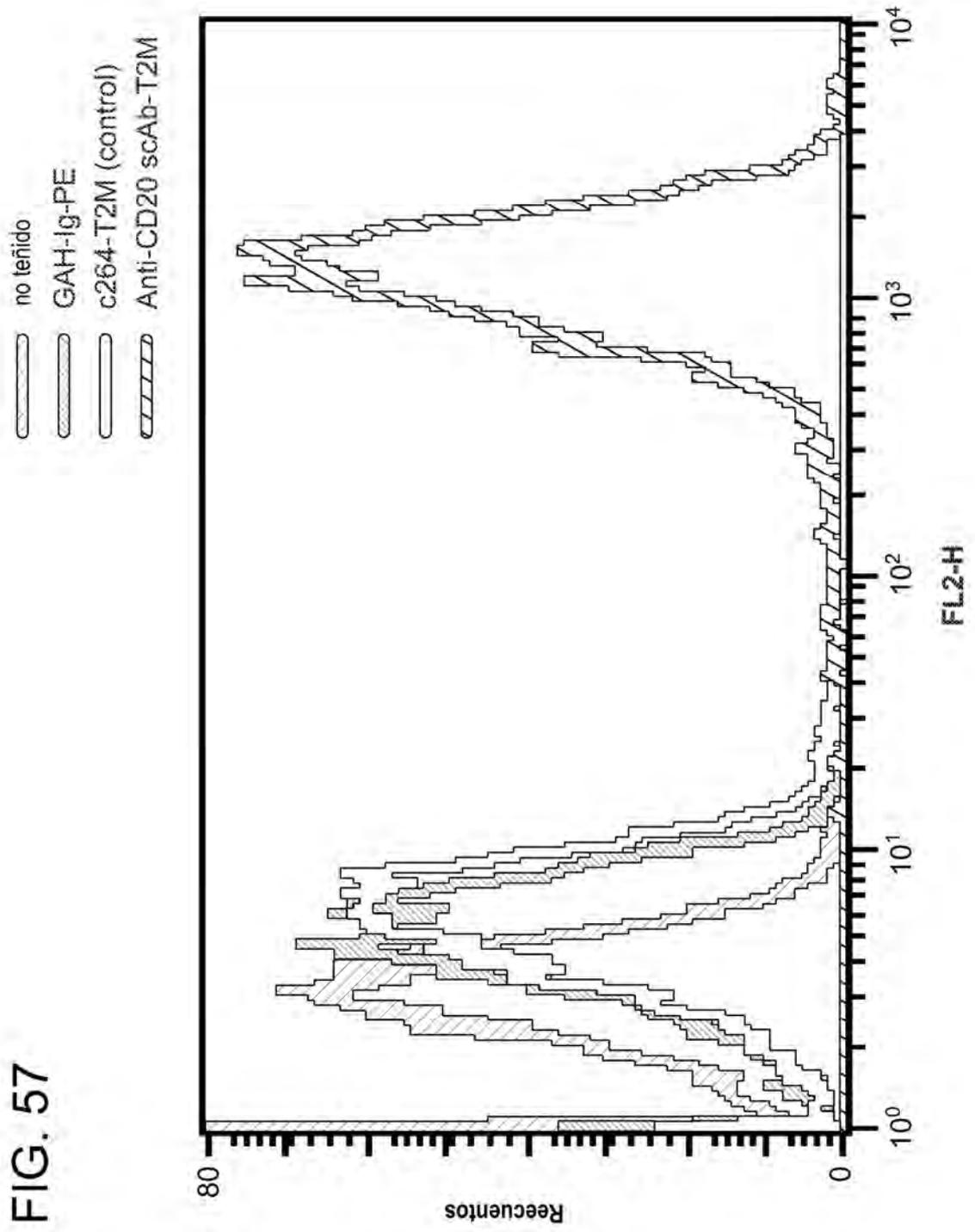


FIG. 58

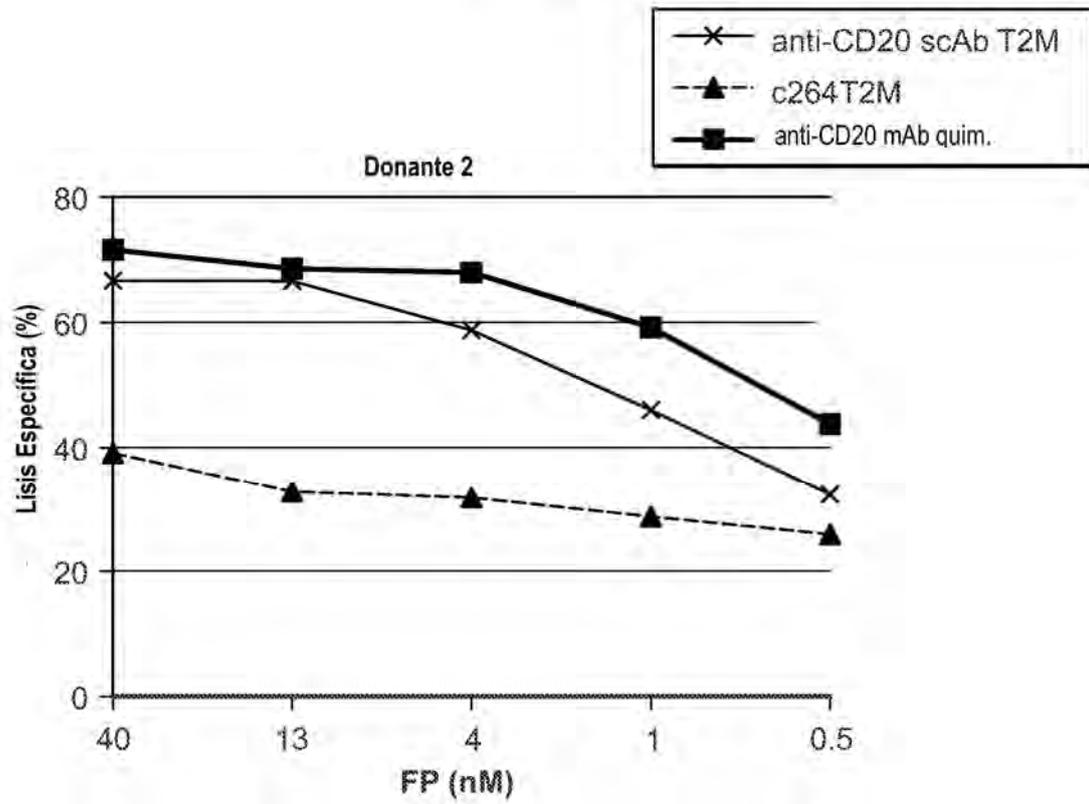
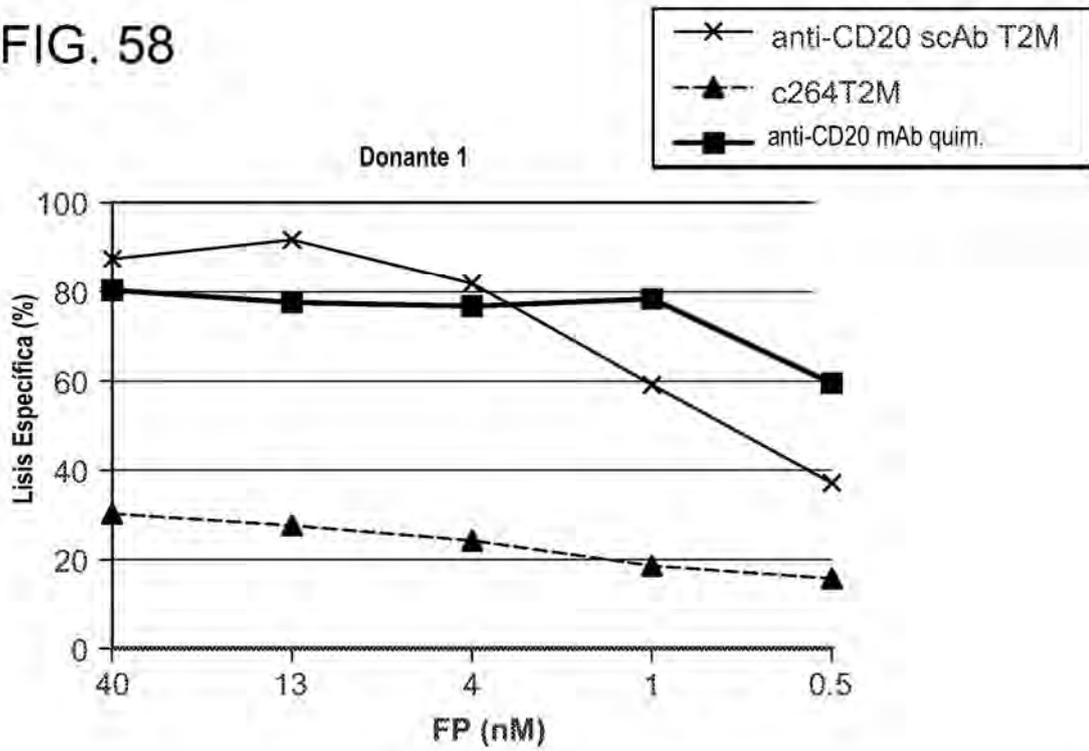


FIG. 59

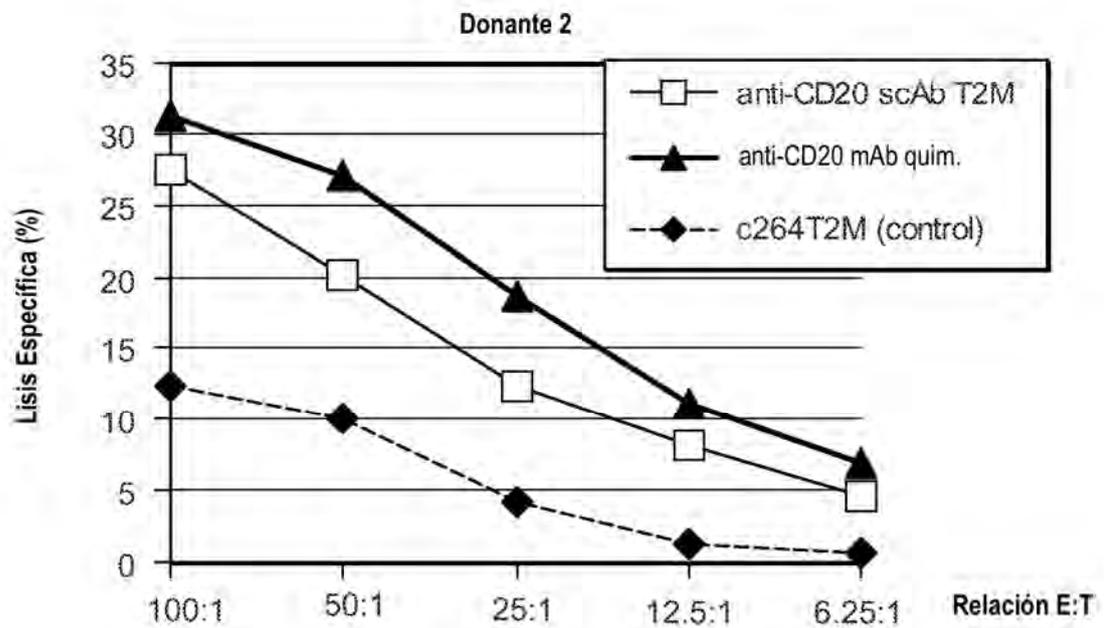
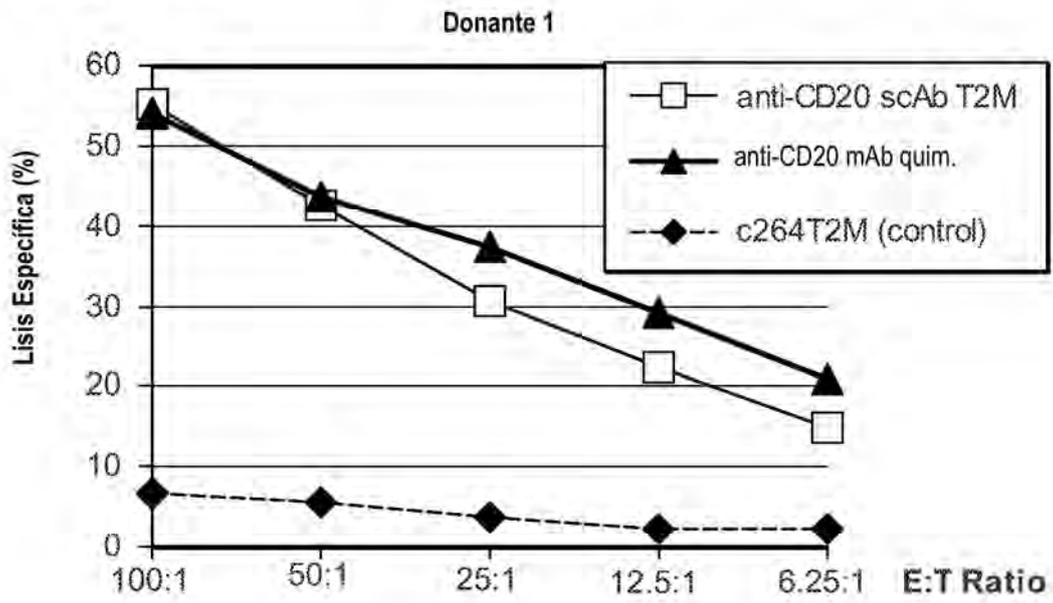


FIG. 60

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
< sec. líder

CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
><

CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
dominios V de cadena ligera de anti-CD20/k C humana

GTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTTGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTA
ACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTT
>< IL-15N72D humana

ATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCA
CCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTTCTCTTGGAGTTACAAG
TTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAT
CTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGA
ATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAAT
TTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA
>

FIG. 61

qivlsqspailsaspgekvmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkipwiyatsnlasgvpr
< dominio V de cadena ligera de anti-cd20

fsgsgsgtsysltisrveaadaatyycqqtwnpftfgggtkleikrtvaapsvfifpps
><

deqlksgtasvvcllnnfyprcakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltl
dominio de κ C humana

skadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgecnwvvnvisdlkkiedliqsmhidatlyt
>< IL-15N72D humana

esdvhpsckvtamkcflllelqvislesgdasihdtvenliilandslssngnvttesgcke
ceeleeeknikeflqsfvhivqmfints
>

FIG. 62

ATGGGTTGGAGTCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACACGTGT
 < sec. lider

CCTGTCCCAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTG
 ><

GGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGT
 dominios V de cadena pesada de anti-cd20/HC CH1 humana

TACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGAT

TGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCCTACAATCAGAAGTTCA

AAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG

ATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA

CCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC

CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG

CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG

GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA

GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG

CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG

TGGACAAGAAAGTTATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCA
 >< domino sushi de IL-15R α humana

GACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTG

TAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCG

TGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAA

FIG 62 (Continuación)

TGCATTAGAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG

>< Dominio CH2-CH3 (Fc) de IgG1 humana

CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA

AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG

GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT

GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT

ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC

TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC

AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC

CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG

GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC

CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG

GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA

TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTG

GTAAATAA

>

FIG. 63

qvqlqqpgaelvkpgasvkmsckasgytftsynmhvwkqtpggrglewigaiypngdtsy
 < dominio V de cadena pesada de anti-CD-20

nqkfkqkatltadkssstaymqlssltsedsavyycarstyyggdwyfdvwgagttvtvs
 aastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqs
 >> dominio HC CH1 de IgG1 humana

sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvitcppedmsvehadiwksysl
 >>

ysreryicnsgfkrkagtssltecvlnkatnvahwttpslkci repkscdkthtcppcpa
 dominio sushi de IL-15R α humana ><

pellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkp
 Dominio CH2-CH3 (Fc) de IgG1 humana

reeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgpprepqvytl
 ppsrdeltknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt
 vdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
 >

FIG. 64

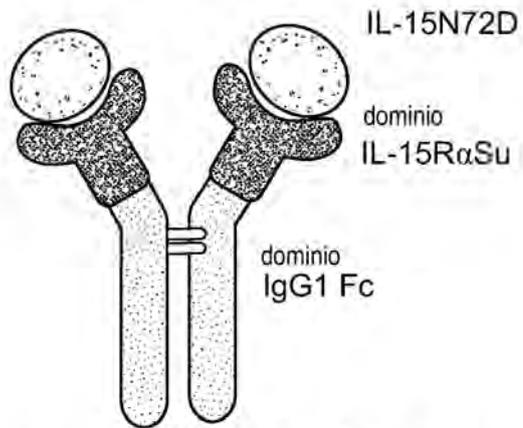


FIG. 65A

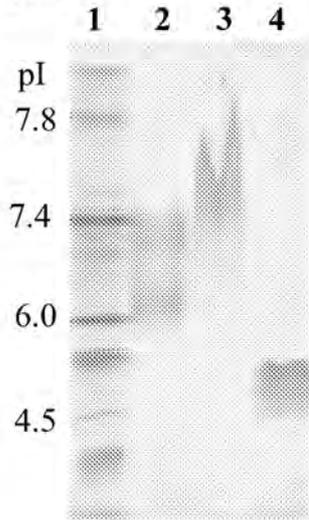


FIG. 65B

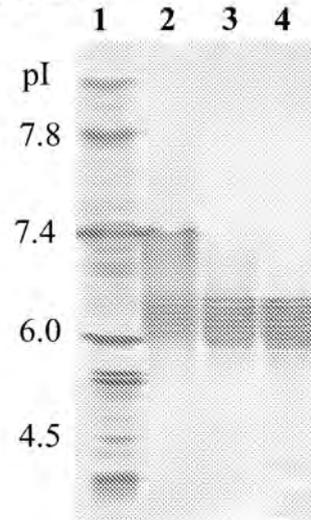


FIG. 65C

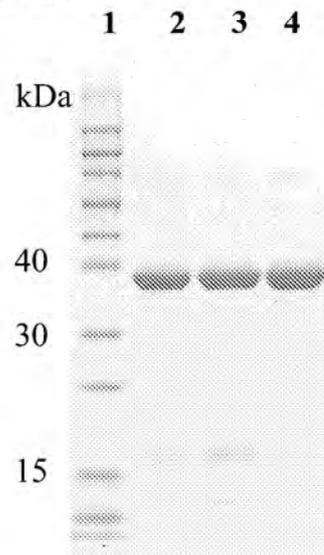


FIG. 65D

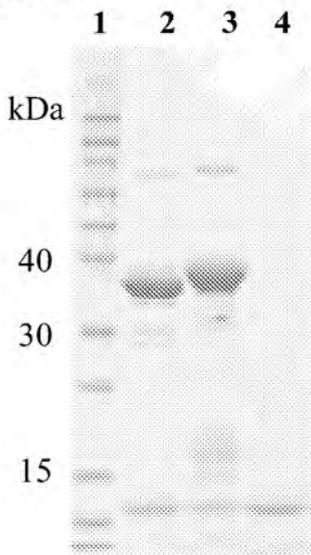


FIG. 66

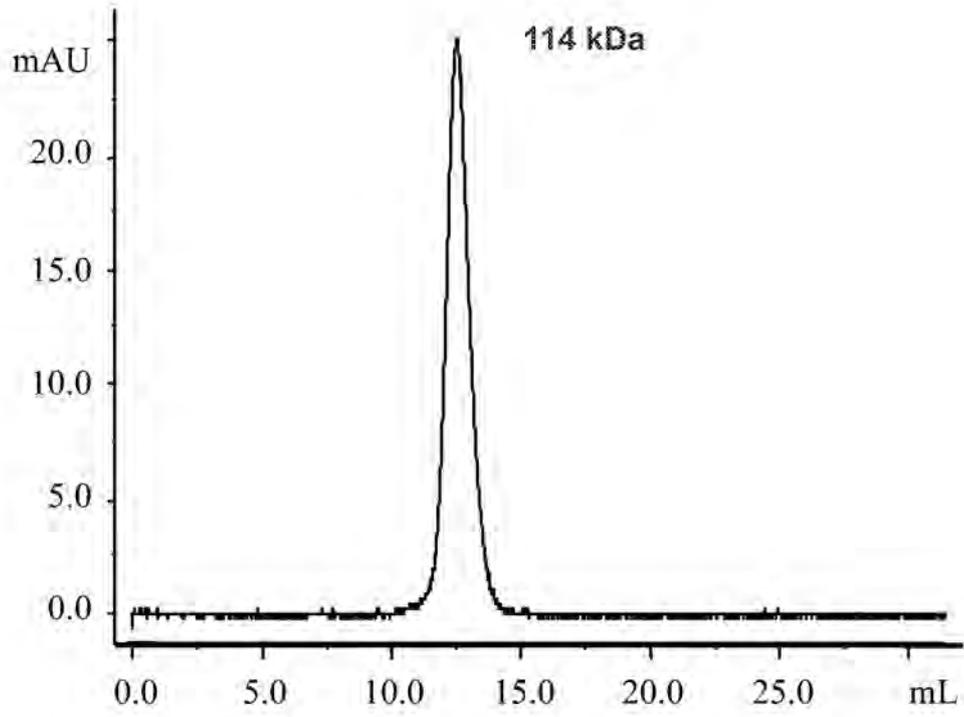


FIG. 67

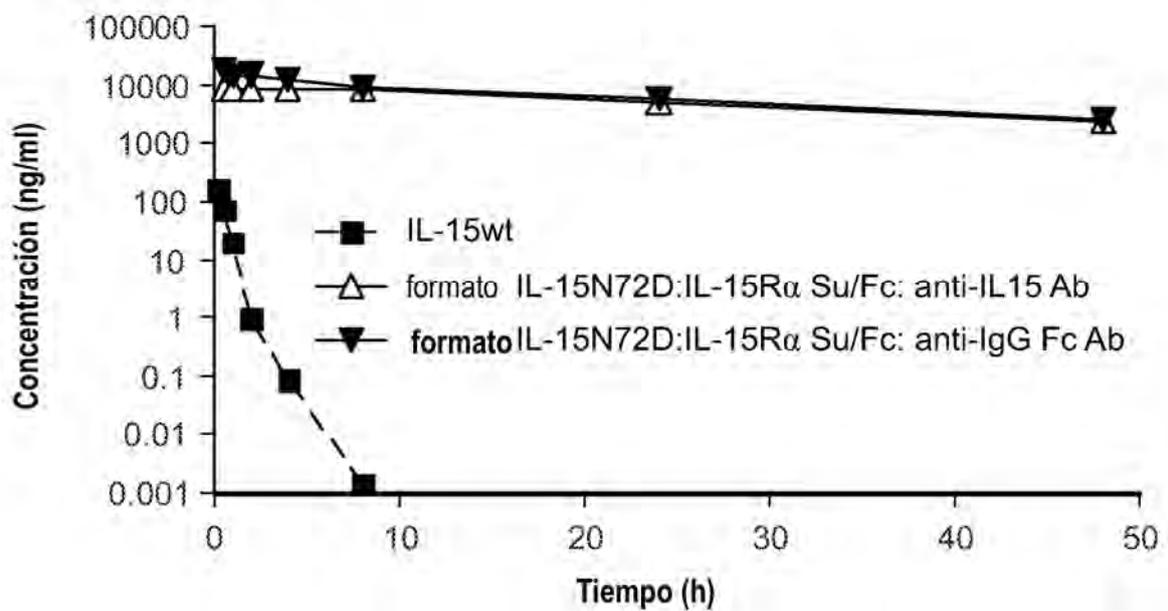
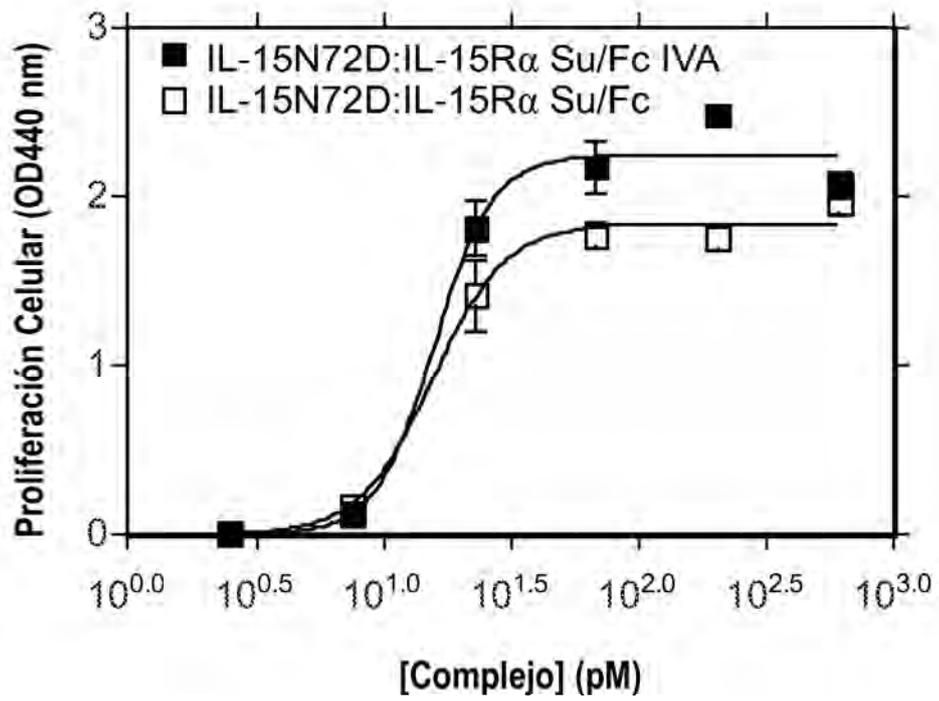


FIG. 68



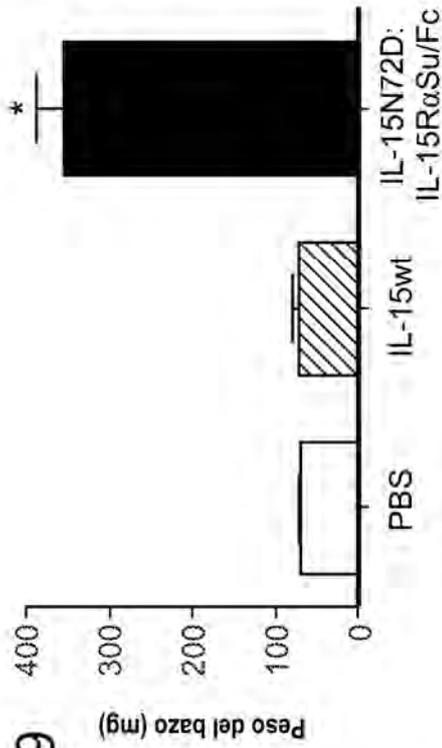
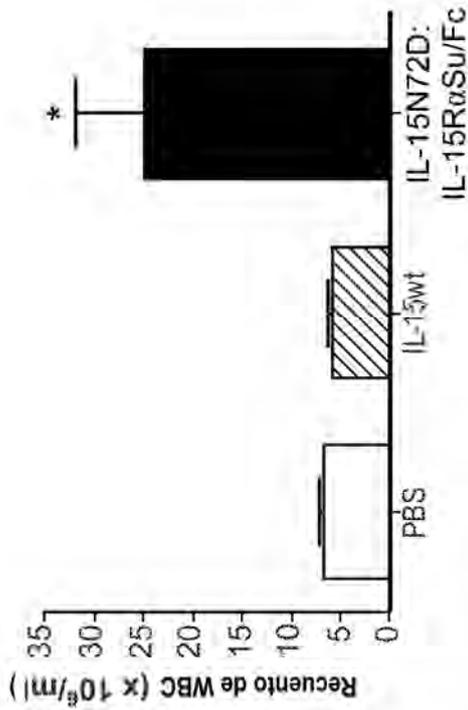


FIG. 69

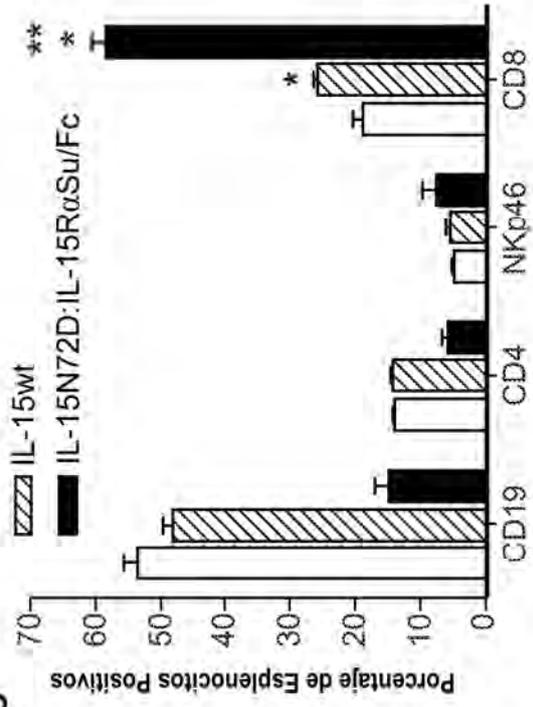
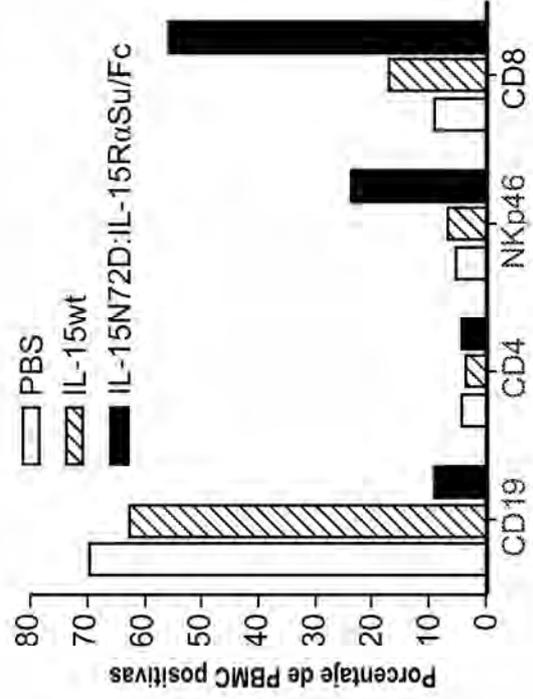


FIG. 70