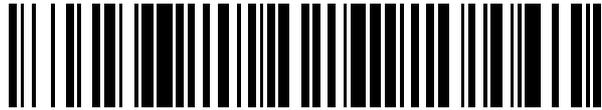


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 008**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 14162248 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2769984**

54 Título: **Moléculas de fusión y variantes de IL-15**

30 Prioridad:

**11.05.2007 US 928900 P**

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

**14.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 642 008 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 y variantes de IL-15

**Antecedentes de la invención**

5 Los Receptores de Células T (TCR) son efectores primarios del sistema inmunitario que tienen ventajas únicas como plataforma para desarrollar agentes terapéuticos. Si bien los agentes terapéuticos de anticuerpos se limitan al reconocimiento de patógenos en la sangre y los espacios extracelulares o a dianas proteicas sobre la superficie de la célula, los receptores de células T pueden reconocer antígenos presentados con moléculas del MHC sobre las superficies de las células (incluyendo antígenos derivados de proteínas intracelulares). Dependiendo del subtipo de células T que reconocen el antígeno presentado y se activan, los receptores de células T y las células T que albergan los receptores de células T pueden participar en el control de diversas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, las células T están implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral a través de la inducción de la diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos. Además, las células T activadas actúan iniciando las respuestas inmunitarias mediadas por células. De este modo, los receptores de células T pueden reconocer dianas adicionales no disponibles para los anticuerpos.

15 Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (células polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B y NK) constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas, las células T funcionan en la vigilancia inmunitaria y en la eliminación de antígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existe una evidencia convincente de que las células T juegan un papel principal en la causalidad y la propagación de enfermedades. En estos trastornos, el desmoronamiento de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causalidad de la enfermedad inmunitaria.

20 Se cree que los TCR juegan un papel importante en el desarrollo y la función del sistema inmunitario. Por ejemplo, se ha informado de que los TCR median la destrucción celular, incrementan la proliferación de las células B, e impactan en el desarrollo y la gravedad de diferentes trastornos incluyendo cáncer, alergias, infecciones virales y trastornos autoinmunitarios.

25 Por lo tanto sería deseable proporcionar agentes de direccionamiento novedosos basados en los receptores de las células T, así como métodos para producir y utilizar tales agentes para marcos terapéuticos y diagnósticos. Por consiguiente, sería particularmente deseable proporcionar moléculas que tuvieran ciertas ventajas en comparación con los complejos de la técnica anterior basados en el direccionamiento de anticuerpos.

30 Por otra parte, es deseable utilizar los TCR para dirigir las diferentes moléculas efectoras al sitio de la enfermedad donde pueden proporcionar beneficio terapéutico sin los efectos secundarios asociados con la actividad sistémica no dirigida. Uno de ellos es la IL-15, un miembro de la familia de linfoquinas de cuatro haces de hélices alfa. La IL-15 juega un papel multifacético en el desarrollo y el control del sistema inmunitario. Más específicamente, la IL-15 influye en la función, el desarrollo, la supervivencia, y la proliferación de las células T CD8+, las células NK, las células T asesinas, las células B, los linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) y las células presentadoras de antígenos (CPA). Se ha demostrado que los ratones transgénicos tanto IL-15<sup>-/-</sup>, como IL-15Ra<sup>-/-</sup> carecen de poblaciones de células T NK periféricas y asesinas, ciertos subgrupos de LIE, y la mayor parte de células T CD8+ de fenotipo de memoria, sugiriendo que la IL-15 juega un papel en el desarrollo, la proliferación o/y la supervivencia de estos tipos de células. El receptor (R) de IL-15 consiste en tres polipéptidos, el IL-15R alfa de tipo específico ("IL-15Ra" o "IL-15Rα"), el IL-2/IL-15R beta ("IL-2Rβ" o "IL-15Rβ"), y la cadena gamma común ("γC," o "gC" que es compartida por múltiples receptores de citoquinas).

45 La señalización de IL-15 se puede producir a través del complejo heterotrimérico de IL-15Rα, IL-2Rβ y γC; a través del complejo heterodimérico de IL-2Rβ y γC. Un mecanismo novedoso de acción de la IL-15 es el de la transpresentación en la que la IL-15 y el IL-15Rα son expresados de manera coordinada por las células presentadoras de antígenos (monocitos y células dendríticas), y la IL-15 unida al IL-15Rα se presenta en trans a las células T NK o CD8 próximas que expresan solamente el receptor IL-15RβγC. En cuanto al evento co-estimulador que se produce en la sinapsis inmunológica, la transpresentación de IL-15 parece ser ahora un mecanismo dominante para la acción de IL-15 in vivo y parece jugar un papel principal en la inmunovigilancia tumoral (Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601). Se ha demostrado que las subunidades de IL-2Rα soluble, que inducen isoformas que contienen una delección del exón 3 y el denominado dominio "sushi" en el extremo N, portan la mayor parte de los elementos estructurales responsables de la unión de las citoquinas. Mientras IL-2Rα solo es un receptor de baja afinidad para la IL-2 (Kd  $\approx$  10 nM), IL-15Rα se une a IL-15 con una afinidad elevada (Kd  $\approx$  100 pM). De este modo el IL-2Rα soluble y la IL-15 son capaces de formar complejos heterodiméricos estables en disolución y estos complejos son capaces de modular (esto es estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del complejo de IL-15R de afinidad elevada o intermedia (Mortier et al. 2006. J Biol Chem 281: 1612-1619; Stoklasek et al. 2006. J Immunol 177: 6072-6080; Rubinstein et al. 2006. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9166-9171).

55 Ferrari-Lacraz S. et al., "An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection", The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, US, vol. 167, núm. 6, 15 de septiembre de 2001,

páginas 3478-3485, XP002185137, ISSN: 0022-1767 describen el uso de una proteína de fusión relacionada con IL-15 como monoterapia o combinada con CTLA4/Fc en modelos de aloinjerto de islotes murinos. Se encontró que el tratamiento con IL-15 mutante/Fc confiere protección parcial de la infiltración de injerto de células T CD4+ y CD8+.

5 Penichet M. L. et al: "Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection", Human antibodies, IOS Press, Amsterdam, NL, vol. 8, núm. 3, 1 de enero de 1997, (01-01-1997), páginas 106-118, XP009171587, ISSN: 1093-2607 describen estrategias para la construcción de proteínas de fusión de anticuerpo-interleuquina-2 y describen sus propiedades in vitro e in vivo.

10 Mosquera, Luis A. et al.: "In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgG1 Fusion Protein", Journal of Immunology, American Association of Immunologists, US, Vol. 174, Núm. 7, 1 de Abril de 2005, páginas. 4381-4388, XP002504087, ISSN: 0022-1767 describen una proteína compuesta por un TCR de cadena sencilla soluble conectado genéticamente al dominio constante de una cadena H de IgG1. Erwan et al., "Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins", Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. US, vol 281, núm. 3, 20 de enero de 2006, páginas 1612-1619, 15 XP002394330, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M508624200, describen la implicación de los dominios sushi solubles en el mecanismo de transpresentación de IL-15. Se demostró que las proteínas de fusión (RLI e ILR), en las que IL-15 e IL-15R $\alpha$ -sushi están ancladas por medio de un conector flexible, son incluso más potentes que la combinación de IL-15 más sIL-15R $\alpha$ -sushi.

20 Dados los efectos conocidos de la IL-15 sobre el sistema inmunitario, se han explorado numerosos enfoques basados en IL-15 para manipular el sistema inmunitario en beneficio de los anfitriones. Si bien la administración de IL-15 se ha empleado para reforzar las respuestas inmunitarias o aumentar la reconstitución del sistema inmunitario, el bloqueo de la actividad de IL-15 puede inhibir las respuestas autoinmunitarias y otras respuestas inmunitarias no deseadas (Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601). De hecho, una de las limitaciones con el 25 tratamiento sistémico con IL-15 es la posible inducción de enfermedades autoinmunitarias. Otras limitaciones incluyen la dificultad para producir esta citoquina en sistemas de expresión de células de mamífero convencionales así como su vida media muy corta in vivo. Por lo tanto, existe la necesidad de generar una forma terapéutica inmunoestimuladora adecuada de IL-15 que presente una vida media in vivo más prolongada, un aumento de la actividad de unión a células inmunitarias, o un incremento de la bioactividad. Adicionalmente existe la necesidad de antagonistas de IL-15 eficaces. En teoría sería deseable que tales moléculas fueran dirigidas selectivamente al lugar 30 de la enfermedad para evitar toxicidades sistémicas no deseadas y proporcionar un beneficio terapéutico más eficaz.

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona numerosos complejos de fusión solubles que tienen uso terapéutico y métodos para elaborar tales proteínas. La presente invención describe métodos para destruir células diana utilizando 35 complejos de fusión solubles de la invención. Los complejos solubles descritos en la presente memoria tienen utilidad terapéutica potencial.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un complejo de proteínas de fusión solubles que comprende al menos dos proteínas de fusión solubles, en donde

la primera proteína de fusión comprende (a) un primer anticuerpo o un fragmento funcional del mismo unidos covalentemente a (b) el polipéptido de interleuquina 15 (hIL-15) o un fragmento funcional del mismo; y

40 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo anticuerpo o un fragmento funcional del mismo unidos covalentemente a (d) un polipéptido receptor  $\alpha$  de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;

45 en donde el dominio IL-15 de la primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles, en donde el anticuerpo es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto y en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o un Fv de cadena sencilla.

50 De acuerdo con la invención, el anticuerpo es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto y el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o un Fv de cadena sencilla. En una realización concreta, el anticuerpo de cadena sencilla comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina unido covalentemente a un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina por una secuencia conectora polipeptídica.

En una realización de los aspectos descritos anteriormente, el primer polipéptido biológicamente activo que es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo se une covalentemente a IL-15 (o un fragmento funcional de la misma) por medio de una secuencia conectora polipeptídica.

55 En otra realización de los aspectos descritos anteriormente, el segundo polipéptido biológicamente activo que es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo está unido covalentemente al polipéptido IL-15Ra (o fragmento

funcional del mismo) por medio de una secuencia conectora polipeptídica.

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

5 En una realización adicional, el antígeno comprende un antígeno CD, una citoquina o un receptor o ligando de quimioquina, un receptor o ligando de un factor de crecimiento, un factor tisular, una molécula de adherencia celular, moléculas del MHC/de tipo MHC, receptor FC, receptor de tipo Toll, receptor de NK, TCR, BCR, receptor o ligando co-estimulador positivo/negativo, receptor o ligando de tipo muerte, antígeno asociado a tumores, o antígeno codificado por virus.

10 En otra realización de los aspectos descritos anteriormente, el polipéptido IL-15Ra comprende el dominio extracelular del receptor alfa de IL-15 capaz de unirse a IL-15.

En otra realización de los aspectos descritos anteriormente, el polipéptido IL-15Ra comprende el dominio sushi de IL-15a (Wei et al. *Journal of Immunology*, 2001, 167: 277-282) o el dominio IL-15a $\Delta$ E3 (Anderson et al. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:29862-29869, Dubois et al. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:26978-26984).

15 Se describe una variante de IL-15 (también referida en la presente memoria como IL-15 mutante) que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la de la proteína IL-15 nativa (o de tipo salvaje) y que se une al polipéptido IL-15Ra y funciona como un agonista o antagonista de IL-15. Las realizaciones de la invención proporcionan una variante de IL-15 como proteína de fusión soluble que comprende un polipéptido biológicamente activo descrito anteriormente, en donde la variante de IL-15 se utiliza en lugar del dominio de IL-15.

20 En una realización de los aspectos descritos anteriormente, la invención caracteriza una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión de cualquiera de los aspectos o realizaciones como se describen en la presente memoria.

En una realización de los aspectos descritos anteriormente, la invención caracteriza una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en la presente memoria.

25 En una realización de los aspectos descritos anteriormente, la invención caracteriza una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en la presente memoria.

30 En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor, una señal de inicio de la traducción, y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia que codifica la proteína de fusión o la variante de IL-15. En otra realización, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descrita anteriormente está contenida en un vector de ADN.

35 Adicionalmente se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una primera célula anfitriona de un vector de ADN de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente que codifica la primera proteína de fusión, el cultivo de la primera célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar la primera proteína de fusión en la célula o el medio, la purificación de la primera proteína de fusión a partir de las células anfitrionas o el medio, la introducción en una segunda célula anfitriona de un vector de ADN de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente que codifica la segunda proteína de fusión, el cultivo de la segunda célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar la segunda proteína de fusión en la célula o el medio, y la purificación de la segunda proteína de fusión a partir de las células anfitrionas o el medio, y la mezcla de la primera y segunda proteínas de fusión en condiciones suficientes para permitir la unión entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble.

40 Adicionalmente se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una célula anfitriona de un vector de ADN de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente, que codifica la primera proteína de fusión, y un vector de ADN como se describe en los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, que codifica la segunda proteína de fusión, el cultivo de la célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble, purificando el complejo de proteínas de fusión soluble a partir de las células anfitrionas o el medio.

45 Adicionalmente se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una célula anfitriona de un vector de ADN que codifica la primera y segunda proteínas de fusión, el cultivo de la célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble, purificando el complejo de proteínas de fusión soluble a partir de las células

anfitrionas o el medio.

5 En otros aspectos más de los métodos anteriormente descritos se describe que el vector de ADN que codifica la variante de IL-15 se utiliza en lugar del vector de ADN que codifica la primera proteína de fusión para generar una célula anfitriona susceptible de expresar la variante de IL-15 y se permite que la variante de IL-15 se asocie con el dominio IL-15Ra de una segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión soluble.

10 Adicionalmente se describe un método para elaborar una variante de IL-15 de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una célula anfitriona de un vector de ADN de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente que codifica una variante de IL-15, el cultivo de la célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar la variante de IL-15 en la célula o el medio, purificando la variante de IL-15 a partir de las células anfitrionas o el medio.

15 Adicionalmente se describe un método para eliminar una célula diana, comprendiendo el método poner en contacto una pluralidad de células con un complejo de proteínas de fusión soluble o una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, en donde la pluralidad de células comprende adicionalmente células inmunitarias que portan cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio IL-15 de los aspectos descritos anteriormente y las células diana que portan un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos de los aspectos descritos anteriormente, formar un complejo de unión específico (puente) entre el antígeno sobre las células diana y las cadenas de IL-15R sobre las células inmunitarias suficiente para unir y activar las células inmunitarias, y eliminar las células diana por las células inmunitarias activadas unidas.

En una realización del método, las células diana son células tumorales o células infectadas viralmente.

20 En otra realización del método, el polipéptido biológicamente activo comprende un TCR.

En otra realización más del método, el antígeno sobre las células diana comprende un antígeno peptídico tumoral o codificado viralmente presentado en una molécula del MHC o HLA y reconocido por el TCR.

En una realización adicional del método, las células inmunitarias son células T, células LAK o células NK.

25 Adicionalmente se describe un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en la que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método administrar al paciente un complejo de proteínas de fusión soluble o una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad que forma un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan en antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias, y dañar o eliminar las células enfermas lo suficiente como para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

30 Adicionalmente se describe un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en la que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método mezclar células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R con un complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 1-22 que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad, administrar al paciente la mezcla de la célula inmunitaria-complejo de proteínas de fusión, formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias; y dañar o eliminar las células enfermas lo suficiente como para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

40 Adicionalmente se describe un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en la que las células del paciente expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método administrar al paciente un complejo de proteínas de fusión soluble o una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad sobre las células del paciente, localizar el complejo de proteínas de fusión soluble o la variante de IL-15 sobre las células del paciente, en donde el dominio IL-15 del complejo de proteínas de fusión soluble o la variante de IL-15 se unen a las células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R y suprimir la respuesta inmunitaria de las células inmunitarias.

En una realización del método la enfermedad es cáncer o una infección viral.

En otra realización del método la enfermedad es un trastorno inmunitario, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

50 En otra realización del método el antígeno asociado con la enfermedad es un complejo de péptido/MHC.

En otra realización, la invención caracteriza el complejo de proteínas de fusión soluble como se ha descrito anteriormente para su uso en un método de estimulación o supresión de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Adicionalmente se describen los siguientes apartados:

1. Un complejo de proteínas de fusión solubles que comprende al menos dos proteínas de fusión solubles, en donde  
5 la primera proteína de fusión comprende (a) un primer polipéptido biológicamente activo unido covalentemente a (b) el polipéptido de interleuquina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo; y  
la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo polipéptido biológicamente activo unido covalentemente a (d) un polipéptido receptor alfa de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;  
10 en donde el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles.
2. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, en donde el primer y el segundo polipéptidos biológicamente activos comprenden un primer receptor de células T soluble (TCR) o un fragmento funcional del mismo.
3. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 2, en donde otro de los polipéptidos biológicamente activos comprende el primer TCR soluble o un fragmento funcional del mismo del apartado 2, creando de ese modo un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con una mayor actividad de unión.
4. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 2, en donde el otro polipéptido biológicamente activo comprende un segundo TCR soluble o fragmento funcional del mismo, diferente del primer TCR soluble.
5. El complejo de proteínas de fusión solubles de los apartados 2 - 4, en donde el TCR es específico para el reconocimiento de un antígeno particular.
6. El complejo de proteínas de fusión solubles de los apartados 2 - 4, en donde el TCR es un heterodímero que comprende la cadena a y b de TCR.
7. El complejo de proteínas de fusión solubles de los apartados 2 - 4, en donde el TCR comprende un polipéptido TCR de cadena sencilla.
8. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 7, en donde el TCR de cadena sencilla comprende una cadena V-a de TCR unida covalentemente a una cadena V-b de TCR por medio de una secuencia conectora peptídica.
9. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 8, en donde el TCR de cadena sencilla comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Cb de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-b de TCR.
10. El complejo de proteínas de fusión solubles de los apartados 8 o 9, en donde el TCR de cadena sencilla comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Ca de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-a de TCR.
11. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, en donde uno o ambos del primer y el segundo polipéptidos biológicamente activos comprenden un anticuerpo o fragmento funcional del mismo.
12. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 11, en donde el anticuerpo es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto.
13. El complejo de proteínas de fusión solubles de los apartados 11 o 12, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla.
14. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 13, en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina unido covalentemente a un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina por medio de una secuencia conectora polipeptídica.
15. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, en donde el polipéptido de IL-15 es una variante de IL-15 que comprende una secuencia de aminoácidos diferente del polipéptido de IL-15 nativo.
16. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 15, en donde la variante de IL-15 funciona como un agonista o antagonista de IL-15.
17. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 15, en donde la variante de IL-15 tiene un incremento o disminución de la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta\gamma$ C en comparación con la del polipéptido IL-15 nativo.

18. El complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 15 - 17, en donde la secuencia de la variante de IL-15 tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de IL-15 nativa.
- 5 19. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 18, en donde el cambio de aminoácido consiste en una sustitución o delección de aminoácido en el dominio de IL-15 que interacciona con IL-15R $\beta$  y/o  $\gamma$ C.
20. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 18, en donde el cambio de aminoácido consiste en una o más sustituciones o delecciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1).
- 10 21. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 18, en donde el cambio de aminoácido consiste en la sustitución de D por N o A en la posición 8, D por A en la posición 61, N por A en la posición 65, N por R en la posición 72 o Q por A en la posición 108 de la secuencia de IL-15 humana madura, o cualquier combinación de estas sustituciones.
- 15 22. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 21, en donde el cambio de aminoácido da como resultado una variante de IL-15 que tiene actividad antagónica de IL-15 o disminuye la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta$  $\gamma$ C en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
23. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 18, en donde el cambio de aminoácido consiste en la sustitución de N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura.
- 20 24. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 23, en donde el cambio de aminoácido da como resultado una variante de IL-15 que tiene actividad agonística de IL-15 o aumenta la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta$  $\gamma$ C en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
25. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1 - 24, en donde el primer polipéptido biológicamente activo está unido covalentemente al polipéptido de IL-15 (o un fragmento funcional del mismo) por medio de una secuencia conectora polipeptídica.
- 25 26. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1 - 25, en donde el segundo polipéptido biológicamente activo está unido covalentemente al polipéptido IL-15Ra (o un fragmento funcional del mismo) por medio de una secuencia conectora polipeptídica.
27. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 5, en donde el antígeno para el dominio TCR comprende un antígeno peptídico presentado en una molécula del MHC o HLA.
- 30 28. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 27, en donde el antígeno peptídico deriva de un polipéptido asociado a tumor o un polipéptido codificado por un virus.
29. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 12, en donde el antígeno para el dominio de anticuerpo comprende un receptor o ligando de la superficie celular.
- 35 30. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 12 o 29, en donde el antígeno comprende un antígeno CD, receptor o ligando de citoquina o quimioquina, receptor o ligando de factor de crecimiento, molécula de adherencia celular, moléculas de MHC/de tipo MHC, receptor de Fc, receptor de tipo Toll, receptor de NK, TCR, BCR, receptor o ligando co-estimulador positivo/negativo, receptor o ligando de tipo muerte, antígeno asociado a tumor, o antígeno codificado por virus.
- 40 31. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1 - 30 y 73 - 74, en donde el polipéptido IL-15Ra comprende el dominio extracelular del receptor alfa de IL-15 capaz de unirse al polipéptido de IL-15.
32. El complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 31 y 73 - 74, en donde el polipéptido IL-15Ra comprende el dominio sushi de IL-15a o el dominio IL-15a $\Delta$ E3.
33. Una secuencia de aminoácidos que codifica la primera proteína de fusión de uno cualquiera de los apartados 1 - 30 y 73 - 74.
- 45 34. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de uno cualquiera de los apartados 1 - 32 y 73 - 74.
35. La secuencia de ácido nucleico de los apartados 33 o 34, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor, una señal de inicio de la traducción, y una secuencia líder unida operablemente a la secuencia que codifica la proteína de fusión.
36. Un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico del apartado 33.
- 50 37. Un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico del apartado 34.

38. Un vector de ADN que comprende las secuencias de ácido nucleico de los apartados 33 y 34.
39. Un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, comprendiendo el método:
- 5 a) introducir en una primera célula anfitriona un vector de ADN del apartado 36 que codifica la primera proteína de fusión,
- b) cultivar la primera célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar la primera proteína de fusión en la célula o el medio;
- c) purificar la primera proteína de fusión a partir de las células anfitrionas o el medio,
- 10 d) introducir en una segunda célula anfitriona un vector de ADN del apartado 37 que codifica la segunda proteína de fusión,
- e) cultivar la segunda célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar la segunda proteína de fusión en la célula o el medio; y
- f) purificar la segunda proteína de fusión a partir de las células anfitrionas o el medio, y
- 15 g) mezclar la primera y segunda proteínas de fusión en condiciones suficientes para permitir la unión entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión solubles.
40. Un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, comprendiendo el método:
- 20 a) introducir en una primera célula anfitriona un vector de ADN del apartado 36 que codifica la primera proteína de fusión y un vector de ADN del apartado 37 que codifica la segunda proteína de fusión,
- b) cultivar la célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble;
- c) purificar el complejo de proteínas de fusión solubles a partir de las células anfitrionas o el medio.
- 25 41. Un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, comprendiendo el método:
- a) introducir en una célula anfitriona un vector de ADN del apartado 38 que codifica la primera y segunda proteínas de fusión,
- 30 b) cultivar la célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra 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 a partir de las células anfitrionas o el medio.
42. Un método para destruir una célula diana, comprendiendo el método:
- 35 a) poner en contacto una pluralidad de células con un complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1 - 32, en donde la pluralidad de células comprende adicionalmente células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio IL-15 del apartado 1, y las células diana que portan un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos del apartado 1,
- b) formar un complejo de unión específico (puente) entre el antígeno sobre las células diana y las cadenas de IL-15R sobre las células inmunitarias suficientemente para unir y activar las células inmunitarias, y
- 40 c) destruir las células diana por medio de las células inmunitarias activadas unidas.
43. El método del apartado 42, en donde las células diana son células tumorales o células infectadas viralmente.
44. El método del apartado 42 o 43, en donde el polipéptido biológicamente activo comprende un TCR.
- 45 45. El método del apartado 44, en donde el antígeno sobre las células diana comprende un antígeno peptídico tumoral o codificado viralmente presentado en una molécula de MHC o HLA y reconocido por el TCR.
46. El método del apartado 42, en donde las células inmunitarias son células T, células LAK o células NK.

47. Un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado a la enfermedad, comprendiendo el método:
- a) administrar al paciente un complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 32 y 73 - 74 que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a la enfermedad;
  - b) formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficientemente para localizar las células inmunitarias; y
  - c) dañar o destruir las células enfermas suficientemente para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.
48. Un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado, comprendiendo el método:
- a) mezclar células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R con un complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 22 y 73, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado a la enfermedad,
  - b) administrar al paciente la mezcla del complejo de célula inmunitaria - proteínas de fusión;
  - c) formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficientemente para localizar las células inmunitarias; y
  - d) dañar o destruir las células enfermas suficientemente para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.
49. El método del apartado 47 o 48, en donde la enfermedad es cáncer o infección viral.
50. El método del apartado 47 o 48, en donde el antígeno asociado a la enfermedad es un complejo de péptido/MHC.
51. Un método para estimular respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 32 y 73 - 74.
52. Un método para suprimir respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 32 y 73 - 74.
53. El complejo de proteínas de fusión solubles de uno cualquiera de los apartados 1 - 32 y 73 - 74, en donde al menos una de las proteínas de fusión solubles comprende una marca detectable.
54. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 53, en donde la marca detectable es biotina, estreptavidina, una enzima o fragmento catalíticamente activo de la misma, un radionúclido, una nanopartícula, un ión metálico paramagnético, o una molécula fluorescente, fosforescente, o quimioluminiscente.
55. Un método para detectar células o tejidos que comprende un antígeno presentado sobre las células o tejidos, comprendiendo el método: a) poner en contacto las células o el tejido con al menos un complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 54 en 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 en condiciones apropiadas para eliminar cualquier complejo de proteínas de fusión solubles no unido al antígeno; y c) detectar el complejo de unión específico que es indicativo de células y tejidos que comprenden el antígeno.
56. El método del apartado 55, en donde el polipéptido biológicamente activo comprende un TCR y el antígeno comprende un antígeno peptídico presentado en una molécula de MHC o HLA que es reconocida por el TCR.
57. Una variante de IL-15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es diferente de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-15 nativo, en donde la variante de IL-15 tiene una actividad de unión mayor o menor para los receptores IL-15R $\beta$ γC en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
58. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 57, en donde la variante de IL-15 funciona como un agonista o antagonista de IL-15.
59. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 57, en donde la secuencia de la variante de IL-15 tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de IL-15 nativa.
60. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 59, en donde el cambio de aminoácido consiste en una sustitución o delección de aminoácido en el dominio IL-15 que interacciona con IL-15R $\beta$  y/o γC.
61. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 59, en donde el cambio de aminoácido consiste en una o más sustituciones o delecciones de aminoácido en las posiciones 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura.

62. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 59, en donde el cambio de aminoácido consiste en la sustitución de D por N o A en la posición 8, D por A en la posición 61, N por A en la posición 65, N por R en la posición 72 o Q por A en la posición 108 de la secuencia de IL-15 humana madura, o cualquier combinación de estas sustituciones.
- 5 63. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 62, en donde el cambio de aminoácido da como resultado una variante de IL-15 que tiene una actividad antagónica de IL-15 o una disminución de la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta$  $\gamma$ C en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
64. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 59, en donde el cambio de aminoácido consiste en la sustitución de N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura.
- 10 65. El complejo de la variante de IL-15 del apartado 64, en donde el cambio de aminoácido da como resultado una variante de IL-15 que tiene actividad agonística de IL-15 o un aumento de la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta$  $\gamma$ C en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
66. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de IL-15 de los apartados 57 - 65.
67. Un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico del apartado 66.
- 15 68. Una célula anfitriona que comprende el vector del apartado 67.
69. Un método para producir la variante de IL-15 del apartado 57, comprendiendo el método:  
b) cultivar la célula anfitriona del apartado 68 en condiciones suficientes para expresar la variante de IL-15; produciendo de ese modo la variante de IL-15.
70. El método del apartado 70, que comprende adicionalmente purificar la variante de IL-15.
- 20 71. Un método de estimulación de respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 57 - 65.
72. Un método de supresión de respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 57 - 65.
- 25 73. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, en donde el primer polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido TCR $\alpha$  o un fragmento funcional del mismo y el segundo polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido TCR $\beta$  o un fragmento funcional del mismo.
74. El complejo de proteínas de fusión solubles del apartado 1, en donde el primer polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo y el segundo polipéptido biológicamente activo comprende un polipéptido de cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.
- 30

### Descripción de los dibujos

- La Figura 1 (A y B) es un dibujo esquemático. (A) es un esquema que representa un ejemplo de un complejo de una proteína de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla. (B) es un esquema que representa constructos representativos de proteínas de fusión que comprende el complejo de proteínas de fusión. (Referencial)
- 35 La Figura 2 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa de del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15, incluyendo la secuencia líder. (Referencial)
- La Figura 3 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15, incluyendo la secuencia líder. (Referencial)
- 40 La Figura 4 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15Ra $\Delta$ E3. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15Ra $\Delta$ E3 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15Ra $\Delta$ E3, incluyendo la secuencia líder. (Referencial)
- La Figura 5 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15RaSushi y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15RaSushi, incluyendo la secuencia líder. (Referencial)
- 45 La Figura 6 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa el vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15RaSushi y (C) muestra la

secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15R $\alpha$ Sushi, incluyendo la secuencia líder. (Referencial)

La Figura 7 es un mapa del vector de expresión de pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi. (Referencial)

La Figura 8 es un mapa del vector de expresión de pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaDE3. (Referencial)

5 La Figura 9 (A y B) expone la caracterización de células transfectadas que expresan la proteína de fusión de TCR/IL15R $\alpha$ . (A) son dos gráficos que muestran el análisis citométrico de flujo de células que expresan la proteína de fusión. (B) es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA basado en TCR para la producción de la proteína de fusión. (Referencial)

10 La Figura 10 (A y B) muestra el análisis de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R $\alpha$  por medio de SDS PAGE reductora. (A) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15RaSushi. (B) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15R $\alpha$ DE3. (Referencial)

15 La Figura 11 (A - C) muestra el análisis de TCR/IL15, TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15. (B) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi. (C) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC del complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi. (Referencial)

20 La Figura 12 (A y B) es un análisis de TCR/IL15R $\alpha$  y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15R $\alpha$ DE3. (B) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC del complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ DE3. (Referencial)

La Figura 13 es un gráfico que muestra la unión de TCR/IL15, TCR/IL15R $\alpha$  y complejos de proteínas de fusión a complejos de péptido/MHC presentados sobre las células, según se determina mediante citometría de flujo. (Referencial)

25 La Figura 14 (A-D) consiste en cuatro paneles. (A) muestra la secuencia de la proteína IL15 humana madura (SEQ ID NO: 1) y los residuos subrayados en color azul están sustituidos en las variantes de IL-15 como se muestra en la Tabla 1. (B) muestra los vectores de expresión pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N. (C) muestra la secuencia de los genes pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N y (D) muestra la secuencia de la proteína de fusión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N, incluyendo la secuencia líder. Los nucleótidos subrayados se cambiaron para generar las variantes de IL-15 indicadas. (Referencial)

La Figura 15 es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células CTLL2 portadoras de IL-15R $\alpha$  teñidas con las proteínas y los complejos de fusión seguido del reactivo de péptido/MHC específico de TCR. (Referencial)

35 La Figura 17 (A - C) son gráficos que muestran la unión de complejos de proteínas de fusión dimericos de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15, que comprende formas nativas y variantes de IL15, a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en células cargadas con el péptido, como se determina mediante citometría de flujo. También se muestra la unión de fondo de los complejos de proteínas de fusión dimericos en las células sin péptido cargado (A) es un gráfico que muestra la unión de los complejos dimericos de TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en las células. (B) es un gráfico que muestra la ligera unión de fondo de complejos dimericos de TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa) a las células sin péptido cargado. No se observó unión de fondo de complejos dimericos de TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a las células no cargadas. (C) es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células 32D $\beta$  que portan IL-15R $\beta$ C teñidas con complejos dimericos de TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15N72D, TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A. Se observó el aumento de la unión a IL-15R $\beta$ C del complejo que contenía TCR/IL15N72D y la disminución de la unión a IL-15R $\beta$ C de los complejos que contenían TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A. (Referencial)

40 La Figura 18 (A y B) son gráficos que muestran las actividades de unión de proteínas de fusión de TCR/IL15, antagonistas, y agonistas de tipo amplio a complejos de péptidos cognados/MHC e IL15R $\alpha$  según se determina mediante ELISA. (A) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a complejos de péptidos cognados/MHC. (B) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a IL15R $\alpha$ . (Referencial)

50 La Figura 16 es un gráfico que muestra las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión que apoyan el crecimiento de células que portan IL15R como se determina mediante un análisis de proliferación celular. (Referencial)

55

- La Figura 19 (A - C) son gráficos que muestran la capacidad de las proteínas de fusión de TCR/IL-15 que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o aumentar el crecimiento de células que portan IL15R, como se determina mediante un análisis de proliferación celular. (A) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir la proliferación de células CTLL-2 que portan IL15R (complejo receptor  $\alpha\beta\gamma$ ) de alta afinidad. (B) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o potenciar la proliferación de células 32D $\beta$  que portan IL15R (complejo receptor  $\beta\gamma$ ) de baja afinidad. (C) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para bloquear la proliferación estimulada por TCR/IL15wt de células CTLL-2 que portan IL15R de alta afinidad (complejo receptor  $\alpha\beta\gamma$ ). (Referencial)
- La Figura 20 representa los efectos de la incubación in vitro de células de NK con complejos de proteínas de fusión diméricas de TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y TCR/IL15 sobre la supervivencia de xenoinjertos de ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores. A los ratones carentes de sistema inmunitario atímicos se les inyectaron células NSCLC A549-A2 humanas para permitir el establecimiento de metástasis de pulmón. Las células NK purificadas aisladas de bazo de ratones donantes alogénicos se incubaron in vitro con rhIL-2, MART1scTCR-IL2, c264scTCR-IL2 o c264scTCR-IL15/c264scTCR-IL15R $\alpha$  y se transfirieron adoptivamente a los ratones portadores de tumores que habían sido pretratados con ciclofosfamida (CTX), como se indica en la leyenda de la figura. Se trazó el porcentaje de supervivencia después del tratamiento. (Referencial)
- La Figura 21 expone la Tabla 1 que muestra las sustituciones de aminoácidos en las variantes de IL-15 y los efectos de estos cambios sobre la actividad de IL-15.
- Las Figuras 22A-B exponen la secuencia de aminoácidos de la IL-15 (SEC ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico de IL-15 (SEC ID NO: 2), respectivamente.

#### Descripción detallada de la invención

- Se ha establecido que IL-15 se une de forma estable al dominio extracelular del IL-15R $\alpha$  y que el complejo resultante es capaz de modular (es decir, estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del complejo de IL-15R de afinidad intermedia o elevada (1-4). Además, se ha demostrado que el TCR de cadena sencilla o los polipéptidos de anticuerpos se pueden fusionar a las citoquinas y otros dominios efectores inmunitarios y que tales moléculas de fusión biespecíficas conservan la actividad funcional de ambos dominios de fusión (5-8). Adicionalmente, se ha demostrado que las formas multivalentes del TCR proporcionan una mayor unión a sus ligandos (9).

#### Definiciones

- Las siguientes definiciones se proporcionan para los términos específicos que se utilizan en la siguiente descripción escrita.
- Según se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. El término "una molécula de ácido nucleico" incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.
- Tal según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "que comprende" signifique que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros elementos. "Que consiste esencialmente en", cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación ni portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" significará que excluye más elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para la administración de las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.
- Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de cadena sencilla, así como anticuerpos biespecíficos.
- El término "antígeno", según se utiliza en la presente memoria representa cualquier sustancia que hace 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 está asociada con cualquier enfermedad.
- Se pretende que el término "polipéptido biológicamente activo" según se utiliza en la presente memoria se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, o lipoproteína que puede producir los efectos deseados comentados en la presente memoria, incluyendo un TCR o un complejo de una proteína de fusión de anticuerpo con actividad de unión al antígeno.

Se pretende que el término "célula", según se utiliza en la presente memoria incluya cualquier célula primaria procariótica, eucariótica o línea celular inmortalizada, cualquier grupo de células tales como, 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 anfitriona" de acuerdo con la invención puede ser una célula transfectada, transformada, transducida o infectada de cualquier origen, incluyendo células procarióticas, eucarióticas, de mamífero, de ave, de insecto, de planta o bacterianas, o puede ser una célula de cualquier origen que se puede utilizar para propagar un ácido nucleico descrito en la presente memoria.

Se pretende que el término "molécula conjugada", según se utiliza en la presente memoria se refiera a un TCR o molécula de anticuerpo y una molécula efectora, normalmente un molécula química o sintetizada unida covalentemente (es decir fusionada) mediante un método químico u otro método adecuado. Si se desea, la molécula conjugada se puede fusionar en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora peptídica o una molécula portadora. Alternativamente, el conector peptídico o portador se pueden utilizar para ayudar a la construcción de la molécula conjugada. Las moléculas conjugadas específicamente preferidas son toxinas conjugadas o marcas detectables.

Se pretende que el término "molécula efectora" según se utiliza en la presente memoria se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, lipoproteína o agente químico que puede producir los efectos deseados comentados en la presente memoria, incluyendo un dominio de IL-15, variante de IL-15 o receptor de IL-15 tal como IL-15R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  o  $\gamma$ C, o fragmentos funcionales de los mismos.

Los términos "molécula de fusión" y "proteína de fusión" se utilizan indistintamente y se pretende que se refieran a un anticuerpo polipéptido biológicamente activo, y una molécula efectora normalmente una secuencia de proteína o péptido unida covalentemente (es decir fusionada) por medio de un método recombinante, químico u otro método adecuado. Si se desea, la molécula de fusión se puede fusionar en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora peptídica. Alternativamente, el conector peptídico se puede utilizar para ayudar a la construcción de la molécula de fusión. Las moléculas de fusión específicamente preferidas son las proteínas de fusión. Generalmente molécula de fusión también puede estar compuesta de moléculas conjugadas.

Se pretende que el término "célula anfitriona" se refiera a cualquier célula procariótica o eucariótica que contenga un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también incluye aquellas células procarióticas o eucarióticas que se han modificado genéticamente para contener el gen o los genes clonados en el cromosoma o el genoma de la célula anfitriona.

Se pretende que el término "respuesta inmunitaria", según se utiliza en la presente memoria se refiera al proceso mediante el cual las células inmunitarias son estimuladas y reclutadas de la sangre a tejidos linfoides así como no linfoides a través de un proceso multifactorial que implica distintas etapas de adherencia y activación. Las condiciones de activación causan la liberación de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y otros factores, regulan al alza la expresión de las moléculas de adherencia y otras moléculas de activación sobre las células inmunitarias, promueven la adherencia, cambios morfológicos, y/o la extravasación concurrente con quimiotaxis a través de los tejidos, aumentan la proliferación celular y la actividad citotóxica, estimulan la presentación de antígenos y proporcionan otros cambios fenotípicos incluyendo la generación de tipos de células de memoria. También se pretende que la respuesta inmunitaria se refiera a la actividad de las células inmunitarias para suprimir o regular la actividad inflamatoria o citotóxica de otras células inmunitarias.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan indistintamente 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. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas helicoidales de hebra sencilla, doble y triple, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, moléculas antisentido, ADNc, 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).

Se pretende que el término "polipéptido" se refiera a cualquier polímero que consista preferiblemente esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, independientemente de su tamaño. Aunque el término "proteína" se utiliza a menudo en referencia a proteínas relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la materia a menudo se solapa. El término "polipéptido" se refiere generalmente a proteínas, polipéptidos, y péptidos a no ser que se indique lo contrario. Los péptidos útiles de acuerdo con la presente invención, en general, tendrán 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 a juzgar por las técnicas convencionales de dimensionamiento de moléculas tales como centrifugación o electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Se pretende que los términos "prevenir", "que previene", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieran a la reducción de la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no tiene, pero está en riesgo de o es susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

Se pretende que el término "anticuerpo de cadena sencilla" haga referencia a un anticuerpo basado en un formato de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden consistir en subunidades de anticuerpos de unión mínimas. Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar solamente con aquellas regiones de unión al antígeno de los anticuerpos en una cadena polipeptídica sencilla plegada establemente. Como tales, los anticuerpos de cadena sencilla tienen un tamaño considerablemente menor que las inmunoglobulinas clásicas pero conservan las propiedades de unión específicas del antígeno de los anticuerpos. Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden conectar con una amplia gama de ligandos, por ejemplo moléculas efectoras o productos conjugados de fármacos.

El término "soluble" según se utiliza en la presente memoria significa que la molécula de fusión y concretamente una proteína de fusión no sedimenta fácilmente a una centrifugación de fuerza G baja (p. ej. menos de aproximadamente 30.000 revoluciones por minuto en una centrífuga convencional) en un tampón acuoso, p. ej., medio celular. Adicionalmente, la molécula de fusión es soluble si permanece en disolución acuosa a una temperatura mayor de aproximadamente 5-37°C y a un pH neutro o próximo al neutro en presencia de una concentración baja o nula de un detergente aniónico o no iónico. En estas condiciones, una proteína soluble tendrá a menudo un valor de sedimentación bajo p. ej., menos de aproximadamente 10 a 50 unidades svedberg.

Las disoluciones acuosas referidas en la presente memoria tienen típicamente un compuesto tamponador para establecer un 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. En ocasiones se añade un detergente no iónico suave o inhibidor de la proteasa. Adicionalmente, se puede añadir si se desea una proteína portadora tal como albúmina de suero bovino (BSA) a unos pocos mg/ml. Los tampones acuosos ilustrativos incluyen solución salina tamponada con fosfatoconvencional, solución salina tamponada con tris, u otros tampones y formulaciones de medios celulares conocidos.

Se pretende que el término "estimular" o "que estimula" haga referencia a incrementar, amplificar, aumentar, reforzar una respuesta inmunitaria. La estimulación puede ser una alteración positiva. Un incremento ilustrativo puede ser p. ej., de 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o incluso 90-100%. Otros incrementos ilustrativos incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces, o incluso 100.

Se pretende que el término "suprimir" o "que suprime" haga referencia a reducir, atenuar, disminuir, detener, o estabilizar una respuesta inmunitaria. La supresión puede ser una alteración negativa. Una reducción ilustrativa puede ser p. ej., de 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o incluso 90-100%. Las reducciones ilustrativas incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces, o incluso 100 veces.

Se pretende que el término "Receptor de células T" (TCR) haga referencia a polipéptidos de un complejo de proteínas integrantes de la membrana que participa en la activación de las células T en respuesta a la presentación del antígeno. Las células T reconocen un péptido unido al producto del MHC a través del receptor de células T (TCR) heterodimérico  $\alpha\beta$ . El repertorio de TCR tiene una considerable diversidad creada por el mismo mecanismo de reordenamiento génico utilizado en los genes de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos [Tonegawa, S. (1988) *Biosci. Rep.* 8:3-26]. La mayor parte de la diversidad se genera en las conexiones de las regiones variable (V) y de empalme (J) (o diversidad, D) que codifican la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  [Davis and Bjorkman (1988) *Nature* 334:395-402]. Sin embargo, los TCR no experimentan mutaciones puntuales somáticas como lo hacen los anticuerpos y, quizás no casualmente. Los TCR tampoco experimentan el mismo grado de maduración de la afinidad que los anticuerpos. Los TCR como ocurre en la naturaleza parece que tienen afinidades que oscilan de  $10^5$  a  $10^7$   $M^{-1}$  mientras que los anticuerpos tiene típicamente afinidades que oscilan de  $10^5$  a  $10^9$   $M^{-1}$  [Davis et al. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 16:523-544; Eisen et al. (1996) *Adv. Protein Chem.* 49:1-56]. Si bien la ausencia de mutación somática en los TCR puede estar asociada con afinidades inferiores, también se ha señalado que no es una ventaja selectiva para un TCR tener una afinidad más alta. De hecho, los modelos de activación en serie [Valitutti et al. (1995) *Nature* 375:148-151] y de actividad correctora cinética [Rabinowitz et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1401-1405] de activación de células T sugieren ambos que tasas de disociación más extensas (asociadas con una afinidad más alta) serían perjudiciales para el proceso de señalización. También es posible que los TCR de afinidad más alta no mantuvieran la especificidad por el péptido requerida para las respuestas de la célula T. Por ejemplo, los péptidos unidos en la hendidura del MHC despliegan 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 en la interacción. Por otro lado, el aumento de la afinidad de un TCR dirigiendo la energía hacia las hélices del MHC conduciría presumiblemente a la delección tímica durante la selección negativa [Bevan, M. J. (1997) *Immunity* 7:175-178]. El término "TCR" abarca receptores de células T policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, heterodiméricos y de cadena sencilla o un fragmento funcional de los mismos, incluyendo la molécula que comprende los dominios  $V\alpha$  y  $V\beta$  del TCR. El término "TCR" también abarca los receptores de células T descritos por ejemplo en, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Titulada "T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF", presentada el 19 de Marzo de 2008 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2003 01-44474A1.

El término "vector" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de replicarse autónomamente en una célula anfitriona y puede aceptar ADN foráneo. Un vector porta su propio origen de replicación, uno o más sitios de reconocimiento únicos para endonucleasas de restricción que se pueden utilizar para la inserción de ADN foráneo, y usualmente marcadores seleccionables tales como genes que codifican resistencia a antibióticos, y a menudo secuencias de reconocimiento (p. ej. promotor) para la expresión del ADN insertado. Los vectores comunes incluyen vectores plasmídicos y vectores de fagos.

#### 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, NK), constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas las células T funcionan en la vigilancia inmunológica y en la eliminación de antígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existen pruebas convincentes de que las células T desempeñan un papel importante en la causa y la propagación de la enfermedad. En estos trastornos, el fallo de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causa de las enfermedades autoinmunitarias.

El TCR está compuesto de al menos siete proteínas transmembrana. El heterodímero unido mediante disulfuro (alfa.beta.) forma la unidad de reconocimiento del antígeno monotípico, mientras que las cadenas invariables de CD3, que consisten en cadenas épsilon., .gamma., .delta., y .zeta. y .eta., son responsables del acoplamiento del ligando que se une en las rutas de señalización que dan como resultado la activación de las células T y de la elaboración de las respuestas inmunitarias 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 transmembrana con un solo dominio que atraviesa la membrana, presumiblemente en hélice alfa. En segundo lugar, todas las cadenas de los TCR tienen la característica inusual de poseer un aminoácido cargado dentro del dominio transmembrana pronosticado. Las cadenas invariantes tienen una sola carga negativa, conservada entre ratones y seres humanos, y las cadenas variantes poseen una (TCR-beta) o dos (TCR-alfa) cargas positivas. La secuencia transmembrana del TCR-alfa. está altamente conservada en varias especies y de este modo filogenéticamente puede cumplir un papel funcional importante. La secuencia octapeptídica que contiene los aminoácido hidrófilos lisina y arginina es idéntica entre las especies.

Una respuesta de las células T es modulada por la unión del antígeno al TCR. Un tipo de TCR es un heterodímero unido a membrana que consiste en una cadena  $\alpha$  y  $\beta$  que se asemeja a una región variable (V) y constante (C) de inmunoglobulina. La cadena  $\alpha$  de TCR incluye una cadena V- $\alpha$  y C- $\alpha$  conectadas covalentemente, mientras que la cadena  $\beta$  incluye una cadena V- $\beta$  conectada covalentemente a una cadena C- $\beta$ . Las cadenas V- $\alpha$  y V- $\beta$  forman un bolsillo o hendidura al que se pueden unir un superantígeno o un antígeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (conocido en seres humanos como complejo HLA). Véase generalmente Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3<sup>a</sup> Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993).

#### 35 Proteínas de fusión

Los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención comprenden al menos dos proteínas de fusión solubles, donde

la primera proteína de fusión comprende (a) un primer anticuerpo o fragmento funcional del mismo unidos covalentemente a (b) polipéptido de interleuquina 15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo; y

40 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo anticuerpo o fragmento funcional del mismo unidos covalentemente a (d) polipéptido receptor alfa de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;

45 en donde el dominio IL-15 de la primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles, en donde el anticuerpo es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto y en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o un Fv de cadena sencilla.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "polipéptido biológicamente activo" o "molécula efectora" se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, o lipoproteína que puedan producir los efectos deseados como se comenta en la presente memoria. Las moléculas efectoras también incluyen agentes químicos. Asimismo se contemplan ácidos nucleicos de moléculas efectoras que codifican una proteína, polipéptido, o péptido biológicamente activos o efectores. De ese modo, las moléculas adecuadas incluyen factores reguladores, enzimas, anticuerpos, o fármacos así como ADN, ARN, y oligonucleótidos. Los polipéptidos biológicamente activos o moléculas efectoras pueden ser de origen natural o pueden ser sintetizados a partir de componentes conocidos, p. ej., mediante síntesis recombinante o química y pueden incluir componentes heterólogos. Un polipéptido biológicamente activo o molécula efectora tiene entre aproximadamente 0,1 y 100 KD o más grande hasta 1000 KD, preferiblemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 KD a juzgar por las técnicas de clasificación por tamaño de moléculas convencionales tales como centrifugación o electroforesis en gel de

poliacrilamida-SDS. Los efectos deseados de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la formación de un complejo de proteínas de fusión de TCR con aumento de la actividad de unión, eliminación de una célula diana, p. ej., para inducir la proliferación celular o la muerte celular, iniciar una respuesta inmunitaria, en la prevención o tratamiento de una enfermedad, o para actuar como molécula de detección con fines diagnósticos.

5 Para semejante detección, se podría utilizar un análisis, por ejemplo un análisis que incluya etapas sucesivas de cultivo de células para su proliferación, y el contacto de las células con un complejo de fusión de TCR de la invención y a continuación la evaluación de si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo adicional de las células.

10 La conexión covalente de la molécula efectora al péptido de TCR proporciona una serie de ventajas significativas. Se pueden producir complejos de fusión de TCR de la invención que contienen una única molécula efectora, incluyendo tal péptido de estructura conocida. Adicionalmente, se puede producir una amplia variedad de moléculas efectoras en vectores de ADN similares. Esto es, se puede conectar una biblioteca de moléculas efectoras diferentes a la molécula de TCR para la presentación de las células infectadas o enfermas. Adicionalmente, para aplicaciones terapéuticas, en lugar de la administración de una molécula de TCR a un sujeto, se puede administrar el vector de expresión de ADN que codifica la molécula de TCR conectada al péptido efector para la expresión in vivo del complejo de fusión de TCR. Semejante enfoque evita etapas de purificación costosas típicamente asociadas con la preparación de proteínas recombinantes y evita las complejidades de la absorción y procesamiento de los antígenos asociados con los enfoques convencionales.

20 Como se ha indicado, los componentes de las proteínas de fusión descritos en la presente memoria, p. ej., moléculas efectoras tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, toxinas proteicas, dominios de inmunoglobulina u otras moléculas bioactivas y cualquiera de los conectores peptídicos, se pueden organizar casi de cualquier manera siempre que la proteína de fusión tenga la función para la cual estuviera destinada. En particular, cada componente de la proteína de fusión puede estar separado de otro componente por al menos una secuencia conectora peptídica adecuada si se desea. Adicionalmente, las proteínas de fusión puede incluir etiquetas, p. ej., para facilitar la modificación, identificación y/o purificación de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión más específicas se encuentran en los ejemplos descritos más abajo.

#### *Conectores*

30 Los complejos de fusión de la invención también incluyen preferiblemente una secuencia conectora flexible intercalada entre los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$  y el polipéptido biológicamente activo, siendo un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. La secuencia conectora debe permitir el posicionamiento eficaz del polipéptido biológicamente activo con respecto a los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$  para permitir la actividad funcional de ambos dominios.

35 En ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de fusión soluble tiene un conector en donde el primer polipéptido biológicamente activo siendo un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, está unido covalentemente a IL-15 (o un fragmento funcional de la misma) por una secuencia conectora polipeptídica.

En otras ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de fusión soluble descrito en la presente memoria tiene un conector en donde el segundo polipéptido biológicamente activo siendo un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, está unido covalentemente a un polipéptido de IL-15R $\alpha$  (o un fragmento funcional del mismo) por una secuencia conectora polipeptídica.

40 La secuencia conectora está codificada preferiblemente por una secuencia de nucleótidos que da como resultado un péptido que puede situar eficazmente la hendidura de unión de la molécula de TCR para el reconocimiento de un antígeno de presentación. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que la expresión "localización eficaz del polipéptido biológicamente activo con respecto a los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$ ", u otra expresión similar, represente que el polipéptido biológicamente activo unido a los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$  esté localizado de manera que los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$  sean susceptibles de interactuar entre sí para formar un complejo de proteína. En ciertas realizaciones, los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$  están localizados eficazmente para permitir interacciones con células inmunitarias para iniciar o inhibir una reacción inmunitaria, o para inhibir o estimular el desarrollo celular.

45 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 con el fin de no mantener el polipéptido biológicamente activo o la molécula efectora en una única conformación no deseada. La secuencia conectora se puede utilizar, p. ej., para separar el sitio de reconocimiento de la molécula fusionada. Específicamente, la secuencia conectora peptídica puede estar localizada entre el polipéptido biológicamente activo y la molécula efectora, p. ej., para entrecruzarlos químicamente 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, concretamente residuos de glicina y serina. Para un complejo de proteínas de fusión que comprende un TCR heterodimérico, la secuencia conectora está unida adecuadamente a la cadena b de la molécula de TCR, aunque la secuencia conectora también podría estar anclada a la cadena a de la molécula de TCR. Alternativamente, la secuencia conectora puede estar unida a

las cadenas a y b de la molécula de TCR. Cuando semejante cadena peptídica beta es expresada junto con la cadena a, el péptido TCR-efector unido se debe plegar dando como resultado una molécula de TCR funcional como se representa generalmente en la Figura 1. Una secuencia conectora adecuada es ASGGGGSGGG (esto es ala ser gly gly gly gly ser gly gly gly), unida preferiblemente al primer aminoácido del dominio b del TCR. Se podrían utilizar secuencias conectoras diferentes incluyendo cualquiera de los numerosos diseños de conectores flexibles que se ha utilizado con éxito para conectar entre sí regiones variables de anticuerpos, véase Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97-105. En algunos ejemplos, para unir covalentemente una molécula efectora a una molécula de la cadena b de TCR, la secuencia de aminoácidos del conector debe ser capaz de abarcar una distancia adecuada desde el residuo C terminal de la cadena beta de TCR hasta el residuo N terminal de la molécula efectora. Las secuencias conectoras adecuadas se pueden identificar fácilmente de manera empírica. Adicionalmente, también se pueden determinar el tamaño y las secuencias adecuadas de las secuencias conectoras mediante técnicas de modelado por ordenador convencionales basadas en el tamaño y en la forma pronosticados de la molécula de TCR.

El general, la preparación de los complejos de proteínas de fusión de la invención se puede completar mediante procedimientos descritos en la presente memoria 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 ARNm, introducción del ADN en una célula adecuada, transformación o transfección de un anfitrión, cultivo del anfitrión. Adicionalmente, las moléculas de fusión se pueden aislar y purificar utilizando agentes caotrópicos y métodos electroforéticos, de centrifugación y cromatográficos bien conocidos. Véanse en general, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Segunda Ed.) (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York (1989) para descripciones relacionadas con estos métodos.

Según se utiliza en la presente memoria, los polipéptidos biológicamente activos o moléculas efectoras de la invención pueden incluir factores tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, toxinas proteicas, dominios de inmunoglobulina u otras proteínas bioactivas tales como enzimas. Asimismo, los polipéptidos biológicamente activos pueden incluir productos conjugados con otros compuestos, tales como toxinas no proteicas, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, marcas detectables, materiales radiactivos y similares.

Las citoquinas de la invención se definen por medio de cualquier factor producido por células que afectan a otras células y son responsables de cualquiera de una serie de múltiples efectos de la inmunidad celular. Los ejemplos de las citoquinas incluyen, pero no se limitan a, la familia de IL-2, las familias de citoquinas interferón (IFN), IL-10, IL-1, IL-17, TGF y TNF, y a IL-1 a IL-35, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ .

De acuerdo con la invención, la primera proteína de fusión comprende un primer polipéptido biológicamente activo que es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo unido covalentemente al dominio interleuquina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo. La IL-15 es una citoquina que afecta a la activación y proliferación de células T. La actividad de IL-15 al afectar a la activación y proliferación de células inmunitarias es similar en algunos aspectos a IL2, aunque se han caracterizado bien las diferencias fundamentales (Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601).

En otro aspecto de la invención, la primera proteína de fusión comprende un dominio interleuquina-15 (IL-15) que es una variante de IL-15 (también referida en la presente memoria como mutante de IL-15). La variante de IL-15 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos diferente de la de la proteína IL-15 nativa. La variante de IL-15 se une preferiblemente al polipéptido de IL-15Ra y funciona como agonista o antagonista de IL-15. Preferiblemente, las variantes de IL-15 con actividad agonística tienen una actividad superagonística. En algunas realizaciones, la variante de IL-15 puede funcionar como agonista o antagonista de IL-15 independientemente de su asociación con IL-15Ra. Los agonistas de IL-15 se ilustran por una actividad biológica comparable o mayor en comparación con la IL-15 de tipo salvaje. Los antagonistas de IL-15 se ilustran por una actividad biológica menor en comparación con la IL-15 de tipo salvaje o por la capacidad para inhibir las respuestas mediadas por IL-15. En algunos ejemplos, la variante de IL-15 se une con una actividad mayor o menor a los receptores IL-15R $\beta$  $\gamma$ C. En algunas realizaciones, la secuencia de la variante de IL-15 tiene al menos un cambio de aminoácido, p. ej., sustitución o delección, en comparación con la secuencia de IL-2 nativa, dando como resultado tales cambios una actividad agonística o antagónica de IL-15. Preferiblemente las sustituciones/delecciones de aminoácidos se encuentran en los dominios de IL-15 que interaccionan con IL-15R $\beta$  y/o  $\gamma$ C. Más preferiblemente, las sustituciones/delecciones de aminoácidos no afectan a la unión al polipéptido de IL-15Ra o a la capacidad para producir la variante de IL-15. Las sustituciones/delecciones de aminoácidos adecuadas para generar variantes de IL-15 se pueden identificar basándose en estructuras de IL-15 supuestas o conocidas, comparaciones de IL-15 con moléculas homólogas tales como IL-2 con estructura conocida, a través de mutagénesis racional o al azar y análisis funcionales proporcionados en la presente memoria, u otros métodos empíricos. Adicionalmente las sustituciones de aminoácidos adecuadas pueden ser cambios e inserciones conservativos o no conservativos de aminoácidos adicionales. Preferiblemente las variantes de IL-15 de la invención contienen una o más de una sustituciones/delecciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura; concretamente, sustituciones D8N ("D8" se refiere a la posición del aminoácido y el residuo en la secuencia de IL-15 humana madura nativa y "N" se refiere al residuo de aminoácido sustituido en esa posición en la variante de IL-15), D8A, D61A, N65A, N72R o Q108A dan como resultado variantes de IL-15 con actividad

antagónica y las sustituciones N72D dan como resultado variantes de IL-15 con actividad agonística.

Si bien en un aspecto de la invención la variante de IL-15 es un componente de un complejo de proteínas de fusión, en otros aspectos la variante de IL-15 como proteína no de fusión. Preferiblemente la forma no de fusión de la variante de IL-15 es una citoquina soluble que funciona como agonista o antagonista de IL-15. En algunas realizaciones, la variante de IL-15 no de fusión forma un complejo con IL-15Ra mientras que en otra realización, actúa de forma independiente de IL-15Ra.

Las quimioquinas de la invención, similares a citoquinas, se definen como cualquier factor químico o molécula que cuando se exponen a otras células son responsables de cualquiera de una serie de efectos múltiples de inmunidad celular. Las quimioquinas adecuadas pueden incluir, pero no se limitan, la familia de quimioquinas CXC, CC, C, y CX<sub>3</sub>C 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.

Los factores de crecimiento incluyen cualquier molécula que cuando se expone a una célula concreta inducen la proliferación y/o diferenciación de la célula afectada. Los factores de crecimiento incluyen proteínas u moléculas químicas, algunas de las cuales incluyen: GM-CSF, G-CSF, factor de crecimiento humano y factor de crecimiento de células madre. Otros factores de crecimiento también pueden ser adecuados para los usos descritos en la presente memoria.

Las toxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier sustancia que tenga un efecto letal o un efecto inhibidor del crecimiento cuando se exponen a las células. Más específicamente, la molécula efectora puede ser una toxina celular, p. ej., de origen vegetal o bacteriano tal como, p. ej., la toxina de la difteria (DT), toxina shiga, abrina, toxina del cólera, ricina, saporina, exotoxina de pseudomonas (PE), proteína antiviral de fitolaca, o gelonina. Los fragmentos biológicamente activos de tales toxinas son bien conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., la cadena A de DT y la cadena A de ricina. Adicionalmente, la toxina puede ser un agente activo en la superficie celular tal como, p. ej., enzimas fosfolipasas (p. ej., fosfolipasa C).

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

Adicionalmente, la molécula efectora puede ser una molécula marcada detectablemente adecuada para estudios de diagnóstico o de formación de imágenes. Tales marcas incluyen biotina o estreptavidina/avidina, una nanopartícula o cristal detectable, una enzima o un fragmento catalíticamente activo de la misma, una marca fluorescente tal como proteína fluorescente verde, FITC, ficoeritrina, "cychrome", rojo texas o puntos cuánticos; un radionúclido p. ej., yodo 131, ytrio 90, renio 188 o bismuto212; una molécula fosforescente o quimioluminiscente o una marca detectable mediante PET, ultrasonido o MRI tal como un agente de contraste basado en Gd o ión metálico paramagnético. Véase p. ej., Moskaug, et al. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. Cell 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331 (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes y Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982); solicitud PCT publicada núm. WO 94/29350; solicitud PCT publicada núm. WO 94/04689; solicitud PCT publicada núm. WO2005046449 y Patente de los Estados Unidos 5.620.939 para una descripción relacionada con la elaboración y uso de proteínas que comprenden efectores o etiquetas.

Un complejo de fusión o producto conjugado de proteínas que incluye una IL-15 unida covalentemente y dominios de IL-15Ra tiene varios usos importantes. Por ejemplo, el complejo de fusión de proteínas o conjugado que comprende un TCR se puede emplear para liberar el complejo de IL-15/IL-15Ra en ciertas células susceptibles de unirse específicamente al TCR. Por consiguiente, el complejo de fusión de proteínas o conjugado proporciona los medios para dañar o eliminar selectivamente las células que comprenden el ligando. Los ejemplos de las células o el tejido susceptibles de ser dañados o eliminados por los complejos de fusión de proteínas o conjugados que comprenden un TCR incluyen tumores y células infectadas viralmente o bacterianamente que expresan uno o más ligandos susceptibles de ser unidos específicamente por el TCR. Las células o el tejido susceptibles de ser dañados o eliminados se pueden analizar fácilmente mediante los métodos descritos en la presente memoria.

Los polipéptidos de IL-15 e IL-15Ra de la invención se corresponden de manera adecuada en la secuencia de aminoácidos con las moléculas de IL-15 e IL-15Ra de origen natural, p. ej., moléculas de IL-15 e IL-15Ra de ser humano, ratón u otro roedor, u otro mamífero.

En algunos contextos, puede resultar útil elaborar complejos de fusión de proteínas o conjugados de la presente invención polivalentes, p. ej., para aumentar la valencia del scTCR. En particular, las interacciones entre los dominios IL-15 y IL-15Ra del complejo de proteínas de fusión proporcionan un método para generar complejos polivalentes. Además, la proteína de fusión polivalente se puede elaborar uniéndose covalentemente o no covalentemente entre 1 y 4 proteínas (iguales o diferentes) utilizando p. ej., técnicas de marcaje con biotina-estreptavidina convencionales, o mediante conjugación con soportes sólidos adecuados tales como cuentas de látex. Las proteínas entrecruzadas químicamente (por ejemplo entrecruzadas con dendrímeros) también son especies polivalentes adecuadas. Por ejemplo, la proteína se puede modificar mediante la inclusión de secuencias que codifican las secuencias de etiquetas que se pueden modificar, tales como la etiqueta de biotilación BirA o residuos de aminoácidos con cadenas laterales químicamente reactivas tales como Cys o His. Tales etiquetas de aminoácidos o aminoácidos químicamente reactivos se pueden localizar en una variedad de posiciones en la

proteína de fusión, preferiblemente distales con respecto al sitio activo del polipéptido biológicamente activo o molécula efectora. Por ejemplo, el extremo C de una proteína de fusión soluble se puede unir covalentemente a una etiqueta u otra proteína fusionada que incluye tales uno o más 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 cualquiera de una serie de diferentes grupos funcionales en su superficie (D. Tomalia, *Aldrichimica Acta*, 26:91:101 (1993)). Los dendrímeros ilustrativos para uso de acuerdo con la presente invención incluyen p. ej., dendrímero de poliamina "starburst" E9 y dendrímero de poliamina "combust" E9, que pueden conectar residuos de cistina.

## 10 Ácidos nucleicos y Vectores

### *Ácidos nucleicos*

La invención proporciona adicionalmente secuencias de ácido nucleico y en particular secuencias de ADN que codifican las presentes proteínas de fusión. Preferiblemente, la secuencia de ADN es transportada por un vector adecuado para la replicación extracromosómica tal como un fago, virus, plásmido, fagémido, cósmido, YAC, o episoma. En particular, se puede utilizar un vector de ADN que codifica una proteína de fusión deseada para facilitar los métodos preparativos descritos en la presente memoria y 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 contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estos incluyen sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede emplear cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Véanse generalmente Sambrook et al., más arriba y Ausubel et al. más arriba.

En la invención se incluyen métodos para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble, comprendiendo el método introducir en una célula anfitriona un vector de ADN como se describe en la presente memoria que codifica la primera y segunda proteínas de fusión, cultivar la célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble, purificando el complejo de proteínas de fusión soluble a partir de las células anfitrionas o el medio.

En general, un vector de ADN preferido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos unida 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 una cadena de TCR, 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 quiere significar que cada componente puede ser fácilmente sustituido por otro componente mediante métodos recombinantes convencionales. En particular, un vector de ADN configurado en forma de casete es particularmente deseable cuando el complejo de fusión codificado se va a utilizar frente a patógenos que pueden tener o tienen la capacidad de desarrollar serotipos.

Para elaborar el vector que codifica un complejo de fusión de TCR, se une la secuencia que codifica la molécula de TCR con una secuencia que codifica el péptido efector mediante el uso de ligasas adecuadas. El ADN que codifica el péptido presentador se puede obtener aislando ADN de fuentes naturales, por ejemplo de una línea celular adecuada o mediante métodos sintéticos conocidos, p. ej., el método del triéster fosfato. Véase, p. ej., *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984). Los oligonucleótidos sintéticos también se pueden preparar utilizando sintetizadores oligonucleotídicos automáticos disponibles en el mercado. Una vez aislado, el gen que codifica la molécula de TCR puede ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros medios conocidos en la técnica. Los cebadores de la PCR adecuados para amplificar el gen del péptido TCR pueden añadir sitios de restricción al producto de la PCR. El producto de la PCR incluye preferiblemente sitios de empalme para el péptido efector y las secuencias líder necesarias para una expresión y secreción adecuadas del complejo de fusión TCR-efector. El producto de la PCR también incluye preferiblemente una secuencia que codifica la secuencia conectora, o un sitio para una enzima de restricción para la ligación de tal secuencia.

Las proteínas de fusión descritas en la presente memoria se producen preferiblemente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, una vez que se aísla la molécula de ADN que codifica la proteína de TCR, la secuencia se puede ligar a otra molécula de ADN que codifica el polipéptido efector. La secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de TCR puede estar unida directamente a una secuencia de ADN que codifica el péptido efector o, más típicamente, se puede intercalar una secuencia de ADN que codifica la secuencia conectora comentada en la presente memoria entre la secuencia que codifica la molécula de TCR y la secuencia

que codifica el péptido efector y se pueden unir utilizando ligasas adecuadas. La molécula híbrida de ADN resultante se puede expresar en una célula anfitriona adecuada para producir un complejo de fusión de TCR. Las moléculas de ADN se ligan entre sí en una orientación 5' a 3' de manera que, tras la ligación, el marco traduccional de los polipéptidos codificados no resulta alterado (esto es, las moléculas de ADN se ligan entre sí en marco). Las moléculas de ADN resultantes codifican una proteína de fusión en marco.

También se pueden incluir en el constructo génico otras secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, se puede incluir una secuencia promotora, que controla la expresión de la secuencia que codifica el péptido TCR fusionado al péptido efector, o una secuencia líder, que dirige el complejo de fusión de TCR a la superficie de la célula o al medio de cultivo, en el constructo o puede estar presente en el vector de expresión en el cual se inserta el constructo. Se prefiere particularmente una inmunoglobulina o un promotor de CMV.

En la obtención de las secuencias codificantes de TCR variantes, los expertos en la técnica reconocerán que las proteínas derivadas de TCR pueden ser modificadas por ciertas sustituciones, adiciones, deleciones de aminoácidos, y modificaciones post-traduccionales, sin pérdida o reducción de la actividad biológica. En particular, es bien sabido que las sustituciones de aminoácidos conservativas, esto es, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de tamaño, carga, polaridad y conformación similares, es poco probable que altere significativamente la función de la proteína. Los 20 aminoácidos convencionales que son constituyentes de las 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 asparragina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina y tirosina; el grupo cargado positivamente (alcalino) contiene arginina, histidina y lisina; y el grupo cargado negativamente (ácido) contiene ácido aspártico y ácido glutámico. Es poco probable que la sustitución en una proteína de un aminoácido por otro de un mismo grupo tenga un efecto adverso sobre la actividad biológica de la proteína.

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 grado de emparejamiento de bases que se produzca. Las condiciones de alta temperatura y/o de bajo contenido de sal reducen la estabilidad del híbrido, y se pueden variar para evitar la hibridación de las secuencias que tienen menos de un grado seleccionado de homología. Por ejemplo, para las secuencias con aproximadamente 55% de contenido de GC, las condiciones de hibridación y lavado de 40-50°C, 6xSSC (tampón de cloruro de sodio/citrato de sodio) y SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1% indican aproximadamente una homología de aproximadamente 60-70%, las condiciones de hibridación y lavado de 50-65°C, 1xSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 82-97%, y las condiciones de hibridación y lavado de 52°C, 0,1xSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 99-100%. También se encuentra disponible una amplia gama de programas informáticos para comparar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (y medir el grado de homología), y una lista que proporciona fuentes de soporte lógico tanto asequibles comercialmente como libres se encuentra en Ausubel et al. (1999). Los algoritmos de comparación de secuencias y alineamiento de secuencias múltiples fácilmente asequibles son, respectivamente, los programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) y 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 casi en cualquier orden siempre que cada uno sea capaz de realizar su función pretendida. Por ejemplo, en una realización, el TCR está situado en el extremo C o N terminal de la molécula efectora.

Las moléculas efectoras preferidas de la invención tendrán tamaños que conduzcan a la función a la cual están destinados esos dominios. Las moléculas efectoras de la invención se pueden elaborar y fusionar al TCR mediante una variedad de métodos incluyendo métodos de entrecruzamiento químico bien conocidos. Véase p. ej., Means, G. E. y Feeney, R. E. (1974) en *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. Véase también S. S. Wong (1991) en *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press. Sin embargo se prefiere generalmente utilizar manipulaciones recombinantes para elaborar la proteína de fusión en marco.

Como se ha indicado, una molécula de fusión o una molécula conjugada de acuerdo con la invención se pueden organizar de diferentes maneras. En una configuración ilustrativa, el extremo C del TCR está conectado operativamente al extremo N de la molécula efectora. Esa conexión se puede lograr, si se desea, mediante métodos recombinantes. Sin embargo, en otra configuración, el extremo N del TCR está conectado al extremo C de la molécula efectora.

Alternativamente, o además, se pueden insertar una o más moléculas efectoras adicionales en los complejos de fusión o conjugados de TCR según se necesite.

#### *Vectores y Expresión*

Se pueden emplear varias estrategias para expresar complejos de fusión de proteínas de la invención. Por ejemplo, el constructo de fusión del gen de TCR descrito anteriormente se puede incorporar a un vector adecuado mediante métodos conocidos tales como el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en el vector para la inserción del constructo seguida de ligación. El vector que contiene el constructo génico se introduce a continuación en un

anfitrión adecuado para la expresión del péptido de fusión de TCR. Véase, en general, Sambrook et al., más arriba. La selección de vectores adecuados puede realizarse empíricamente basándose en factores relacionados con el protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con, y tener el replicón apropiado para el anfitrión que se está empleando. Adicionalmente el vector debe ser capaz de acomodar la secuencia de ADN que codifica el complejo de fusión de TCR que se va a expresar. Las células anfitrionas adecuadas incluyen células eucarióticas y procarióticas, preferiblemente aquellas células que pueden transformarse fácilmente y exhiben un rápido crecimiento en medio de cultivo. Las células anfitrionas 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 mamíferos, particularmente J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros anfitriones adecuados incluyen, p. ej., células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, más arriba. A continuación se pueden seleccionar las líneas celulares transformadas o transfectadas estables. Las células que expresan un complejo de fusión de TCR de la invención se pueden determinar por medio de procedimientos conocidos. Por ejemplo, la expresión de un complejo de fusión de TCR unido a una inmunoglobulina se puede determinar mediante un ELISA específico para la inmunoglobulina unida y/o mediante inmunotransferencia. Otros métodos para detectar la expresión de las proteínas de fusión que comprenden TCR unidos a dominios IL-15 o IL-15Ra se describen en los Ejemplos.

Como se menciona generalmente más arriba, se puede utilizar una célula anfitriona con fines preparativos para propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada. De este modo, una célula anfitriona puede incluir una célula procariótica o eucariótica en la cual se desea específicamente la producción de la proteína de fusión. Por lo tanto las células anfitrionas incluyen específicamente, células y órganos de levadura, mosca, gusano, planta, rana, mamífero que son capaces de propagar el ácido nucleico que codifica la fusión. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen células CHO dhfr- (Urlaub y Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), células 293 (Graham et al., J Gen. Virol., 36:59 (1977)) o células de mieloma de tipo SP2 o NSO (Galfré y Milstein, Meth. Enzymol, 73(B): 3 (1981)).

Las células anfitrionas capaces de propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada abarcan también células eucarióticas no de mamífero, incluyendo células de insecto (p. ej., *Sp. frugiperda*), levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; como fue revisado en general por Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486496 (1992)), fúngicas y vegetales. También se contemplan ciertos procariotas tales como *E. coli* y *Bacillus*.

El ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada se puede introducir en una célula anfitriona mediante técnicas convencionales para la transfección de células. Se pretende que el término "transfectar" o "transfección" incluya todas las técnicas convencionales para introducir ácido nucleico en células anfitrionas, incluyendo co-precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, transducción y/o integración viral. Los métodos adecuados para transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook et al. más arriba, y en otros libros de texto de laboratorio.

Se pueden utilizar diversos promotores (región reguladora del inicio de la transcripción) de acuerdo con la invención. La selección del promotor apropiado depende del anfitrión de expresión propuesto. Los promotores procedentes de fuentes heterólogas se pueden utilizar siempre y cuando sean funcionales en el anfitrión seleccionado.

La selección del promotor también depende de la eficacia y del nivel de producción del péptido o proteína deseados. A menudo se emplean promotores inducibles tales como TAC con el fin de aumentar drásticamente el nivel de expresión de proteína en *E. coli*. La expresión en exceso de las proteínas puede ser perjudicial para las células anfitrionas. En consecuencia, el crecimiento de la célula anfitriona puede ser limitado. El uso de sistemas promotores inducibles permite que las células anfitrionas sean cultivadas a densidades aceptables antes de la inducción de la expresión génica, facilitando de este modo mayores rendimientos de productos.

Se pueden utilizar diversas secuencias señal de acuerdo con la invención. Se puede utilizar una secuencia señal que es homóloga a la secuencia codificante de TCR. Alternativamente, también se puede utilizar una secuencia señal que ha sido seleccionada o diseñada para la secreción y procesamiento eficaces en el anfitrión de expresión. Por ejemplo, los pares de secuencia señal/célula anfitriona adecuados incluyen la secuencia señal sacB de *B. subtilis* para la secreción en *B. subtilis*, y la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae* o Phol de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* para la secreción en *P. pastoris*. La secuencia señal se puede unir directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de la peptidasa señal a la secuencia que codifica la proteína, o a través de un puente de nucleótidos corto que consiste normalmente en menos de diez codones, donde el puente garantiza un marco de lectura correcto de la secuencia de TCR aguas abajo.

Los elementos para potenciar la transcripción y la traducción han sido identificados para los sistemas de expresión de proteínas eucarióticas. Por ejemplo, el posicionamiento del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de 1000 pb en cada lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles de transcripción de 10 a 400 veces en células vegetales. El constructo de expresión también debe incluir las secuencias de inicio de la traducción apropiadas. La modificación del constructo de expresión para incluir una secuencia consenso de Kozak para un inicio adecuado de la traducción puede aumentar el nivel de traducción 10 veces.

A menudo se emplea un marcador selectivo, que puede ser parte del constructo de expresión o puede estar separado de él (p. ej., transportado por el vector de expresión), de manera que el marcador se pueda integrar en un sitio diferente del gen de interés. Los ejemplos incluyen marcadores que confieren resistencia a los antibióticos (p. ej., bla confiere resistencia a la ampicilina para las células anfitrionas de *E. coli*, nptII confiere resistencia a la kanamicina a una amplia variedad de células procarióticas y eucarióticas) o que permiten que el anfitrión crezca en un medio mínimo (p. ej., HIS4 permite que *P. pastoris* o *S. cerevisiae* His<sup>-</sup> crezcan en ausencia de histidina). El marcador seleccionable tiene sus propias regiones reguladoras del inicio y terminación de la transcripción y de la traducción para permitir la expresión independiente del marcador. Si se emplea la resistencia a antibióticos como marcador, la concentración del antibiótico para la selección variará dependiendo del antibiótico, oscilando generalmente entre 10 y 600 µg de antibiótico/ml de medio.

El constructo de expresión se ensambla mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante conocidas (Sambrook et al, 1989; Ausubel et al, 1999). La digestión y ligación con enzimas de restricción son etapas básicas empleadas para unir dos fragmentos de ADN. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligación, y esto se puede conseguir rellenando los salientes, suprimiendo las porciones terminales de los fragmentos con nucleasas (p. ej., ExoIII), mutagénesis dirigida al sitio, o mediante la adición de nuevos pares de bases por medio de PCR. Se pueden emplear poliligadores y adaptadores para facilitar la unión de los fragmentos seleccionados. El constructo de expresión se ensambla típicamente en fases que emplean rondas de restricción, ligación, y transformación de *E. coli*. Se conocen en la técnica numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción del constructo de expresión (Lambda.ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, California, PET, Novagen Inc., Madison, Wis - citado en Ausubel et al, 1999) y la elección concreta no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación se verá influida por el sistema de transferencia génica seleccionado para la introducción del constructo de expresión en la célula anfitriona. Al final de cada fase, el constructo resultante se puede analizar mediante análisis de restricción, de la secuencia de ADN, de hibridación y de PCR.

El constructo de expresión se puede transformar en el anfitrión en forma del constructo del vector de clonación, ya sea lineal o circular, o se puede retirar del vector de clonación y utilizar tal cual o introducirlo en un vector de liberación. El vector de liberación facilita la introducción y el mantenimiento del constructo de expresión en el tipo de célula anfitriona seleccionada. El constructo de expresión se introduce en las células anfitrionas mediante cualquiera de una serie de sistemas de transferencia de genes conocidos (p. ej., competencia natural, transformación mediada químicamente, transformación de protoplastos, electroporación, transformación biolística, transfección, o conjugación) (Ausubel et al, 1999; Sambrook et al., 1989). El sistema de transferencia génica seleccionado depende de las células anfitrionas y de los sistemas vectores utilizados.

Por ejemplo, el constructo de expresión se puede introducir en células de *S. cerevisiae* mediante transformación de protoplastos o electroporación. La electroporación de *S. cerevisiae* se lleva a cabo fácilmente, y proporciona eficacias de transformación comparables a la transformación de esferoplastos.

Adicionalmente se describe un procedimiento de producción para aislar una proteína de fusión de interés. En el procedimiento, una célula anfitriona (p. ej., una célula de levadura, hongo, insecto, bacteriana o animal), en la que se ha introducido un ácido nucleico que codifica la proteína de interés conectada operativamente a una secuencia reguladora, se hace crecer a escala de producción en un medio de cultivo en presencia de la proteína de fusión para estimular la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de interés. Con posterioridad, la proteína de fusión de interés se aísla de las células anfitrionas cosechadas o del medio de cultivo. Se pueden utilizar técnicas convencionales de purificación de proteínas para aislar la proteína de interés del medio o de las células cosechadas. En particular, se pueden utilizar las técnicas de purificación para expresar y purificar una proteína de fusión deseada a gran escala (esto es en cantidades como mínimo de miligramos) a partir de una variedad de implementaciones incluyendo botellas rodadoras, matraces de agitación, placas de cultivo de tejidos, biorreactores o fermentadores.

Un complejo de fusión de proteínas expresado se puede aislar y purificar mediante métodos conocidos. Típicamente el medio de cultivo se centrifuga y a continuación se purifica el sobrenadante mediante cromatografía de afinidad o inmunoafinidad, p. ej., cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G o un protocolo de inmunoafinidad que comprende el uso de anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de fusión expresado tal como un TCR conectado o una región de inmunoglobulina del mismo. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden separar y purificar mediante una combinación apropiada de técnicas conocidas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos que utilizan la solubilidad tales como la precipitación de sal y la precipitación en disolvente, métodos que utilizan la diferencia en el peso molecular tales como la diálisis, la ultrafiltración, la filtración en gel, y la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, métodos que utilizan una diferencia en la carga eléctrica tales como la cromatografía en columna de intercambio iónico, métodos que utilizan la afinidad específica, tales como la cromatografía de afinidad, métodos que utilizan una diferencia en el carácter hidrófobo, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa y métodos que utilizan una diferencia en el punto isoeléctrico, tales como la electroforesis con isoelectroenfoque, columnas de afinidad con metales tales como Ni-NTA. Véanse en general Sambrook et al. y Ausubel et al. más arriba para la descripción referente a estos métodos.

Se prefiere que las proteínas de fusión de la presente invención sean sustancialmente puras. Esto es, las proteínas de fusión han sido aisladas de los sustituyentes celulares que normalmente las acompañan, de manera que las

proteínas de fusión se encuentran presentes preferiblemente con una homogeneidad de al menos 80% o 90% a 95% (p/p). Las proteínas de fusión que tienen una homogeneidad de al menos 98 a 99% (p/p) son las más preferidas para muchas aplicaciones farmacéuticas, clínicas y de investigación. Una vez purificada sustancialmente, la proteína de fusión debe estar sustancialmente libre de contaminantes para las aplicaciones terapéuticas. Una vez purificada parcialmente o hasta una pureza sustancial, las proteínas de fusión solubles pueden ser utilizadas terapéuticamente, o en la realización de análisis *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente memoria. La pureza sustancial se puede determinar mediante una variedad de técnicas convencionales tales como la cromatografía y la electroforesis en gel.

Los complejos de fusión de TCR truncado de la invención contienen una molécula de TCR que está suficientemente truncada, de manera que el complejo de fusión de TCR puede ser secretado al medio de cultivo después de la expresión. De este modo, un complejo de fusión de TCR truncado no incluirá regiones ricas en residuos hidrófobos, típicamente los dominios transmembrana y citoplásmico de la molécula de TCR. De este modo, por ejemplo, para una molécula de TCR DR1 truncada preferida de la invención, preferiblemente de aproximadamente los residuos 199 a 237 de la cadena b y de aproximadamente los residuos 193 a 230 de la cadena a de la molécula de TCR no están incluidos en el complejo de fusión de TCR truncado.

Los presentes complejos de fusión y conjugados de TCR son adecuados para su uso *in vitro* o *in vivo* con una variedad de células que están infectadas o pueden ser infectadas por una o más enfermedades.

## Métodos

### *Terapéuticos*

Se describen los métodos para prevenir o tratar enfermedades en pacientes en los que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método administrar al paciente un complejo de proteínas de fusión soluble que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad, formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias, y dañar o eliminar las células enfermas lo suficiente como para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

Se incluyen los métodos para prevenir o tratar enfermedades en pacientes en los que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método mezclar células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R con un complejo de proteínas de fusión soluble que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad, por ejemplo un complejo de péptido/MHC, administrar al paciente la mezcla de célula inmunitaria-complejo de proteínas de fusión, formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias, y dañar o eliminar las células enfermas lo suficiente como para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

Asimismo se describen los métodos para eliminar una célula diana, comprendiendo el método poner en contacto una pluralidad de células con un complejo de proteínas de fusión soluble, donde la pluralidad de células comprende adicionalmente células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio IL-15 de la reivindicación 1 y las células diana que portan un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos descritos en la presente memoria, formar un complejo de unión específico (puente) entre el antígeno sobre células diana y las cadenas de IL-15R sobre las células inmunitarias suficiente para unirse a y activar las células inmunitarias; y eliminar las células diana por medio de las células inmunitarias activadas unidas.

Asimismo se describen los métodos para incrementar la vida media *in vivo* de IL-15 y/o potenciar su capacidad para unirse establemente a las células inmunitarias (p. ej. aumento del tiempo de residencia en la superficie celular) a través de la generación de un complejo de proteínas de fusión soluble. Por ejemplo, se lleva a cabo la evaluación de los parámetros farmacocinéticos y el tiempo de residencia en la superficie celular del complejo de proteínas de fusión y se compara con IL-15 como se describe en la presente memoria. Los complejos de proteínas de fusión con un aumento de la vida media en suero o del tiempo de residencia en la superficie celular son preferibles basándose en la mejora de su utilidad terapéutica.

Los ejemplos de las enfermedades que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, neoplasias, incluyendo cáncer, o infecciones virales. Mediante "neoplasia" se quiere significar cualquier enfermedad que es causada por o resulta de niveles inadecuadamente altos de división celular, niveles inadecuadamente bajos de apoptosis, o ambos. Por ejemplo, el cáncer es un ejemplo de una neoplasia. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, leucemias (p. ej., leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma

de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Se considera que los trastornos linfoproliferativos también son enfermedades proliferativas.

También se incluyen los complejos de proteínas de fusión solubles según se reivindican para uso en un método de estimulación de la respuesta inmunitaria en un mamífero. También se incluyen los complejos de proteínas de fusión solubles según se reivindican para usar en un método de supresión de respuestas inmunitarias en un mamífero. En el caso de la supresión inmunitaria, puede ser particularmente ventajosa un complejo de proteínas de fusión o variante de IL-15 que comprende antagonistas de IL-15 o dominios IL-15 que carecen de la capacidad para unirse al complejo IL-15 $\beta$ <sub>v</sub>c.

Como ilustración del uso de la terapéutica con complejos de proteínas de fusión, una célula cultivada puede ser infectada por un patógeno de un solo serotipo. A continuación la célula infectada se pone en contacto mediante un complejo de proteínas de fusión especificado *in vitro*. Como se ha comentado previamente, el complejo de proteínas de fusión se configura de manera que el dominio tóxico es presentado a la célula infectada por la asociación del TCR. Después de proporcionar la introducción de la molécula bioactiva en la célula (generalmente menos de aproximadamente 30 minutos, se deja que las células causen el efecto deseado durante un período de tiempo de aproximadamente 2 a 24 horas, típicamente aproximadamente 18 horas. Después de este tiempo, las células se lavan en un tampón o medio celular adecuados y a continuación se evalúan para determinar su viabilidad. El tiempo suficiente para la eliminación o el daño celular por el complejo de proteínas de fusión variará con la molécula efectora concreta seleccionada. Sin embargo la viabilidad puede ser evaluada a menudo después de aproximadamente 2 a 6 horas hasta aproximadamente 24 horas. Como se explicará con más detalle a continuación, la viabilidad celular se puede medir y cuantificar fácilmente controlando la absorción de ciertos colorantes (p. ej., azul de tripano) o flúoros bien conocidos.

Las células incubadas con el complejo de proteínas de fusión de la presente invención se pueden analizar para determinar su viabilidad mediante métodos convencionales. En un enfoque ilustrativo, se puede analizar fácilmente la viabilidad celular midiendo la replicación del ADN después o durante la incubación. Por ejemplo, un análisis preferido indica la absorción celular de uno o más nucleósidos marcados detectablemente, tal como timidina radiomarcada. La absorción se puede medir convenientemente mediante varios enfoques convencionales incluyendo la precipitación de ácido tricloroacético (TCA) seguido de recuento de centelleo. Otros métodos de viabilidad celular incluyen técnicas de exclusión de azul de tripano o análisis de proliferación basados en WST-1 bien conocidos.

Las moléculas de TCR de los complejos de fusión de la invención se corresponden adecuadamente en la secuencia de aminoácidos con las moléculas de TCR de origen natural, p. ej. moléculas de TCR de ser humano, ratón u otro roedor, u otro mamífero.

Por consiguiente, un uso de la invención para la inhibición de una respuesta autoinmunitaria o inflamatoria incluiría un complejo de proteínas de fusión que comprendería un receptor de células T o anticuerpo, con especificidad de unión a un antígeno asociado con la enfermedad. Preferiblemente, se administra un complejo de TCR soluble "truncado", esto es el complejo de TCR no contiene una porción transmembrana. El complejo de proteínas de fusión también comprende una variante de IL-15 que funciona como antagonista de IL-15 para suprimir la respuesta inmunitaria no deseada. Después de la administración, el dominio TCR o anticuerpo dirige el complejo de proteínas de fusión al sitio de la enfermedad donde el antagonista de IL-15 suprime la respuesta autoinmunitaria o inflamatoria. Semejante complejo de proteínas de fusión puede ser particularmente útil para el tratamiento de alergias, enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente y artritis reumatoide o rechazo de trasplantes. Se podrían llevar a cabo enfoques no dirigidos similares utilizando variantes de IL-15 antagonistas como proteínas no de fusión.

Otro uso de la invención para la inducción de una respuesta inmunitaria proporciona la administración de una cantidad eficaz de un complejo de fusión de proteínas de la invención en presencia de cualquier molécula efectora co-estimuladora tal como una citoquina para inducir de ese modo una respuesta inmunitaria deseada en la localización del antígeno presentado que se une al polipéptido biológicamente activo.

También se pueden utilizar diferentes terapias de la invención combinadas, así como con otros agentes terapéuticos conocidos, tales como fármacos anti-inflamatorios para proporcionar un tratamiento más eficaz de un trastorno. Por ejemplo, se pueden utilizar complejos de fusión de proteínas inmunosupresores o variantes de IL-15 combinados con agentes anti-inflamatorios tales como corticosteroides y fármacos no esteroideos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y alergias.

Los compuestos de la invención serán especialmente útiles para un paciente humano que tiene o se sospecha que

5 tiene una enfermedad, trastorno o afección malignos. Los compuestos de la invención serán particularmente útiles en la elección como diana de determinados antígenos tumorales en pacientes humanos. Los ejemplos específicos de las enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen cánceres, p. ej., de mama, de próstata, etc., infecciones virales, p. ej., VHC, VIH, etc., así como otros trastornos específicos de las afecciones mencionadas en la presente memoria.

Sin desear estar vinculados a la teoría se cree que los múltiples y distintos compuestos unidos covalentemente de esta invención (esto es al menos IL-15 combinada con al menos un TCR) pueden aumentar significativamente la eficacia de la IL-15, p. ej., aumentando la localización de IL-15 del antígeno diana en sujetos individuales.

10 Por otra parte, en virtud del enlace covalente, los conjugados de la invención presentan la IL-15 y el TCR a la célula sujeto esencialmente de manera simultánea, un efecto que no se puede lograr fácilmente administrando los mismos compuestos en una formulación de "cóctel" de fármacos sin unir covalentemente los compuestos.

15 También se ha informado de que el tratamiento con un fármaco puede a su vez sensibilizar a un paciente frente a otro fármaco. Por lo tanto, la presentación esencialmente simultánea a la célula sujeto de IL-15 y TCR por medio del conjugado de la invención puede potenciar la actividad del fármaco, p. ej., proporcionando resultados sinérgicos y/o potenciando la producción de una respuesta inmunitaria.

#### *Diagnóstico*

20 Las proteínas de TCR de alta afinidad o multivalentes específicas para un ligando pMHC concreto son útiles en el diagnóstico de animales, incluyendo seres humanos que se cree que padecen una enfermedad asociada con el pMHC concreto. Los complejos de proteínas de fusión de la presente invención son útiles para determinar esencialmente cualquier antígeno, incluyendo pero no limitados a aquellos asociados con una afección neoplásica, una proteína anormal, una enfermedad autoinmunitaria o una infección o infestación con una bacteria, un hongo, un virus, un protozoo, una levadura, un nematodo u otro parásito.

25 Uno de tales métodos para detectar un tumor o una célula o tejido infectados viralmente en un sujeto, en donde la célula o tejido comprenden un antígeno peptídico tumoral o asociado con virus presentado sobre las células o el tejido en el contexto de un complejo de MHC comprende: a) administrar al sujeto un complejo de proteínas de fusión soluble de la invención que comprende un TCR soluble en condiciones que forman un complejo de unión específico entre el antígeno peptídico presentado y el TCR; y b) detectar el complejo de unión específico por ser indicativo de un tumor o célula o tejido infectados viralmente que comprenden el antígeno peptídico tumoral o asociado con virus presentado.

30 Los complejos de proteínas de fusión también se pueden utilizar en el diagnóstico de ciertos trastornos genéticos en los cuales se produce una proteína anormal. Las aplicaciones ilustrativas para los complejos de proteínas de fusión se encuentran en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias en las que existe un pMHC conocido. La diabetes de tipo I está relativamente bien caracterizada con respecto a los autoantígenos que atraen la destrucción inmunitaria. La esclerosis múltiple, la enfermedad celíaca, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide son enfermedades candidatas adicionales para semejante aplicación.

35 Los complejos de proteínas de fusión de la presente invención que comprenden polipéptidos variantes de IL-15 pueden ser particularmente útiles en estas aplicaciones. Por ejemplo, para un complejo de proteínas de fusión que comprende moléculas de TCR, las interacciones entre el dominio de la variante de IL-15 y el polipéptido de IL-15Ra generan moléculas de TCR multivalentes con aumento de la actividad de unión al antígeno, como se describe en la presente memoria. Por otra parte, la variante de IL-15 contiene cambios de aminoácidos que eliminan potencialmente la unión a las células que portan los receptores IL-15R $\beta$ γC, reduciendo de ese modo la unión no específica o no dirigida a células inmunitarias. Como resultado, se puede lograr una mejor detección de los antígenos específicos de TCR con tales complejos de proteínas de fusión. Adicionalmente, los complejos de proteínas de fusión de la invención se pueden multimerizar además por medio de secuencias de etiquetas peptídicas o conjugación con marcas detectables, como se describe en la presente memoria.

#### *Dosificación y administración*

40 La administración de los compuestos de la invención se puede realizar mediante una variedad de rutas adecuadas, incluyendo oral, tópica (incluyendo transdérmica, bucal o sublingual), nasal y parenteral (incluyendo inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular) siendo particularmente preferidas la ruta oral o parenteral. También se apreciará que el método preferido de administración y la cantidad de dosificación pueden variar con, p. ej., la afección y la edad del receptor.

45 Los compuestos de la invención se pueden usar en terapia solos o junto con otros medicamentos tales como aquellos con actividad farmacológica reconocida para tratar las indicaciones deseadas. Los medicamentos ilustrativos incluyen terapias reconocidas tales como cirugía, radiación, quimioterapia y otras formas de inmunoterapia (p. ej., vacunas, terapias basadas en anticuerpos). Los compuestos de esta invención se pueden administrar antes, durante o después de tales terapias según se requiera.

Si bien uno o más compuestos de la invención se pueden administrar solos, también pueden estar presentes como parte de una composición farmacéutica mezclados con un excipiente convencional, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración parenteral, oral u otra administración deseada y que no reaccionen perjudicialmente con los compuestos activos y no sean perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones farmacéuticas de la invención en general comprenden uno o más complejos de proteínas de fusión de la invención o constructos de ADN que codifican tales compuestos junto con uno o más portadores aceptables. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroethral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes coadyuvantes, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos.

Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas las disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas así como suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes.

Para la aplicación entérica, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas o cápsulas que tienen un aglutinante portador de talco y/o carbohidrato o similar, siendo preferiblemente el portador lactosa y/o almidón de maíz y/o almidón de patata. Se puede utilizar un jarabe, elixir o similar en donde se emplea un vehículo edulcorado. Las composiciones de liberación sostenida se pueden formular incluyendo aquellas en las que el componente activo está protegido con recubrimientos diferencialmente degradables, p. ej., mediante microencapsulación, recubrimientos múltiples, etc.

Los compuestos terapéuticos de la invención también se pueden incorporar a liposomas. La incorporación se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos de preparación de liposomas conocidos, por ejemplo sonicación y extrusión. Los métodos convencionales adecuados de preparación de liposomas también son descritos p. ej., por A.D. Bangham et al., *J. Mol. Biol.*, 23:238-252 (1965); F. Olson et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9-23 (1979); F. Szoka et al, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75:4194-4198 (1978); S. Kim et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339-348 (1983); y Mayer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168 (1986).

La invención también proporciona el uso para invocar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ser humano, incluyendo la vacunación de un mamífero tal como un ser humano contra un agente infeccioso o un trastorno diana, tal como el cáncer.

Estos métodos comprenden administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una secuencia de ADN que comprende un vector de ADN que codifica un complejo de proteínas de fusión de la invención. La preparación de los vectores de expresión de complejos de proteínas de fusión y variantes de IL-15 se describe más arriba y en los Ejemplos que siguen. Se ha informado sobre los métodos para la administración del ADN plasmídico, la absorción de ese ADN por las células del sujeto al que se ha administrado y la expresión de la proteína. Véase Ulmer, J.B., et al, *Science* (1993) 259:1745-1749.

Los vectores de ADN que codifican los complejos de proteínas de fusión de la invención se administran adecuadamente a un mamífero incluyendo un ser humano, preferiblemente mediante inyección intramuscular. La administración de ADNc al músculo esquelético de un mamífero con la absorción subsiguiente del vector de expresión administrado por parte de las células musculares y la expresión de la proteína codificada por el ADN han sido descritas por Ulmer et al. y representan un protocolo ilustrativo [Ulmer, J.B., et al, *Science* 259:1745-1749]. La dosis óptima para una aplicación terapéutica dada se puede determinar mediante métodos convencionales.

Además del tratamiento de trastornos humanos, los complejos de proteínas de fusión de la invención y los constructos de ADN de la invención que codifican tales moléculas tendrán un uso significativo para aplicaciones veterinarias, p. ej., tratamiento de trastornos del ganado tal como ganado vacuno, ovejas, etc. y animales domésticos tales como perros y gatos.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de un complejo de proteínas de fusión de la invención dado o el constructo de ADN que los codifica utilizadas en una terapia dada variarán de acuerdo con el compuesto o compuestos activos concretos que se estén utilizando, las composiciones concretas formuladas, el modo de aplicación, el sitio concreto de administración, el peso del paciente, la salud general, el sexo, etc., la indicación concreta que esté siendo tratada, etc. y otros factores semejantes que son reconocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el médico o veterinario a cargo. La tasas de administración óptimas para un protocolo de administración dado pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica usando ensayos de determinación de dosificación convencionales realizados por ejemplo, con respecto a las directrices anteriores y los ensayos descritos en la presente memoria.

## Ejemplos

Ha de apreciarse que la invención no se debe limitar a los ejemplos que se describen a continuación; de hecho, debe entenderse que la invención incluye cualquiera y todas las aplicaciones proporcionadas en la presente memoria y todas las variaciones equivalentes dentro de la práctica habitual del experto en la técnica.

- 5 Ejemplo 1 - Diseño de un complejo de proteínas de fusión que comprende las proteínas de fusión de scTCR/huIL15 y scTCR/huIL15R $\alpha$ . (Referencial)

Se ha establecido que la IL-15 se une de forma estable al dominio extracelular de IL-15R $\alpha$  y que el complejo resultante es capaz de modular (es decir, estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del Complejo de IL-15R de afinidad intermedia o elevada (1-4). Además, se ha demostrado que el TCR de cadena sencilla o los polipéptidos de anticuerpos se pueden fusionar a citoquinas y otros dominios efectores inmunitarios y que tales moléculas de fusión biespecífica conservan la actividad funcional de ambos dominios de fusión (5-8). Adicionalmente, se ha demostrado que las formas multivalentes del TCR proporcionan una mayor unión a sus ligandos (9). Por lo tanto una característica de la invención proporciona un complejo de proteínas de fusión que comprende al menos una proteína de fusión en donde un primer polipéptido de TCR se fusiona a IL-15 y al menos una fusión en donde un segundo polipéptido de TCR se fusiona al dominio extracelular de IL-15R $\alpha$ , de manera que las dos proteínas de fusión forman un complejo a través de las interacciones de unión entre los dominios de IL-15 e IL-15R $\alpha$ . En tal complejo de proteínas de fusión, los polipéptidos de TCR pueden ser iguales o diferentes y pueden estar en formato de cadena sencilla o heterodimérico.

Un ejemplo de un complejo de proteínas de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla se muestra esquemáticamente en la **Figura 1A**. En este complejo de proteínas de fusión, los dominios de TCR multivalentes proporcionan una mayor avidez/afinidad de unión por sus ligandos. Los ligandos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, complejos de péptido/MHC. Los dominios IL-15/IL-15R $\alpha$  proporcionan actividad inmunomoduladora. Los constructos de proteínas de fusión representativos que comprenden el complejo de proteínas de fusión se muestran esquemáticamente en la **Figura 1B**. En estos constructos el polipéptido de TCR es un TCR de cadena sencilla (264scTCR) compuesto de los dominios TCR-V $\alpha$  y TCR-V $\beta$ -C $\beta$  conectados por una secuencia conectora peptídica ((G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>). El polipéptido scTCR se fusiona a cualquiera de los dominios IL-15 o IL-15R $\alpha$ , directamente o a través de una secuencia conectora peptídica. Partiendo del polipéptido scTCR hay una secuencia de péptido señal (o péptido líder) que permite la expresión soluble. El péptido señal se escinde posteriormente durante el transporte de la proteína para generar la proteína de fusión madura. En otros ejemplos del complejo de proteínas de fusión, un dominio de anticuerpo puede sustituir a un dominio de TCR representado en la **Figuras 1A y 1B**. Tal anticuerpo puede estar en un formato de cadena sencilla o heteromultimérico. Para cualquiera de los complejos de proteínas de fusión descritos anteriormente, las secuencias pueden ser humanas o no humanas, por ejemplo, pero no limitadas a ratón. Estas secuencias se pueden emplear para una parte o la totalidad de los dominios de la proteína de fusión. Además, la disposición de los dominios puede variar siempre que las proteínas de fusión sigan siendo solubles y funcionales.

Ejemplo 2 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/huIL15 en un vector de expresión. (Referencial)

El aislamiento y la caracterización de los genes de TCR para TCR específico de p53 (aa264-272) se describieron previamente (5-7). Para obtener genes de IL15 e IL15R $\alpha$  humanos, se aislaron PBMC humanas de 200 ml de sangre de un donante (Núm. de Lote 2238789, Community Blood Bank, Miami, FL) con HISTOPAGUE-1077 (Sigma). Las células (1,5 x 10<sup>7</sup>) se activaron por medio de 30 ng/ml de PMA (Sigma), 200 ng/ml de ionomicina, y 220 ng/ml de IL2 humana recombinante en IMDM que contenía FBS al 10% en una incubadora con CO<sub>2</sub> durante 10 días. Las células activadas (1 x 10<sup>7</sup> por ml) se congelaron a -70°C para aplicaciones adicionales. Para purificar el ARN total de las PBMC activadas, se utilizó RNEASY PLUS MINI (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El Gen de IL15 humana que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total con el cebador directo

5'-CACCTTGCCATAGCCAGCTCTTC-3'

y el cebador inverso

5'-GTCTAAGCAGCAGAGTGATGTTTG-3'

por medio de SUPERSRIPT III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen) de acuerdo con las siguientes condiciones: para RT; 55°C 30 min; 94°C, 2 min; para amplificar ADNc; 94°C, 30 segundos; 53°C, 30 segundos; 68°C, 1 min; x40 ciclos; 68°C, 5 min. El producto de ADNc de la PCR de IL15 humana de 600 pb se separó mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen). El gen de la proteína IL15 humana madura se amplificó a partir del ADNc de IL15 humana de 600 pb con el cebador directo

55 5'-TGGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGGTGGATGAACATTTGGAC-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 63°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El gen de la proteína IL15 humana madura se purificó en gel y se clonó en el vector lanzadera, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Vector (Invitrogen), con la reacción TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon que contenía el inserto de gen de la proteína IL15 humana madura se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGTTAACAACACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGGTGGATGAACATTTGGAC-3'

10 mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 63°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El gen de la proteína IL15 humana madura se retiró del vector lanzadera mediante digestión con HpaI y MluI y se ligó en un vector de expresión pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR contiene el fragmento génico que codifica una secuencia líder de la cadena ligera de inmunoglobulina (o señal secretora) conectada a la proteína TCR de cadena sencilla quimérica soluble específica del péptido p53 (aa264-272) (c264scTCR) (5). El vector también contiene regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción, incluyendo una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y regiones reguladoras 3' con supuestos elementos reguladores del anclaje a la matriz. El vector también contiene secuencias de ADN que permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor de SV40/gen neoR/poli-A) y bacterias (gen Ori/AMP). La donación del fragmento de ADN que codifica la proteína IL15 humana madura en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/huIL15 que comprendía la siguiente secuencia: 3'- líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- $\alpha$  - conector peptídico - 264 TCR V- $\beta$  - TCR C- $\beta$  humano - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/huIL15), que se muestra en la Figura 2A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR/huIL15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 2B** y la **Figura 2C**, respectivamente.

30 Ejemplo 3 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/huIL15 que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión. (Referencial)

La construcción del vector pNEF38-c264scTCR/huIL15 se describió en el Ejemplo 2. Se utilizó una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en donde se sustituyeron tres residuos de cisteína por tres residuos de serina para conectar c264scTCR y huIL15. La región de bisagra se mutó y se amplificó a partir del gen c264scTCR/IgG1 descrito previamente (7) con el cebador directo

35 5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

40 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de la bisagra de IgG1 humana mutada de 70 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de la región bisagra mutado se digirió con HpaI y MluI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. El clon que contenía el inserto del gen de la región bisagra mutado se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

45 5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La huIL15 se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/huIL15 descrito en el Ejemplo 2 con el cebador directo

50 5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGGATG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de hUL15 de 380 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen hUL15 se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que contenía el gen mutado de la bisagra que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el inserto del gen de hUL15 se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

10 5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGGATG-3'

mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 2 min; 70°C 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y la proteína IL15 humana madura en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-hUL15 que comprendía la secuencia siguiente: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- $\alpha$  - conector peptídico - 264 TCR V- $\beta$  - TCR C- $\beta$  humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-hUL15), que se muestra en la Figura 3A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-hUL15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 3B** y **Figura 3C**, respectivamente.

Ejemplo 4 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/hUL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 en un vector de expresión. (Referencial)

El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15R $\alpha$  humano que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total de las PBMC con el cebador directo

5'-AGTCCAGCGGTGCCTGTGG -3'

y el cebador inverso

5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'

mediante SUPERSRIPT III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen) de acuerdo con las siguientes condiciones: para RT; 55°C, 30 min; 94°C, 2 min; para amplificar ADNc; 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 5 min. El producto de ADNc de la PCR de IL15R $\alpha$  humano de 970 pb se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen del dominio extracelular de IL15R $\alpha$  humano se amplificó a partir del ADNc de IL15R $\alpha$  humano de 970 pb con el cebador directo

5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

y el cebador inverso

5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 72°C 2 min; x35 ciclos, 72°C, 10 min. El gen del dominio extracelular de IL15R $\alpha$  humano se purificó en gel y se clonó en el vector lanzadera, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Vector (Invitrogen), mediante reacción TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon que contenía el inserto del gen del dominio extracelular IL15R $\alpha$  humano correcto se seleccionó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN con el GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó que el gen era el gen del dominio extracelular de IL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 humano. El gen del dominio extracelular de IL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 humano se retiró del vector lanzadera mediante digestión con HpaI y MluI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio extracelular de IL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 humano en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/hUL15R $\alpha$  que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- $\alpha$  - conector peptídico - 264 TCR V- $\beta$  - TCR C- $\beta$  humano - dominio extracelular de IL15 R $\alpha$  $\Delta$ E3. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/hUL15R $\alpha$  $\Delta$ E3), mostrado en la **Figura 4A**, que contiene el inserto del gen del dominio extracelular de IL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/hUL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 y de la proteína se muestran en **Figura 4B** y la **Figura 4C**, respectivamente.

Ejemplo 5 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huL15RαSushi en un vector de expresión. (Referencial)

El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15RαSushi humano se amplificó a partir del ADNc de IL15Rα humano de 970 pb (véase el Ejemplo 3) con el cebador directo

5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

5 y el cebador inverso

5'-TTGTTGACGCGTTTATCTAATGCATTTGAGACTGG-3'

mediante PfuULTRA (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 70°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de PCR del gen IL15RαSushi humano se purificó en gel y se digirió con HpaI y MluI. El gen se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio IL15RαSushi humano en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR/huL15Rα que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - IL15RαSushi humano. El vector resultante, mostrado en la **Figura 5A**, que contenía el inserto del gen IL15RαSushi humano correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/huL15RαSushi y de la proteína se muestran en la **Figura 5B** y la **Figura 5C**, respectivamente.

Ejemplo 6 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huL15RαSushi que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión. (Referencial)

La construcción del vector de pNEF38-c264scTCR/huL15RαSushi se describió anteriormente. Una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en la que tres residuos de cisteína se habían remplazado por tres residuos de serina se utilizó para conectar c264scTCR y huL15RαSushi. La región de bisagra se mutó, se amplificó, se ligó, y se verificó como antes. El huL15RαSushi se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/huL15RαSushi descrito anteriormente con el cebador directo

5'-TAATAAACGCGTATCACGTGCCCTC-3'

25 y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG -3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de huL15RαSushi de 250 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó a partir de la agarosa con un Kit de Extracción de Gel Qiaquick (Qiagen). El gen huL15RαSushi se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que contenía el gen de la bisagra mutado que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el inserto del gen de huL15 se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

35 5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG-3'

mediante RedTag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y la proteína IL15RαSushi humana en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR-hmt-huL15RαSushi que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15RαSushi humano. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-huL15RαSushi), que se muestra en la Figura 6A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-huL15RαSushi y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la Figura 6B y la Figura 6C, respectivamente.

Ejemplo 7 - Construcción de los genes c264scTCR/huL15RαSushi y c264scTCR/huL15 en un único vector de expresión. (Referencial)

Para lograr la expresión de dos proteínas de fusión de la invención en una única célula anfitriona, los genes que codificaban c264scTCR/huL15RαSushi y c264scTCR/huL15 se clonaron en un único vector de expresión. El gen c264scTCR/huL15RαSushi se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 5 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo 5'-TGAGTGTCCGGAACCATGGAGACAGACAC-3' y el cebador inverso 5'-

TTGTTGGCGGCCGCTTATCATCTAATGCATTTGAG-3' en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min ; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15RaSushi se purificó en gel, se digirió con BspEI y NotI y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con BspEI y NotI. El vector de expresión pSUN34R1 contiene dos sitios de clonación de genes de interés, así como regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción que incluyen una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y un intrón y regiones 3' con elementos reguladores. Este vector también contiene secuencias de ADN que permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor de SV40/gen neoR/poli-A) y bacterias (gen Ori/AMP). El vector que contiene el inserto del gen c264scTCR/IL15R $\alpha$ Sushi correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/huL15 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 2 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATAACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TGAGTGTTCAATTATCAAGAAGTGTGATGAAC-3'

15 en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15 se purificó en gel, se digirió con ClaI y Csp45I y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1-c264scTCR/huL15RaSushi que había sido digerido con ClaI y Csp45I. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi), mostrado en la **Figura 7**, que contenía el inserto del gen c264scTCR/huL15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/huL15RaSushi y c264scTCR/huL15.

Ejemplo 8 - Construcción de los genes c264scTCR/huL15Ra $\Delta$ E3 y c264scTCR/huL15 en un único vector de expresión. (Referencial)

El gen de fusión c264scTCR/huL15Ra $\Delta$ E3 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 4 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo

25 5'-TGAGTGTCGGAACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCAAGTGGTGTGCTG-3'

30 en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15Ra $\Delta$ E3 se purificó en gel, se digirió con BspEI y NotI y se ligó al vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con BspEI y NotI. El vector que contenía el inserto del gen c264scTCR/huL15Ra $\Delta$ E3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/huL15 se amplificó y se clonó en el vector de expresión descrito en el Ejemplo 7. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15Ra $\Delta$ E3), mostrado en la **Figura 8**, que contiene el inserto del gen c264scTCR/huL15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante la secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/huL15Ra $\Delta$ E3 y c264scTCR/huL15.

Ejemplo 9 - Generación de líneas celulares anfitrionas transfectadas que producen proteínas de fusión. (Referencial)

Los vectores de expresión se pueden introducir en una variedad de líneas de células anfitrionas mediante varios métodos diferentes de transformación, transfección o transducción. En uno de tales métodos, se sembraron células CHO-K1 ( $5 \times 10^4$ ) en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Las células se transfectaron con 5  $\mu$ g de vector de expresión que contenía los genes de fusión TCR/IL15 y/o TCR/IL15R $\alpha$  utilizando 10  $\mu$ l de reactivo Mirus TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con 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 la proteína de fusión con TCR fueron enriquecidas mediante 3-5 rondas de selección de MACS como se describe a continuación. Las células se desprendieron en EDTA 10 mM y se lavaron una vez con IMDM que contenía FBS al 10%. Las células se resuspendieron ( $10^7$  células en 100  $\mu$ l) y se incubaron con 5  $\mu$ g de reactivo de tetrámero de p53 conjugado con R-ficoeritrina (PE) (aa264-272)/HLA-A2 durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se incubaron con cuentas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 15 min a 4°C. Las células se cargaron en una columna magnética (en un campo magnético) y las células no unidas se eliminaron con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5%). Las células unidas a la columna se hicieron eluir con IMDM que contenía FBS al 10% después de que la columna se hubiera retirado del campo magnético. Este procedimiento permite el enriquecimiento de las células que expresan la proteína de fusión basándose en la presentación transitoria de la proteína de fusión soluble sobre la superficie celular durante el proceso de producción/secreción. La asociación en la superficie de la célula de las proteínas de fusión se controló después de cada enriquecimiento. Los niveles de proteínas de fusión unidas a la superficie celular determinados mediante citometría de flujo se compararon con los niveles de proteínas de fusión solubles presentes

en el medio de cultivo celular según se determinó mediante ELISA. Un ejemplo de la comparación se muestra en la **Figura 9A** y **9B**. En este ejemplo, células CHO-K1 transfectadas con pNEF38-c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi se enriquecieron por medio de MACS de una a cinco veces y después se sembraron ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) en una placa de 6 pocillos. Tras 24 horas, las células se desprendieron con EDTA 10Mm, se lavaron una vez con IMDM + FBS al 10% y se tiñeron (a  $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l de IMDM + FBS al 10%) con 0,6  $\mu$ g de tetrámero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 o la misma cantidad de tetrámero de CMVpp65 (aa495-503) conjugado con PE/HLA-A2 durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron una vez y se analizaron para determinar los niveles de proteína de fusión soluble asociada a la superficie celular mediante citometría de flujo, como se muestra en la **Figura 9A**. El nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo celular también se determinó mediante ELISA específico de TCR con un anticuerpo de captura, anticuerpo anti-TCR C $\beta$  humano (BF1), y un anticuerpo de detección, anticuerpo anti-TCR C $\beta$  humano biotinilado (W4F) descrito previamente (5), como se muestra en la **Figura 9B**. Los resultados indican que el proceso de enriquecimiento basado en cuentas magnéticas produjo transfectantes que producían un aumento de los niveles de proteína de fusión soluble. Las células transfectadas enriquecidas se subclonaron a continuación tres veces mediante dilución limitante y las líneas celulares de producción se escrutaron basándose en el nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo (determinado mediante el ELISA descrito anteriormente). Las líneas celulares de producción se expandieron y se cultivaron en IMDM + FBS al 10% o medio libre de suero en condiciones (esto es, matraces, centrifugas, fermentadores, bolsas, botellas) adecuadas para generar la proteína de fusión soluble.

En algunos casos, las células anfitrionas se co-transfectaron con diferentes vectores de expresión para generar transfectantes capaces de expresar múltiples proteínas de fusión. Los transfectantes que expresaban una proteína de fusión también pudieron ser transfectados de nuevo con uno o más vectores de expresión para generar transfectantes que expresaban múltiples proteínas de fusión. Las células también se transfectaron con un vector de expresión que contenía más de un gen de proteínas de fusión, como se ilustra en los Ejemplos 7 y 8, para generar un transfectante que expresa múltiples proteínas de fusión. Las células resultantes se pudieron utilizar para producir los complejos de proteínas de fusión de múltiples componentes de la invención como moléculas solubles en el medio de cultivo celular.

También se pudieron lograr altos niveles de producción de proteína de fusión o de complejo de proteínas de fusión a través de métodos de transfección y selección celulares descritos en U.S.S.N. 09/204.979.

Ejemplo 10 - Purificación de las proteínas de fusión o complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R $\alpha$ . (Referencial)

Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención se pueden purificar a partir de las células anfitrionas o los medios de cultivo celulares utilizando una variedad de métodos, incluyendo partición selectiva o solubilidad en disolventes o mediante separación (es decir, a través de cromatografía) basándose en la carga, el carácter hidrófobo, el carácter hidrófilo, el tamaño, y/o la unión selectiva o semiselectiva a un ligando. Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles se pueden generar a partir de materiales insolubles a través del uso de condiciones de plegamiento de proteínas apropiadas. En un ejemplo, la proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se purificó del medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo (BF1) que reconocía el dominio TCR-C $\beta$  humano. Típicamente, una columna que contenía Sefarosa conjugada con BF1 se equilibró primero con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (tampón de carga) y después se cargó a 2 ml/min con medio de cultivo celular de pH ajustado que contenía la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. A continuación, la columna se lavó con 5 veces el volumen de la columna de tampón de carga para eliminar las proteínas no unidas, y la proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se hizo eluir con 4 veces el volumen de la columna de citrato de Na 0,5 M, pH 4. Después de la recogida, el eluato se ajustó a pH 8,0 por medio de Tris-HCl 2 M, pH 8,0. La proteína purificada se cambió de tampón a PBS y se filtró utilizando un filtro de 0,22  $\mu$ m. La columna BF1 se vació con glicina-HCl 50 mM, pH 3,0, y se almacenó en etanol al 20% a 4°C para su uso posterior. La proteína de fusión se pudo purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico y/o de exclusión por tamaño. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían las proteínas de fusión de c264scTCR/IL15, c264scTCR/IL15R $\alpha$ Sushi y c264scTCR/IL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 se purificaron mediante los métodos anteriores y las muestras de las proteínas de fusión purificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras y seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. Los ejemplos de tales geles se muestran en la Figura 10. Las principales bandas de proteínas corresponden a los pesos moleculares correctos esperados basándose en las secuencias de las proteínas de fusión.

Ejemplo 11 - Generación de un complejo de proteínas de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R $\alpha$ . (Referencial)

IL15 se une específicamente al dominio extracelular de IL15R $\alpha$  con una alta afinidad (4). De este modo se puede formar un complejo de proteínas de fusión que porta los dominios de IL-15 e IL15R $\alpha$  en una variedad de condiciones, incluyendo dentro de la célula de expresión o extracelularmente con proteínas de fusión no purificadas o purificadas. En un ejemplo, se pueden mezclar cantidades molares iguales de proteínas de fusión purificadas en las condiciones apropiadas (es decir, 10 min a temperatura ambiente) para formar un complejo de proteínas de fusión. La formación de complejos se puede verificar utilizando una variedad de técnicas que incluyen análisis de unión directa, análisis de unión competitiva, inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, o análisis

basados en el tamaño, la actividad u otras propiedades del complejo. Por ejemplo, como se muestra en la **Figura 11**, la cromatografía de exclusión por tamaño puede verificar la formación de complejos que comprenden las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi basándose en el peso molecular. En este estudio, se cargaron aproximadamente 100  $\mu$ g de c264scTCR/huIL15 (0,5 mg/ml) en una columna Superdex 200 HR 10/30 para el análisis. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15 es de aproximadamente 57 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11A**), el peso molecular estimado es de aproximadamente 98 kD, lo que sugiere que es probable que esta proteína de fusión sea un monómero. Del mismo modo, se cargaron aproximadamente 60  $\mu$ g de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi (0,3 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi es de aproximadamente 52 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11B**), el peso molecular estimado de la proteína de fusión es de aproximadamente 81 kD, lo que sugiere de nuevo que esta proteína de fusión es un monómero. El análisis SEC anterior de otras proteínas de fusión basadas en TCR mostró diferencias similares entre el peso molecular monomérico calculado y el peso molecular estimado de la proteína de fusión glicosilada. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 126  $\mu$ g de las proteínas mezcladas (0,63 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil mostrado en la **Figura 11C**. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno a aproximadamente 170 kD, que es un heterodímero de las dos proteínas de fusión y otro a aproximadamente 91 kD, que es probablemente una mezcla de formas monoméricas de las proteínas de fusión. De este modo, la aparición de las especies de 170 kD en la preparación de las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de proteínas de fusión de la invención.

También se llevó a cabo análisis del complejo de proteínas de fusión que comprendía las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3. Se cargaron aproximadamente 100  $\mu$ g de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 (0,5 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 es de aproximadamente 60 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 12A**), el peso molecular estimado de la proteína es de aproximadamente 173 kD, lo que sugiere que esta proteína existe como un homodímero. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 118  $\mu$ g de las proteínas mezcladas (0,59 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil que se muestra en la **Figura 12B**. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno es >210 kD, que es probablemente un tetrámero compuesto por dos heterodímeros y el otro es de aproximadamente 93 kD, que es probable que sea un monómero de c264scTCR/huIL15. De este modo, la aparición de la especie de 170 kD en la preparación de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de proteínas de fusión de la invención.

Ejemplo 12 - El complejo de proteínas de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R $\alpha$  muestra una mayor unión a los complejos de péptido/MHC. (Referencial)

Los complejos de proteínas de fusión generados como se ha descrito anteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban este antígeno, se cargaron células T2 HLA-A2.1 positivas con el péptido p53 (aa264-272) a 26°C durante la noche y después se almacenaron a  $5 \times 10^6$  células/ml en nitrógeno líquido. Las células T2 que no se incubaron con péptido sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con el péptido p53 o de control se descongelaron y se resuspendieron en 1 ml de IMDM + FBS al 10%. Las células ( $5 \times 10^5/100 \mu$ l) se tiñeron a continuación durante 30 min a RT con 0,5  $\mu$ g de las proteínas de fusión siguientes: c264scTCR/huIL15, c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi, complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,1  $\mu$ g de anticuerpo anti-TCR C $\beta$  humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100  $\mu$ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5  $\mu$ g de estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina en 100  $\mu$ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para el análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 13**, cada una de las proteínas de fusión fue capaz de teñir específicamente las células cargadas con péptido p53. Además, el complejo de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi presentó una mayor unión específica a través de los dominios c264scTCR multivalentes a los complejos de p53(aa264-272)/HLA-A2.1 presentados sobre las células T2. En particular, el complejo de proteínas de fusión dimerico mostró una mejor tinción de las células T2 cargadas con péptido p53 que las proteínas de fusión monoméricas c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi. Estos datos sugieren que el complejo de proteínas de fusión multimérico proporcionará mejores propiedades de reconocimiento del antígeno que la forma monomérica de las proteínas de fusión.

Ejemplo 13 - Generación de genes mutantes de huIL-15 y construcción de vectores de expresión de genes mutantes de c264scTCR-hmt-huIL15. (Referencial)

Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi son capaces de formar un complejo a través de interacciones de los dominios de IL-15 e IL-15R $\alpha$  y el complejo de proteínas de fusión multivalente tiene unión mejorada para los complejos de péptido/MHC. Tal complejo de proteínas de fusión tiene ventajas como agente de búsqueda específico de antígeno o dirigido, de diagnóstico y terapéutico basadas en la actividad de unión mejorada. La capacidad de los dominios de IL-15/IL-15R $\alpha$  de la proteína de fusión para unirse a

células que expresan los receptores de IL-15 también es una característica deseable como se indica en la presente memoria. Sin embargo, existen aplicaciones en las que resulta ventajoso aumentar o disminuir la capacidad de los dominios de IL-15/IL-15R $\alpha$  para interactuar con y/o afectar a las respuestas de las células que expresan los receptores de IL15. Por ejemplo, puede ser deseable reducir esta interacción en las aplicaciones (es decir, usos de búsqueda y de diagnóstico), en las que el objetivo principal es la utilización del complejo de proteínas de fusión para la detección específica de los complejos de péptido/MHC. En aplicaciones terapéuticas, también puede ser deseable que los complejos de proteínas de fusión generados contengan dominios de IL-15 capaces de aumentar o disminuir las respuestas mediadas por IL-15. Para abordar esta cuestión, se llevó a cabo el análisis mutacional para identificar los residuos de IL-15 que afectan a su unión al complejo de IL-2/15R $\beta\gamma_c$  sin afectar a sus interacciones con IL-15R $\alpha$ . Las mutaciones resultantes pueden crear variantes de IL-15 incluyendo antagonistas o agonistas. Además del uso de las proteínas de fusión de la invención, los antagonistas y agonistas de IL-15 resultantes también pueden tener utilidad como citoquinas solubles (es decir, proteínas de no fusión) o como un complejo con dominios de IL-15R $\alpha$ , para aplicaciones de búsqueda, diagnóstico o terapéuticas. Por ejemplo, los antagonistas de IL-15 pueden ser útiles en la supresión de respuestas inmunitarias no deseadas, mientras que los agonistas de IL-15 se pueden utilizar para estimular respuestas inmunitarias en estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Basándose en la comparación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura de IL-15 con IL-2, se identificaron varios aminoácidos que podrían afectar potencialmente a las interacciones entre IL-15 e IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  y/o  $\gamma_c$ . Como se muestra en la **Tabla 1** y en la **Figura 14A**, se crearon variantes de IL-15, en las que los posibles sitios de unión de la proteína de IL-15 humana madura a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ , aminoácidos en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 (numeración basada en la secuencia de IL-15 humana nativa madura), fueron sustituidos cada uno o combinados con dos o más sustituciones distintas. El ácido aspártico de la posición 8 se sustituyó por alanina o asparragina. El ácido aspártico en la posición 61 se sustituyó por alanina. La asparragina de la posición 65 se sustituyó por alanina o ácido aspártico. La asparragina de la posición 72 se sustituyó por arginina o ácido aspártico. La glutamina de la posición 108 se sustituyó por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Gln de la posición 108 se sustituyeron cada uno por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una asparragina o alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una serina o arginina. Para generar mutantes de IL-15, se utilizó la PCR solapante.

Por ejemplo, para generar el Asp de la posición 8 con la sustitución de residuos de alanina o asparragina, se utilizó el vector pNEF38-c264scTCR/huIL15 como molde para amplificar dos fragmentos solapantes de ADNc con el cebador directo para el fragmento 1

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 1

5'-AGATCTTCAATTTTTTTTCAAMKHACTTATTACATTCACCCAG-3'

y con el cebador directo para el fragmento 2

5'-ACTGGGTGAATGTAATAAGTDMKTTGAAAAAATTGAAGATC-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 2

5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se fusionaron entre sí mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x10 ciclos. El fragmento de ADNc de la PCR solapante se amplificó con el cebador directo

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG -3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 64°C, 1,5 min; 69°C, 1,5 min; x30 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de huIL-15 mutante se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de huIL15 mutante se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR-hmt que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el gen de huIL15 de la posición 8 con una sustitución de alanina o asparragina se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de

ADN que codificaba la proteína IL-15 humana mutada en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-huIL15D8A o c264scTCR-hmt-huIL15D8N que comprendía la secuencia siguiente: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- $\alpha$  - conector peptídico - 264 TCR V- $\beta$  - TCR C- $\beta$  humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15D8A humana o -IL15D8N humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N), mostrado en la **Figura 14B**, se confirmó mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen de fusión pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 14C** y en la **Figura 14D**, respectivamente.

Se introdujeron otras mutaciones de una manera similar y se construyó un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Los vectores de expresión se introdujeron en células CHO.K1 para generar transfectantes estables como se describe en el Ejemplo 9. La producción y purificación de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 se llevaron a cabo usando métodos similares a los descritos en los Ejemplos 10 y 11. La generación de variantes de IL-15 como citoquinas solubles se puede llevar a cabo a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo la producción en sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos (véanse, por ejemplo, el documento WO9527722; Hsu et al. 2005 J. Immunol. 175:7226).

Ejemplo 14 - Caracterización funcional de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R $\alpha$  (Referencial)

La unión funcional del dominio TCR de la proteína de fusión se demostró basándose en el ELISA y los métodos de tinción celular utilizando los reactivos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 descritos en el Ejemplo 9 y los métodos de tinción de células presentadoras de antígeno descritos en el Ejemplo 12. La capacidad de los dominios de IL15 e IL15R $\alpha$  de la proteína de fusión para interactuar se demostró como se describe en el Ejemplo 11. Adicionalmente la actividad funcional de los dominios IL15 e IL15R $\alpha$  se puede evaluar a través de una variedad de métodos, incluyendo la unión a receptores IL-2/15R $\beta\gamma_c$  o la modulación de la actividad de las células inmunitarias que portan los receptores de IL-15. En un ejemplo, las células CTLL-2, que expresan IL-15R (cadenas  $\alpha\beta\gamma_c$ ) heterotrimérico, se incubaron con 0,5  $\mu$ g de las proteínas de fusión individuales: c264scTCR/huIL15, 264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi, o complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5  $\mu$ g de tetrámero de p53 (aa 264-272) conjugado con R-ficoeritrina (PE)/HLA-A2 durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis por medio de citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 15**, la asociación de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 y el complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi a través de sus dominios huIL15 con los receptores de IL-15 sobre las células CTLL-2 se puede detectar con el tetrámero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 que reconoce el dominio c264scTCR de la proteína de fusión unida. Estos resultados indican que los dominios tanto de IL-15 como de TCR de la proteína de fusión/complejos de proteína de fusión son capaces de interactuar funcionalmente con sus ligandos cognados.

Además, las células CTLL-2 son dependientes de citoquinas para el crecimiento y pueden responder a IL-15 humana recombinante. Se desarrolló un análisis de proliferación de WST-1 basado en células utilizando células CTLL-2 para evaluar la actividad biológica frente a IL-15 de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión. WST-1 (Roche) es un reactivo que se puede convertir en formazán por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. En el análisis de WST-1, la cantidad de formazán en el medio de cultivo medida por la cantidad de absorbancia a 440-450 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Las células CTLL-2 (2 x 10<sup>4</sup>/200  $\mu$ L) se incubaron con las concentraciones indicadas de las proteínas de fusión (0-28 ng/ml): c264scTCR/huIL15, complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Las células se incubaron con 10  $\mu$ l de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 100  $\mu$ l de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440-450 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en **Figura 16**, la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 a una concentración tan baja como 1,8 ng/ml (~ 31,25 pM), lo que sugiere la activación de las células CTLL-2 con la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 a través del receptor de IL15 de alta afinidad. Curiosamente, los complejos de proteínas de fusión también apoyaron proliferación de células CTLL-2, pero en un menor grado lo que sugiere que la actividad estimuladora de c264scTCR/huIL15 era inhibida tras la formación del complejo con c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3 (una vez o cuatro veces, respectivamente). Esto sugiere que la unión de c264scTCR/huIL15 al receptor de IL15 de alta afinidad es inhibida por las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o c264scTCR/huIL15R $\alpha$  $\Delta$ E3. Estos resultados proporcionan evidencia de que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión pueden activar o suprimir las respuestas de las células inmunitarias en diferentes condiciones.

Se llevaron a cabo análisis similares con líneas celulares que expresaban solamente los receptores de IL-15 $\beta\gamma_c$  de afinidad intermedia, tales como las líneas celulares 32D $\beta$  (véase más abajo). En algunos casos, es posible que la actividad biológica de IL15 en la estimulación de la proliferación de las células que portan IL-15R sea mejorada cuando ésta se encuentra en un complejo con el dominio de IL15R $\alpha$  (1-3). Se evaluará la estimulación de la proliferación celular por los complejos de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o c264scTCR/huIL15 +

c264scTCR/huIL15R $\alpha$ ΔE3 y puede proporcionar una evidencia adicional de que los complejos de proteína de fusión pueden estimular o activar la respuesta inmunitaria de las células inmunitarias.

Ejemplo 15 - Los complejos de proteínas de fusión diméricos de las variantes TCR/IL15R $\alpha$ Sushi y TCR/IL15 exhiben una unión específica de TCR al complejo de péptido/MHC pero menos unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ . (Referencial)

Los complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 descritos anteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, se cargaron células T2 positivas para HLA-A2.1 ( $2 \times 10^6$  mL) con péptido p53 (aa264-272) 20  $\mu$ M a 37°C en presencia de 1 x PLE (Altor Bioscience) durante 2-3 horas. Las células T2 que no se incubaron con el péptido y las células 32D $\beta$  que expresaban IL-2/15R $\beta\gamma_c$  sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con péptido p53, las células T2 de control, o las células 32D $\beta$  ( $2 \times 10^5$ /100  $\mu$ l) se incubaron a continuación durante 30 min a 4°C con 320 nM de los siguientes complejos de proteínas de fusión diméricos: 1) c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi, 2) c264scTCR/huIL15D8A + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi, y 3) c264scTCR/huIL15D8N + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi. Estos complejos se generaron incubando 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 purificada y 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi purificada a 4°C durante 3 horas: Después de la tinción, las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5  $\mu$ g de anticuerpo anti-TCR C $\beta$  humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100  $\mu$ l de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5  $\mu$ g de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina en 100  $\mu$ l de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 17A**, el complejo de c264scTCR/huIL15D8A + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi y el complejo de c264scTCR/huIL15D8N + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi exhibieron una actividad equivalente a la del complejo c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi para teñir específicamente las 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. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 17B** y la **Figura 17C**, los complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutantes mostraron una menor tinción de fondo en las células T2 de control (**Figura 17B**) y en las células 32D $\beta$  positivas para IL-15R $\beta\gamma_c$  (**Figura 17C**) que el complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15 de tipología amplia. Así, estos complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 (D8A y D8N) no muestran actividad de unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$  presentes en las células 32D $\beta$ . Se llevaron a cabo estudios similares de unión al receptor IL-15R $\beta\gamma_c$  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 conservan la actividad para reconocer complejos de péptido/MHC y muestran una actividad de unión menor o mayor de los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ .

Para confirmar los dominios TCR e IL-15 funcionales de las proteínas de fusión anteriores, se midió la actividad de unión del péptido/MHC e IL-15R $\alpha$  mediante un análisis ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron previamente con BF1 20 nM, un anticuerpo anti-TCR C $\beta$ , o TCR/IL15R $\alpha$ Sushi 20 nM en tampón carbonatado de pH 9,1 (bicarbonato de sodio 35 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 17,5 mM, NaCl 50 mM) durante 3 horas a 4°C. Las placas se lavaron con tampón de lavado (imidazol 40 mM, NaCl 150 mM) 4 veces y se bloquearon con BSA-PBS al 1% durante 10 minutos. Se añadieron las proteínas de fusión indicadas a una concentración de 0,03 - 4 nM a las placas y se incubaron a RT durante 30 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces. Las proteínas de fusión capturadas con BF1 se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de tetrámero de p53 conjugado con HRP/HLA-A2.1 durante 45 minutos a RT y las proteínas de fusión capturadas con TCR/IL15R $\alpha$ Sushi se incubaron con 50 ng/ml de anti-IL-15 humana biotinilada de ratón durante 30 minutos a RT. Después de lavar 4 veces, la placa incubada con anti-IL-15 humana biotinilada de ratón se incubó con 0,25  $\mu$ g/ml de HRP-estreptavidina durante 15 minutos. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron con sustrato de peroxidasa ABT durante 1-10 minutos y se desarrollaron para la medición de absorbancia a 405 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 18A** y en la **Figura 18B**, las proteínas de fusión compartieron una actividad de unión específica de TCR similar para el tetrámero p53/HLA-A2 y una actividad de unión a IL-15 equivalente para IL15R $\alpha$ Sushi. Se llevaron a cabo estudios similares de la unión de IL-15R $\alpha$  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 conservan la actividad para reconocer los complejos de péptido/MHC y los receptores IL-15R $\alpha$ .

Ejemplo 16 - Caracterización funcional de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 mutantes. (Referencial)

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas de fusión que comprenden un antagonista o agonista de IL-15 pueden ser útiles como agentes dirigidos para inhibir o estimular las respuestas mediadas por IL-15 (es decir, actividad de células T o células NK) en el sitio de la enfermedad. Para determinar la bioactividad frente a IL-15 de estas proteínas de fusión para afectar a las respuestas inmunitarias, se llevaron a cabo estudios de proliferación de celular con células CTLL-2 que expresaban IL-15R (cadenas  $\alpha\beta\gamma_c$ ) de alta afinidad y con células 32D $\beta$  que expresaban IL-15R (cadenas  $\beta\gamma_c$ ) de afinidad intermedia. Las células ( $2 \times 10^4$ /200  $\mu$ L) se incubaron con 0,4-40 nM de las proteínas de fusión de TCR/IL15 descritas anteriormente durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en

una incubadora con CO<sub>2</sub>. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19A** y en la **Figura 19B**, la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 que comprende el dominio IL-15 de tipo salvaje puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 y 32Dβ a una concentración tan baja como 40 pM o 1 nM, respectivamente. Curiosamente, la proteína de fusión que comprende una variante de IL15 con una sustitución de asparragina a ácido aspártico en la posición 72 con un aminoácido (c264scTCR/huIL15N72D) era mucho más activa que la proteína de fusión que comprendía el dominio IL-15 de tipo salvaje al apoyar la proliferación de la línea celular 32Dβ, que muestra la actividad biológica a una concentración tan baja como 80 pM (**Figura 19B**). En este sentido, la proteína de fusión que comprendía la variante de IL-15 (huIL15N72D) mostró una actividad superagonística. En un complejo con c264scTCR/IL15RαSushi a una razón uno a uno, c264scTCR/huIL15N72D tenía una capacidad de unión similar a la de c264scTCR/huIL15wt al complejo de p53/HLA-A2.1 en células T2 (**Figura 17A**), pero mostró una mayor capacidad de unión a los receptores IL-15Rβγ<sub>c</sub> sobre las células 32Dβ (**Figura 17C**). En contraste, las proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 con sustituciones de la posición 8 (c264scTCR/huIL15D8N o c264scTCR/huIL15D8A), en la posición 65 (c264scTCR/huIL15N65A), en la posición 108 (c264scTCR/huIL15Q108A), o una sustitución diferente en la posición 72 (c264scTCR/huIL15N72R) fueron menos activas en el apoyo a la proliferación de las células tanto CTLL-2 como 32Dβ en comparación con la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15wt (**Figura 19A y Figura 19B**). Se llevaron a cabo estudios similares de la actividad proliferativa dependiente de IL-15 con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Tabla 1. Los datos apoyan la hipótesis de que las mutaciones en las posiciones 8, 61, 65, 72 y 108 de la proteína IL-15 pueden dar como resultado antagonistas de IL-15 con disminución de la unión a IL-15R y poca o ninguna actividad para estimular la respuesta inmunitaria. Los resultados con las sustituciones en la posición 72 son inesperados, dado que un mutante (c264scTCR/huIL15N72R) actuó como antagonista de IL-15, mientras que un mutante diferente (c264scTCR/huIL15N72D) mostró un aumento de la unión a IL-15R y mayor actividad en la estimulación de respuestas inmunitarias.

En una circunstancia típica, la IL-15 es trans-presentada por IL15Rα sobre la superficie de una célula dendrítica a los receptores IL-15Rβγ<sub>c</sub> sobre una célula T de memoria, NKT, o NK para apoyar la supervivencia celular y estimular las respuestas inmunitarias. Un antagonista debe bloquear la trans-presentación de IL-15 uniéndose a IL15Rα. Para evaluar si las proteínas de fusión antagonistas pueden competir con c264scTCR/huIL15wt para bloquear su actividad para apoyar el crecimiento de células CTLL-2, se incubaron 4 x 10<sup>4</sup> células CTLL-2 con 0,5 nM de c264scTCR/huIL15wt en presencia o ausencia de 50 nM (exceso molar de 100 veces) de diversas proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutante a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19C**, la capacidad de c264scTCR/huIL15wt para apoyar la proliferación de células CTLL-2 fue totalmente bloqueada en presencia de 100 veces más de c264scTCR/huIL15D8N, c264scTCR/huIL15D8A, c264scTCR/huIL15D8A/Q108A, c264scTCR/huIL15Q108A, o c264scTCR/huIL15D8N/N65A, y se redujo 62% en presencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15N72R. Esto sugirió que estas proteínas de fusión eran los antagonistas de la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. Estos datos indican que las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutante eran antagonistas funcionales de la actividad de IL-15, como era de esperar basándose en la capacidad de estas proteínas para unirse a los receptores IL-15Rα pero no IL-15Rβγ<sub>c</sub>.

Se llevarán a cabo estudios similares con otras proteínas de fusión de TCR/IL15 y variantes de IL-15 descritas en la presente memoria para demostrar la actividad antagónica y agonística de IL-15. Como se resume en la Tabla 1, las sustituciones en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 de IL-15 muestran la capacidad de afectar a la unión de IL-15 a IL-15R (cadenas βγ<sub>c</sub>). Otras sustituciones en las posiciones 92, 101, y 111 de IL-15 también se evaluarán como posibles sitios de unión para la interacción con IL-15R. Además, las combinaciones de los cambios que incluyen sustituciones en todos o varios de estos residuos pueden crear los antagonistas o agonistas de IL-15 eficaces. Incluyendo las moléculas descritas anteriormente, las variantes de IL-15 que se van a evaluar incluyen aquellas con cambios en la posición 8 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 61 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 65 a alanina, ácido aspártico, o arginina; en la posición 72 a alanina, ácido aspártico, o arginina; y en las posiciones 92, 101, 108, o 111 a alanina o serina.

Ejemplo 17 - Conjugación célula-célula y redireccionamiento de las células inmunitarias por las proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Rα. (Referencial)

Para demostrar que las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión pueden tender puentes entre las células que portan el receptor de IL-15 con células diana que portan el péptido/MHC, se cargarán células T2 con péptido p53 (aa264-272) o péptido CMVpp65 (aa495-503) de control y a continuación se marcarán con dihidroetidio. Las células CTLL-2 se marcarán con calceína AM y las dos poblaciones de células marcadas se mezclarán y se incubarán en presencia o ausencia de las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión. En ausencia de los complejos de proteínas de fusión o cuando las células T2 se cargaban con péptido de control, se prevé que las células permanezcan como dos poblaciones distintas según se evalúa por citometría de flujo. Sin embargo, cuando las células T2 se cargan con p53 (aa264-272) y se incuban con las células CTLL-2 en presencia de proteínas o complejos de fusión, la aparición de una población de células con doble tinción sería indicativa de conjugación de las células T2 con las células CTLL-2 a través de las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión.

Del mismo modo, se pueden llevar a cabo estudios para demostrar que los complejos de proteínas de fusión pueden tender puentes entre células inmunitarias que portan el receptor de IL-15 y células diana que portan el péptido/MHC y dirigir la citotoxicidad inmunitaria contra las células diana. Por ejemplo, las células T2 se cargarán con péptido p53 (aa264-272) o péptido CMVpp65 (aa495-503) de control y a continuación se marcarán con calceína AM. Las células efectoras inmunitarias que portan receptores de IL-15 (es decir, células NK o células T activadas) se mezclarán en diferentes proporciones y se incubarán en condiciones adecuadas (es decir 37°C durante 2-4 horas) en presencia o ausencia del complejo de proteínas de fusión. La citotoxicidad se evaluará basándose en la liberación de calceína desde las células diana T2 al medio de cultivo mediante métodos convencionales. La liberación específica de calceína-AM se medirá o se comparará con el control no específico de calceína-AM liberada espontáneamente. En ausencia del complejo de proteínas de fusión o cuando las células T2 se cargaron con el péptido de control, se esperaban bajos niveles de citotoxicidad para las células diana. Sin embargo, cuando las células T2 se cargan con p53 (aa264-272) y se incuban con las células efectoras inmunitarias en presencia del complejo de proteínas de fusión, la lisis específica de las células T2 sería una indicación de que las células efectoras inmunitarias son redireccionadas contra las células presentadoras del péptido p53 a través del complejo de proteínas de fusión. Se llevarán a cabo estudios similares con líneas de células tumorales que presentan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 como células diana.

Ejemplo 18 - Demostración *in vivo* de los efectos antitumorales de agonistas de variantes de IL-15, proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15. (Referencial)

Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o agonistas de variantes de IL-15 tienen actividad anti-tumoral *in vivo*, se utilizó un modelo de tumor de xenoinjerto experimental. Se han empleado líneas de células tumorales humanas que expresan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, tales como melanoma A375, adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, carcinoma pancreático PANCI, en estudios de eficacia en animales similares utilizando otras proteínas de fusión basadas en TCR (5-7). Por ejemplo, se inyectarán células de melanoma humano A375 por vía subcutánea en el flanco de ratones carentes de sistema inmunitario y se permitirá que se establezcan los tumores durante tres días. A los ratones portadores de tumor se les inyectará por vía intravenosa complejo c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o un agonista de variante de IL-15 (intervalo de dosis - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS, diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se medirá el tamaño del tumor y se calcularán los volúmenes del tumor. Se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con el complejo de proteínas de fusión o el agonista de la variante de IL-15 sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Programas de dosificación alternativos, que incluyen la dosificación en múltiples ciclos también pueden demostrar la eficacia antitumoral de la proteína de fusión o el agonista de la variante de IL-15. Las líneas de células tumorales que carecen de complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 (tales como HT-29 o AsPC-1 (5, 9)) se pueden utilizar como controles para el reconocimiento específico de antígenos por el dominio c264scTCR del complejo de proteínas de fusión. Se podrían utilizar complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendían otros dominios de TCR (es decir, específicos para el péptido CMVpp65 (aa495-503) (9)) como controles de redireccionamiento no tumoral.

Además, se llevarán a cabo estudios de transferencia adoptiva de células en ratones portadores de tumores de xenoinjertos. Por ejemplo, se aislarán células inmunitarias que portan el receptor de IL-15, tales como esplenocitos no sometidos a tratamiento previo o activados (o de memoria), células NK o células T, de ratones y se incubarán con el complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R $\alpha$ Sushi o una variante de IL-15 agonística en condiciones que permitan la unión a las células. En algunos casos, se utilizarán el complejo de proteínas de fusión o una variante de IL-15 agonística para activar las células inmunitarias. Las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con los complejos de proteína de fusión se transferirán a continuación a ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores A375. Los controles incluirán la transferencia de las células inmunitarias no tratadas, el complejo de proteínas de fusión solo y PBS. El crecimiento del tumor se controlará y se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con complejos de proteínas de fusión sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Alternativamente, la variante de IL-15 o el complejo de proteínas de fusión y las células inmunitarias se administrarán al mismo tiempo, o por separado en los mismo momentos o en momentos diferentes. Las células inmunitarias pueden ser autólogas o alogénicas en relación con el anfitrión portador de un tumor. El número de células transferidas y el programa de dosificación se variarán para evaluar y optimizar la eficacia antitumoral. Como se ha descrito anteriormente, se emplearán otras líneas tumorales o complejos de proteínas de fusión para determinar el papel del direccionamiento al antígeno en cualquier actividad antitumoral observada.

Ejemplo 19 - El tratamiento *in vitro* de células inmunitarias con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15: TCR/IL15R $\alpha$  seguido de transferencia adoptiva de células proporciona una mejora de la supervivencia en el modelo animal de tumor por xenoinjerto. (Referencial)

Para demostrar la eficacia anti-tumoral de las células NK de ratón alogénicas enriquecidas preincubadas con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R $\alpha$  sobre el crecimiento del tumor, se llevó a cabo el siguiente estudio utilizando células tumorales NSCLC A549A2 humanas en un modelo de metástasis experimental en ratones carentes de sistema inmunitario.

A los ratones carentes de sistema inmunitario atímicos (n = 4 por grupo, hembra, 5-6 semanas de edad) se les inyectó por vía intravenosa (IV) a través de la vena lateral de la cola la línea de células tumorales NSCLC humana A549-A2 a  $5 \times 10^6$  células/ratón. La línea celular A549-A2 representa un transfectante de la línea parental A549 positiva para p53 que porta un vector que expresa el ADNc de HLA-A2.1 humano.

5 Los bazos de los ratones A2 (fondo B6) se recogieron y las células NK se aislaron utilizando un kit de aislamiento de células NK de Miltenyi Biotech, Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó una suspensión de células individuales de esplenocitos mediante homogeneización de los bazos a través de un tamiz metálico (60 de malla) en HBSS. Los glóbulos rojos de la sangre se lisaron en tampón de lisis de glóbulos rojos ACK. Las células se incubarán con cóctel de biotina-anticuerpo (10  $\mu$ l para  $10^7$  células) durante 10 min a 4-8°C. Se determinó el número de leucocitos y se añadieron 30  $\mu$ l de tampón (PBS, pH 7,2, BSA al 0,5% y EDTA 2 mM) y 20  $\mu$ l de microcuentas anti-biotina por 107 células y la mezcla se incubó a 4-8°C durante 15 min. Las células se lavaron en 2 ml de tampón y se centrifugaron a 300xg durante 10 min. Las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de tampón para cargarlas en la columna MACS. Se recogió el flujo continuo y se determinó la pureza de las células NK utilizando el análisis FACScan.

15 Con el fin de activar las células, las células NK ( $5 \times 10^6$ ) se cultivaron a 37°C durante la noche en presencia o ausencia de complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$ , proteína de fusión de TCR-IL2 o rhIL-2 en matraces T25 en 10 mL de RPMI 1640 con un suplemento de FBS al 10%. El complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  y la proteína de fusión de TCR-IL2 se añadieron a una concentración de 0,8  $\mu$ g/ml y se añadió rhIL-2 a 0,2  $\mu$ g/ml. Después incubar durante la noche, las células se recogieron y se preincubaron en 0,5 mg/ml de complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  o proteína de fusión de TCR-IL2 o 0,125 mg/ml de rhIL-2 en 100  $\mu$ l sobre hielo durante 30 min. Después de lavar en PBS (1 ml), las células se resuspendieron en PBS a  $10 \times 10^6$ /mL para la transferencia adoptiva.

25 El día 1, se inyectaron i.v. a los ratones a través de la vena de la cola células tumorales A549A2 ( $5 \times 10^6$ ) para establecer tumores pulmonares. Catorce días después de la inyección de las células tumorales, los ratones se aleatorizaron y se dividieron en 5 grupos (n = 4). Los ratones se trataron con ciclofosfamida (CTX) a través de inyección intraperitoneal a una dosis de 200 mg/kg los días 14 y 21. Las células NK ( $1 \times 10^6$ /ratón) preincubadas con diferentes proteínas de fusión o rhIL-2 se inyectaron iv los días 16 y 22, y los ratones que recibieron PBS sirvieron como controles. Un resumen del programa de tratamiento es el siguiente:

Grupo	CTX		Células NK	
	Dosis (mg/kg)	Inyección (IP)	Dosis ( $\times 10^6$ )	Inyección (IV)
CTX	200	Días 14, 21	0	Días 16, 22
CTX + NK/rhIL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/MART-1scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/c264scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/complejo de proteínas de fusión c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22

30 La supervivencia de los ratones portadores de tumores se controló cada día. Los ratones moribundos se sacrificaron y se contaron como muertos. Los ratones que sobrevivieron más de 100 días después de la inyección del tumor se consideraron curados.

35 Las supervivencias medias para los ratones en los grupos de tratamiento con CTX, CTX + NK/rhIL-2, CTX + NK/MART1scTCR-IL2, CTX + NK/c264scTCR-IL2 y complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  son de 52, 67,5, 64,5, 85,5, y 80 días, respectivamente (**Figura 20**). De este modo, la transferencia adoptiva de las células NK activadas con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  dio como resultado un tiempo más largo de supervivencia media que el observado en los animales portadores de tumor tratados con quimioterapia solo o con células NK activadas por MARTscTCR-IL2 o rhIL-2 no dirigidos. Los resultados de este experimento piloto indican que la activación y el direccionamiento de las células NK de ratón con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  pueden proporcionar una mayor actividad antitumoral.

Ejemplo 20 - Mejora de la unión de los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R $\alpha$  a células inmunitarias que portan IL-15R como se evidencia por un tiempo de residencia prolongado en la superficie celular. (Referencial)

5 El tiempo de residencia en la superficie celular de los complejos de proteínas de fusión sobre las células portadoras de IL-15R puede influir en la capacidad de la proteína de fusión para elegir como diana, o unir mediante puentes células efectoras con células tumorales específicas de TCR. Para investigar esto, se compararon directamente la unión de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15, los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R $\alpha$  e IL-15 recombinante a células CTLL-2 que portan receptor IL-15R $\alpha\beta\gamma$ C y células CTLL-2 que portan receptores IL-15R $\beta\gamma$ C, células 32D $\beta$  por citometría de flujo. Después de la incubación con las diversas proteínas, las células se lavaron y se incubaron en medio a 37°C durante hasta 180 min y el nivel de las proteínas que permanecían en la superficie celular se detectó con mAAb anti-IL-15 marcado con PE. Las comparaciones entre la tinción inicial a tiempo 10 cero y tiempos posteriores permitieron la determinación del tiempo de residencia de la superficie celular para cada una de las proteínas que se unían a IL-15R. El aumento del tiempo de residencia sobre la superficie celular de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15 o los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R $\alpha$  en comparación con IL-15 sería una indicación de la actividad de unión al receptor mayor y más estable.

Ejemplo 21 - Aumento de la vida media *in vivo* de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R $\alpha$  en comparación con IL-15 en ratones. (Referencial)

20 Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$ , IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble en la cepa de ratón transgénico para HLA-A2.1/Kb. La presencia del dominio HLA-A2.1, para el cual está restringido c264scTCR/IL-2, puede influir en la farmacocinética de esta proteína de fusión y debe proporcionar una visión "humanizada" más relevante de la farmacocinética que otras cepas de ratón. A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa cantidades equivalentes molares de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$ , IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble y se recogió la sangre en varios momentos de 5 minutos a dos semanas después de la inyección. Las 25 concentraciones en suero de las proteínas de fusión se evaluaron utilizando formatos de ELISA, descritos anteriormente. Las concentraciones de IL-15 se detectaron con un ELISA específico de IL-15 convencional.

30 Los parámetros farmacocinéticos *in vivo* de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$ , IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble se determinaron utilizando un soporte lógico de ajuste de curvas (p. ej., WinNonlin). Los valores de C<sub>max</sub> elevados, el incremento de la vida media en suero o la disminución del aclaramiento para c264scTCR/IL-15 o complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R $\alpha$  en comparación con IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble serían una indicación de que la generación de la fusión de TCR-IL15 o del complejo de TCR/IL15:TCR/IL-15Ra proporciona una farmacocinética más favorable que la observada con IL-15 sola.

35 Ejemplo 22 - Demostración *in vivo* de los efectos inmunosupresores de antagonistas de variantes de IL-15, proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15

40 Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o los antagonistas de variantes de IL-15 tienen actividad inmunosupresora *in vivo*, se utilizó un modelo de artritis autoinmunitaria experimental. Se ha demostrado que la artritis autoinmunitaria se puede inducir después de la administración de colágeno de tipo II (CII) en ratones transgénicos HLA-DR4 (Rosloniec et al. 1998. J Immunol. 160:2573-8). Adicionalmente, se han caracterizado las células T específicas de CII implicadas en la patología de esta enfermedad. Los genes de TCR de estas células T se utilizaron para construir vectores de expresión y las líneas celulares anfitrionas adecuados para generar CIIscTCR/IL15 que comprendían antagonistas de variantes de IL-15 y proteínas de fusión de CIIscTCR/IL15R $\alpha$ Sushi como se ha descrito en ejemplos anteriores. Después de la inducción de la artritis mediante administración de CII, se inyectaron intravenosamente a ratones transgénicos HLA-DR4 CIIscTCR/IL15-antagonista+complejo 45 CIIscTCR/IL15R $\alpha$ Sushi o un antagonista de variante de IL-15 (intervalo de dosificación - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se evaluaron las articulaciones de la pata del ratón y se evaluaron para determinar el grado de inflamación en una escala de 0 a 4. Se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen artritis. La supresión de la artritis (p. ej. disminución de la incidencia o la puntuación clínica) en algunos o todos los ratones tratados con el complejo de proteínas de fusión o la variante de IL-15 sería una indicación de un efecto inmunosupresor del tratamiento. Programas de dosificación 50 alternativos que incluyen ciclos múltiples de dosificación también pueden demostrar la eficacia inmunosupresora de la proteína de fusión o la variante de IL-15. Se podrían utilizar complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendieran otros dominios de TCR (esto es específicos para el péptido p53) como controles no dirigidos a la enfermedad para demostrar la especificidad de la capacidad de las proteínas de fusión de TCR redireccionadas para 55 dirigir la actividad inmunosupresora al sitio de la enfermedad.

## Referencias

1. Mortier, E., A. Quemener, P. Vusio, I. Lorenzen, Y. Boublik, J. Grotzinger, A. Plet, e Y. Jacques. 2006. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. J Biol Chem 281: 1612-1619.

2. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, y L. Lefrancois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* 177: 6072-6080.
3. Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh, y J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R {alpha} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9166-9171.
- 5 4. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6: 595-601.
5. Belmont, H. J., S. Price-Schiavi, B. Liu, K F. Card, H. I. Lee, K. P. Han, J. Wen, S. Tang, X. Zhu, J. Merrill, P. A. Chavillaz, J. L. Wong, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Potent antitumor activity of a tumor-specific soluble TCR/IL-2 fusion protein. *Clin Immunol* 121: 29-39.
- 10 6. Card, K. F., S. A. Price-Schiavi, B. Liu, E. Thomson, E. Nieves, H. Belmont, J. Builes, J. A. Jiao, J. Hernandez, J. Weidanz, L. Sherman, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, y H. C. Wong. 2004. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains. MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunol Immunother* 53: 345-357.
- 15 7. Mosquera, L. A., K. F. Card, S. A. Price-Schiavi, H. J. Belmont, B. Liu, J. Builes, X. Zhu, P. A. Chavillaz, H. I. Lee, J. A. Jiao, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, R. L. Wong, y H. C. Wong. 2005. In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgG1 Fusion Protein. *J Immunol* 174: 4381-4388.
8. Penichet, M. L., E. T. Harvill, y S. L. Morrison. 1997. Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 8: 106-118.
- 20 9. Zhu, X., H. J. Belmont, S. Price-Schiavi, B. Liu, H. I. Lee, M. Fernandez, R. L. Wong, J. Builes, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Visualization of p53264-272/HLA-A\*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor. *J Immunol* 176: 3223-3232.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION
- 5 <120> Moléculas de fusión y variantes de il-15
- <130> 20793EP3
- <140>
- 10 <141>09-05- 2008
- <150> 60/928,900
- <151>11-05- 2007
- 15 <160> 40
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 114
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |     |     |
- 25 Thr Ser
- <210> 2
- <211> 345
- <212> DNA
- 30 <213> Homo sapiens
- <400> 2
- |            |            |            |             |            |            |     |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| aactgggtga | atgtaataag | tgatttgaaa | aaaattgaag  | atcttattca | atctatgcat | 60  |
| attgatgcta | ctttatatac | ggaaagtgat | gttcacccca  | gttgcaaagt | aacagcaatg | 120 |
| aagtgctttc | tcttggagtt | acaagttatt | tcaactgagt  | ccggagatgc | aagtattcat | 180 |
| gatacagtag | aaaatctgat | catcctagca | aacaacagtt  | tgtcttctaa | tgggaatgta | 240 |
| acagaatctg | gatgcaaaga | atgtgaggaa | ctggaggaaa  | aaaatattaa | agaatttttg | 300 |
| cagagttttg | tacatattgt | ccaaatgttc | atcaaacactt | cttga      |            | 345 |
- 35 <210> 3
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 3

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

5

<210> 4

<211> 1563

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

15 <400> 4

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcgccagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
ggcagcggcg gtgggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
tcaaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaaggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagtggtc 840
ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
acactggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggaacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcggcga ggcctgggg 1200
agagcagacg ttaacaactg ggtgaatgta ataagtgatt tgaaaaaaat tgaagatctt 1260
attcaatcta tgcataattga tgctacttta tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc 1320
aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg gagttacaag ttatttcaact tgagtcggga 1380
gatgcaagta ttcattgatac agtagaaaat ctgatcatcc tagcaacaa cagtttgtct 1440
tctaattgga atgtaacaga atctggatgc aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaaat 1500
attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat attgtccaaa tgttcatcaa cacttcttga 1560
taa 1563
    
```

<210> 5

<211> 517

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

25

<400> 5

ES 2 642 008 T3

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

ES 2 642 008 T3

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

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

Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu  
 435 440 445

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

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

Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu  
 485 490 495

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

Phe Ile Asn Thr Ser  
 515

<210> 6  
 <211> 1614  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10 <400> 6  
 accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60  
 accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120  
 cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttatac tgttctggta tgtccagtac 180  
 ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccagc ggttcaagga 240  
 gtgaatggct tgcaggctga gtccagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaagcc 300  
 tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360  
 cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tggtagcggt 420  
 ggcagcggcg gtgggtggtc cggtagcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480  
 tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540  
 aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat 600  
 gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660  
 gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc 720

tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780  
 gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagtggttc 840  
 ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaggcc 900  
 aactggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960  
 aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agcccctcaa ggagcagccc 1020  
 gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg 1080  
 cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140  
 gagtggacce aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctgggggt 1200  
 agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260  
 acgcgtaact ggggtaatgt aataagtgat ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320  
 atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380  
 gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt 1440  
 attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttctc ttctaattggg 1500  
 aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1560  
 tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg ataa 1614

<210> 7

<211> 534

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 7

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

ES 2 642 008 T3

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 Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro  
 405 410 415

Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile  
 420 425 430

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 435 440 445

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 450 455 460

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 465 470 475 480

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 485 490 495

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 500 505 510

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 515 520 525

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 530

5 <210> 8  
 <211> 1647  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 8

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggctgcagct gtcctcaag tactattcag gagacccagt ggttcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
ggcagcggcg gtggtgggtc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480
tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagtggttc 840
ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaagcc 900
aactgggtgt gctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtgagacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcga ggcctgggtg 1200
agagcagacg ttaacatcac gtgccctccc ccatgtccg tggaacacgc agacatctgg 1260
gtcaagagct acagcttgta ctccagggag cggtaacatt gtaactctgg tttcaagcgt 1320
aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtgttgaaca aggccacgaa tgtcgccacc 1380
tggacaaccc ccagtctcaa atgcattaga cccgcagctt catctcccag ctcaaacac 1440
acagcggcca caacagcagc tattgtcccg ggtcccagc tgatgccttc aaaatcacct 1500
tccacagga ccaagagat aagcagtatc gagtccctcc acggcacccc ctctcagaca 1560
acagccaaga actgggaact cacagcatcc gcctcccacc agccgcagc tgtgtatcca 1620
cagggccaca gcgacaccac ttgataa 1647
    
```

5 <210> 9

<211> 545

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 9

```

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
    
```

15

ES 2 642 008 T3

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

ES 2 642 008 T3

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala  
 385 390 395 400  
 Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp  
 405 410 415  
 Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys  
 420 425 430  
 Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys  
 435 440 445  
 Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu  
 450 455 460  
 Lys Cys Ile Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys  
 485 490 495  
 Ser Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His  
 500 505 510  
 Gly Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser  
 515 520 525  
 Ala Ser His Gln Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr  
 530 535 540

Thr  
 545

<210> 10  
 <211> 1410  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10

<400> 10  
 accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60  
 accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120  
 cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180  
 ccgcggcagg ggctgcagct gtcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240  
 gtgaatggct tgcaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300  
 tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360  
 cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420  
 ggcagcggcg gtgggtgggtc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480  
 tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaaggc aaggacaaaa agcaaagatg 540  
 aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600  
 gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660  
 gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720  
 tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780  
 gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840  
 ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900  
 aactgggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960  
 aatgggaagg aggtgcacag tggggctcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020  
 gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcgg caccttctgg 1080  
 cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140  
 gagtggacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcoga ggcctgggg 1200  
 agagcagacg ttaacatcac gtgccctccc cccatgtccg tggaaacacgc agacatctgg 1260  
 gtcaagagct acagcttgta ctccagggag cggtagattt gtaactctgg tttcaagcgt 1320  
 aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtgttgaaca aggccacgaa tgtcgcccac 1380  
 tggacaacce ccagttctca atgcattaga 1410

15 <210> 11  
 <211> 468  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

5

<400> 11

```

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

```

ES 2 642 008 T3

	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
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
Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp	405		410		415
Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys	420		425		430
Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys	435		440		445
Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu	450		455		460
Lys Cys Ile Arg	465				

<210> 12  
 <211> 1467  
 <212> DNA

5

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10

<400> 12  
 accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60  
 accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120  
 cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttatac tgttctggta tgtccagtac 180  
 ccgcgccagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccagc ggttcaagga 240  
 gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaagcc 300  
 tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360  
 cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420  
 ggcagcggcg gtgggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480

```

tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
ccaccggagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
acactggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatggaaggg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctcggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtgagacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcgca ggcctggggt 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260
acgcgtatca cgtgcctctc ccccatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc 1320
tacagcttgt actccagga gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 1380
acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc 1440
cccagtctca aatgcattag atgataa 1467

```

<210> 13

<211> 485

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 13

```

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

```

ES 2 642 008 T3

	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	Val	Asn	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro				
				405					410					415					
Ser	Pro	Thr	Arg	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala				
			420					425					430						
Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile				
	435						440					445							
Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu				
	450					455					460								
Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser				
465					470					475					480				
Leu	Lys	Cys	Ile	Arg															
				485															

<210> 14  
 <211> 1614  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10

<400> 14

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggtgacgct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
ggcagcggcg gtgggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
tcaaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgagggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagtggtc 840
ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaaggcc 900
acactggtgt gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggctcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggaacc aggatagggc caaaccgctc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggt 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatctctc gacaaaactc acacatctcc accgtctoca 1260
acgcgtaact ggtggaatgt aataagtctt ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320
atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt 1440
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttgtc ttctaattggg 1500
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaaactg agggaaaaaaa tattaaagaa 1560
tttttgacaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg ataa 1614

```

<210> 15  
 <211> 1614  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10

```

<400> 15
accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggtgacgct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
ggcagcggcg gtgggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
tcaaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgagggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagtggtc 840
ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaaggcc 900
acactggtgt gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggctcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggaacc aggatagggc caaaccgctc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggt 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatctctc gacaaaactc acacatctcc accgtctoca 1260
acgcgtaact ggtggaatgt aataagtaat ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320
atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt 1440
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttgtc ttctaattggg 1500
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaaactg agggaaaaaaa tattaaagaa 1560
tttttgacaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg ataa 1614

```

15 <210> 16  
 <211> 534  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 642 008 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 16

```

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

```

5

ES 2 642 008 T3

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 Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro  
 405 410 415

Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Ala Leu Lys Lys Ile  
 420 425 430

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 435 440 445

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 450 455 460

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 465 470 475 480

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 485 490 495

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 500 505 510

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 515 520 525

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 530

<210> 17  
 <211> 534  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

10 <400> 17

ES 2 642 008 T3

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

ES 2 642 008 T3

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 Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro  
 405 410 415

Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asn Leu Lys Lys Ile  
 420 425 430

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 435 440 445

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 450 455 460

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 465 470 475 480

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 485 490 495

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 500 505 510

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 515 520 525

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 530

<210> 18

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10

<400> 18

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10

<210> 19

15 <211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 19

caccttgcca tagccagctc ttc 23

<210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 10 <400> 20  
 gtctaagcag cagagtgatg tttg 24  
  
 <210> 21  
 <211> 30  
 15 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
 20  
 <400> 21  
 tggtaacaa ctgggtgaat gtaataagtg 30  
  
 <210> 22  
 <211> 36  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
 30  
 <400> 22  
 acgcgttat caagaagtgt tgatgaacat ttggac 36  
  
 35 <210> 23  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 23  
 45 tggtaggta acgagcccaa atcttctg 28  
  
 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 24  
 55 attattacgc gttggagacg gtggagatg 29  
  
 <210> 25  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 65 <400> 25  
 tgagtgatcg ataccacat ggagacagac ac 32

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 10 <400> 26  
 tggtagacgc gtaactgggt gaatg 25  
  
 <210> 27  
 <211> 32  
 15 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
 20  
 <400> 27  
 tggtagtcta gaattataa gaagtgtga tg 32  
  
 <210> 28  
 <211> 20  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 28  
 agtccagcgg tgcctgtgg 20  
  
 35 <210> 29  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 29  
 45 tgacgcgttt aagtgggtgc gctgtgccct g 31  
  
 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 30  
 55 tggtaacat cacgtgccct cccccatg 29  
  
 <210> 31  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 65 <400> 31  
 ttgttagcgc gtttatctaa tgcattgag actgg 35

<210> 32  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 10 <400> 32  
 taataaacgc gtatcacgtg ccctc 25  
  
 <210> 33  
 <211> 31  
 15 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
 20  
 <400> 33  
 tgggtgtcta gattatcatc taatgcattt g 31  
  
 <210> 34  
 <211> 32  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 34  
 tgagtgccg gaaccacat ggagacagac ac 32  
  
 35 <210> 35  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 35  
 45 ttgtggcgg ccgcttatca tctaatgcat ttgag 35  
  
 <210> 36  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 <400> 36  
 55 tgaggttcg aattatcaag aagtggtgat gaac 34  
  
 <210> 37  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético  
  
 65 <400> 37  
 ttgtggcgg ccgcttatca agtgggtcgcg ctg 33

<210> 38  
<211> 42  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

10 <400> 38  
agatctcaa tttttcaa mkhacttatt acattcaccc ag 42

<210> 39  
<211> 42  
15 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

20 <400> 39  
actgggtgaa tgtaataagt dmkttgaaaa aaattgaaga tc 42

<210> 40  
<211> 31  
25 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 40  
tgggtgtcta gattatcaag aagtggtgat g 31

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un complejo de proteínas de fusión solubles que comprende al menos dos proteínas de fusión solubles, en donde  
la primera proteína de fusión comprende (a) un primer anticuerpo o fragmento funcional del mismo unido covalentemente a (b) el polipéptido de interleuquina 15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo; y
- 5 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo anticuerpo o fragmento funcional del mismo unido covalentemente a (d) un polipéptido receptor  $\alpha$  de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;
- 10 en donde el dominio IL-15 de la primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión solubles, en donde el anticuerpo es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto y en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o un Fv de cadena sencilla.
2. El complejo de proteínas de fusión solubles de la reivindicación 1, en donde el antígeno para el dominio de anticuerpo comprende un receptor o ligando de la superficie celular.
3. El complejo de proteínas de fusión solubles de la reivindicación 2, en donde el antígeno comprende un antígeno CD, un receptor o ligando de citoquina o quimioquina, un receptor o ligando de factor de crecimiento, factor tisular, molécula de adherencia celular, moléculas de MHC/de tipo MHC, receptor de Fc, receptor de tipo Toll, receptor NK, TCR, BCR, receptor o ligando co-estimulador positivo/negativo, receptor o ligando de tipo muerte, antígeno asociado a tumores, o antígeno codificado por virus.
- 15 4. El complejo de proteínas de fusión solubles de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina unido covalentemente a un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina por medio de una secuencia conectora polipeptídica.
- 20 5. El complejo de proteínas de fusión solubles de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de IL-15 es una variante de IL-15 que comprende al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de IL-15 nativa, por ejemplo, una o más sustituciones o deleciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1), tal como la sustitución de D por N o A en la posición 8, D por A en la posición 61, N por A en la posición 65, N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura, N por R en la posición 72 o Q por A en la posición 108 de la secuencia de IL-15 humana madura, o cualquier combinación de estas sustituciones.
- 25 6. El complejo de proteínas de fusión solubles de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método para estimular o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero.
- 30 7. Un vector de ADN que comprende:
- una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-5; y
- 35 una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

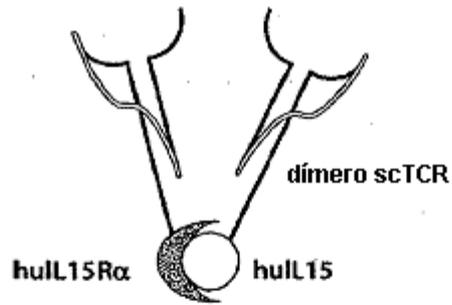


Fig. 1A

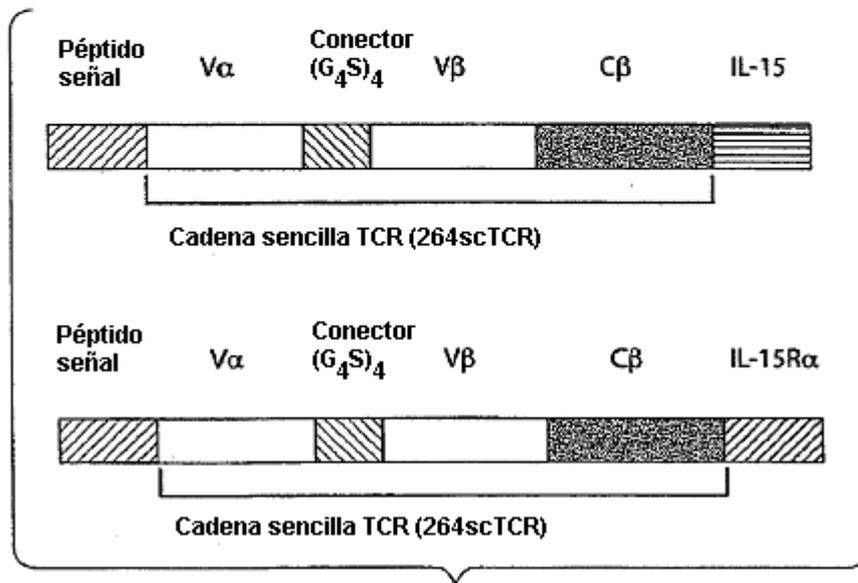


Fig. 1B

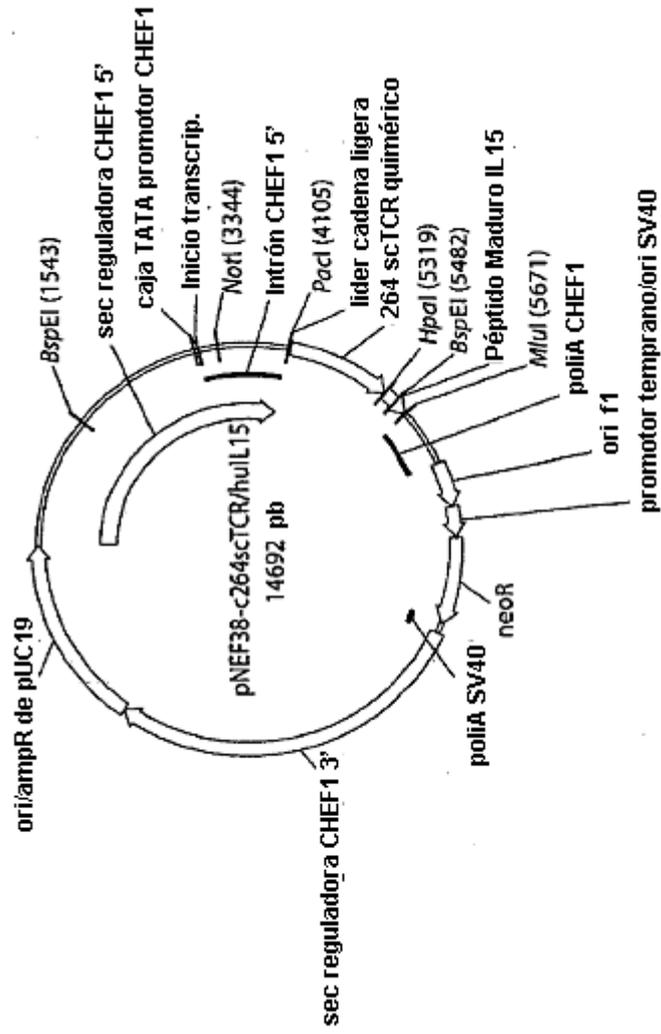


Fig. 2A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCCTGTTATGGGTAAGTCTGCTGCTGGGTTCCAGGTTCCACC6GGTCAGT  
 CAGTGACGGACCCCGATGCTCGGCTCAGTCTCTGAGAGGAGCCCTCTGACAGCTGAGATGCAAGTATTC  
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTCTGTTGTTCCAGTACCCCGGCGAGGGGCTGAGCTGCTCCCTCAG  
 TACTATTCCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTT  
 CCTTCCACCTGCGGAAAGCCCTCTGTGCACTGGAAGCCACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTGGCCGAGGA  
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT  
 GGCAGGGGGTGGTGGTCCGGTGGCCGGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCTCGAGCAATTCAAAAGTCA  
 TTCAGACTCCAAATATCTGGTGAAGGGCAGGACAAAAGCAAAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG  
 ACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAATAAAGAACTAAGTAAAGTAAATTTTGTAAACTTTTCAAGAT  
 CAAGAAGTTCCTCAGCAATAGACNTGACTGAAAACGATCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT  
 GCAGCCTAGAATTCAGTCTCTGNGGCGAGGACTCAGCACTGTACCCTGTGTCAGCAGTCTGTCCAGG  
 GGGCGGCACAGAAATTTCTTTGGTAAAGGAAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTT  
 CCACCCGAGGTGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT  
 GCCTGGCCACAGGCTTCTCCCTGNCCTGAGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGAAAGGAGGTGCACAG  
 TGGGTCAGCACGGACCCGACCCCTCAAGGAGGACGCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGC  
 AGCCGCTGAGGCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGCAAGTCCAGTTCT  
 ACGGCTCTGGGAGATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCAACCCAGATCGTCAAGCCCGGA  
 GGCCTGGGTAGACAGACGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAGTGATTTTGAABAAAATTTGARGATCTT  
 ATTCATCTATGCATATGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGTGTTTCCACCCCGGATGCAAGTATTCATGATAC  
 CAATGAAGTGGCTTCTTTGGAGTTTCAAGTTTATTTTCACTTGGATCCGGGATGTAACAGATCTGGATAC  
 AGTAGAAAATCTGATCATCTTAGCAAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAACAGAAATCTGGATGC  
 AAGAATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAATATATAAAGAAATTTTTCAGAGTTTGTACATATTTGTCAAA  
 TGTTCATCAACACTCTTGATTA -3'

Fig. 2B

```

metdtlllwllwvpgstgsvtqpdarvtvsegasqlrcckysysgtpylfwygyprqglqlllkyyS
< Péptido señal >< TCR V $\alpha$ 
gdpvvgvngfaefsksnssfhlrkasvhwdsavfvcvlsedsnyqlwgsqtkllkpdtsgggsgg
TCR V $\alpha$  >< CONECTOR
ggsgggsgggssnskvigtprylvkgggqkakraclpekghpvvfwyqgnknefkflnfnqevlq
CONECTOR >< TCR V $\beta$ 
qidmtekrfaecpnsncsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR V $\beta$  >< TCR C $\beta$ 
fepseaeishtqkatlvolatgfpdhvelswvwngkevhsqvstpplkeqpalndsryclsrlrvsa
TCR C $\beta$ 
tfwqprnhfrcgyqfyqlsendewtqdrakpvtqivsaeawgradvnnwvnsldkkiodliqsmhida
TCR C $\beta$  > < IL-15
tlytesdvbpsckvtamkcflllelqlvislesgdasihdtvenliilannslsngnvtsgckeceeleek
IL-15

nikeflqsfvhivqmfiints
IL-15 >

```

Fig. 2C

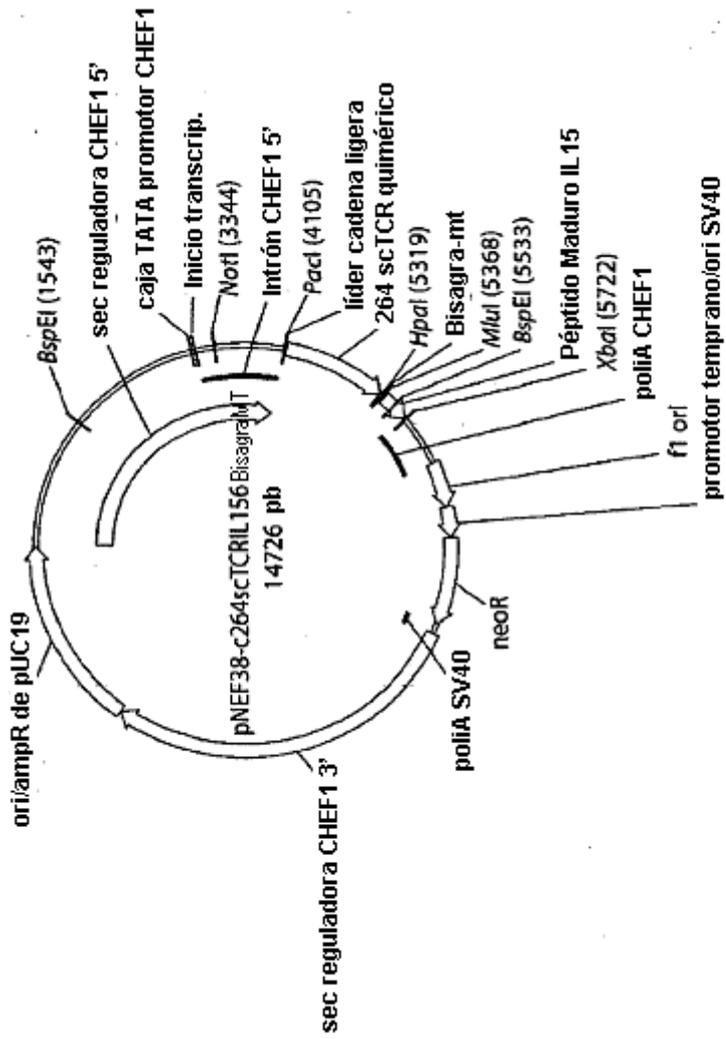


Fig. 3A



```

metdtlllwwpvgstgqsvtqpdarvtvsegaslqrcckysygtpylfwyvqprgglqlllkyyys
< Peptido señal >< TCR Vα
-----
gdpvvgvngfeaeefsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqliwsgtkllikpdtsgggsgg
TCR Vα >< CONECTOR
-----
ggsgggsgggsgssnskviqtprylvkgggkkmrcipekghpvvfwyqgnknefkflinfqngelvq
CONECTOR >< TCR Vβ
-----
qidmtekrfsaepcspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
-----
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstppkqpalndsrycissrlrvsa
TCR Cβ
-----
t.fwqprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpytqivseawgradvnepkssdkthtsppsptrnwvni
TCR Cβ > < CONECTOR > <IL-15
-----
sdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvvislesgdaslhdvtenliilannslsn
IL-15
-----
gnvtesgckeceeeleeknikeflqsfvhivqmints
IL-15 >

```

Fig. 3C

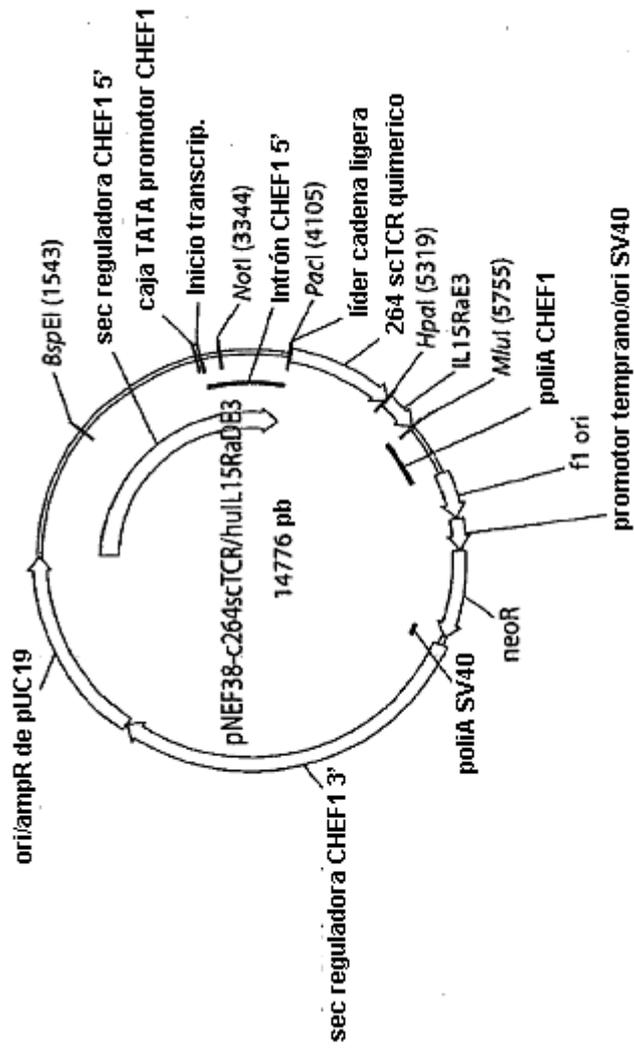


Fig. 4A

5' - ACCACCATGGGACAGACACACTCCTGTTATGGGTAAGTCTGCTCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCCGGTCCAGT  
 CAGTGACCGACCCCGGATGCTCGCGTCACTGTCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTC  
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCCTGGTATGTCAGTACCCCGCGGACGGGGCTGCAGCTGCTCCCTCAAG  
 TACTATTCAAGGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGACTAACTCTT  
 CCTTCCACCTGGGAAAGCCTCTGTGCACCTGGGACCTCTGCTGTGTACTTCTCTGTGTGAGCGGAGGA  
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAATATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT  
 GGCAGCGGGCTGGTGGTCCGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGCGGTCCTCGAGGCAATTCARAAAGTCA  
 TTCAGACTCCAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGCAAAAGCAAAAGCAAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG  
 ACATCCAGTTGTATCTGGTATCAACAARATAGAACAAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACTTTCAGRAT  
 CAAGAAGTTCTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAAAGATTCCTGCTGAGTGTCTCTCAAAACTCACCTT  
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCCCTCTGAGGCGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGTGCCAGACTGTGCAGG  
 GGGCGGCACAGAAATTTCTTTGGTAAAGAACCCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAAACAAGGTGTTT  
 CCACCCGAGGTGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT  
 GCCTGGCCACAGGCTTCTCCCTGACCCAGTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAG  
 TGGGTCAGCACGGACCCGCGAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGC  
 AGCCGCTGAGGCTCTGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCCTTCGGTGCAGTCCCGTGCARGTCCAGTTC  
 ACGGGCTCTCGGAGAAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGCGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGA  
 GGCCTGGGTAGACAGACGTTAATCATCACGTGCCCTCCCGCATGTCCCGTGGAAACAGCAGACATCTGG  
 GTCAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCA  
 CGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCAGCAATGTGCCCACTGGACAAACCCCGAGTCTCA  
 ATGCATTAGACCCGAGCTTCTCTCCAGCTCAAAACAACAGCGGCCACACAGCACTATTTGTCCCG  
 GGTCCCGAGTGCCTTCAAAATCACCTTCCACAGGAACCCACAGATAAGCAGTCAATGATCTCTCC  
 ACGGCACCCCTCTCAGACAACAGCCCAAGACTGGGAATCAGCAGTCCCGCTCCACACAGCCCGCCAGG  
 TGTGTATCCACAGGGCCACAGCGRACCCACTTGATAA - 3'

Fig. 4B

```

metdtlllwllwvpsstgqsvtqpdarvtvsegasqlrckysysgtpylfwyqvprqglqlllkyys
< Péptido señal >< TCR Va
gdpvvgvngfeaeftsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlseedsnyqlwsgtklilkpdtsgggsgg
TCR Va >< Conector
ggsgggsgggssnskviqtprylvkggqgkakmrcipekghpvvfwyqqknnefkflinfqnqevlq
Conector >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqssegdsalylcaaslgggtevfqgktrltvvedlnkvfppevay
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgfpdhvelswvngkevhsqvstppqlkegpaindsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnrnhfrcqvgfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradvnitoppmsvehadiwvksyslys
TCR Cβ > < IL-15RADE3
reryicnsgfkrkqgtssltecvlnkatnvahwtptslkciirpaasspsnntaataaivpqsqmpsk
IL-15RADE3
pstgteissheshgtpsqttaknweiltasahqppgyvppgghsdt
IL-15RADE3 >

```

Fig. 4C

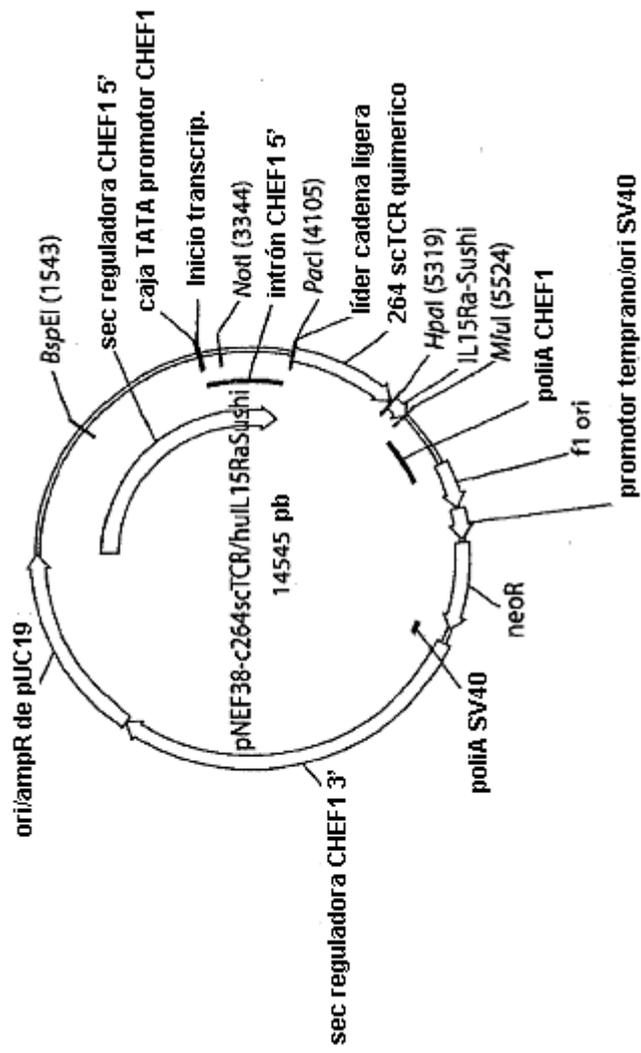


Fig. 5A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACATCCCTGTTAAGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACCCGGTCAGT  
 CAGTACGCCAGCCCGATGCTCGCTCACTGTCTCTGARGGAGCCCTCTGCAAGCTGAGATGCAAGTATTC  
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCCTGGTATGTCAGTACCCCGGGCAGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAG  
 TACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGACTCAGCAAGATAACTCTT  
 CCTCCACCTCCGGAAAGCCCTCTGCTCACTGGAGCCGACTCTGCTCTGACTTCTGTGTTTGGCCGAGGA  
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATATAAGCCAGACACTAGTGGTGGCCGT  
 GGCAGCGCGGTGGTGGTCCCGTGGGCAAGGSCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG  
 TTCAGACTCCAGATATCTGGTGAAGGSCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG  
 ACATCCAGTTCTTTCAGCAATAGACATGACTGAAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT  
 CAGGAGTTCTTTCAGCAATAGACATGACTGAAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT  
 GCAGCTAGAAATTCAGTCCCTCTGAGSCAGGAGACTCAGCACTGTACTCTGTGCCAGCNGTCTGTCAAG  
 GGGCCGACAGAGTTTCTTGGTAAAGGAACCAAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAAGGTGTTC  
 CCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT  
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAAGGAGGTGCACAG  
 TGGGTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGTACTGCCCTGAGC  
 AGCCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCT  
 ACGGCTCTCGGAGANTGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTACGGCCGA  
 GGCTGGGGTAGACGACAGTTAACATCACTGCTCCCTCCCTCCCTGTCGGTGAACACCCAGACATCTGG  
 GTCAAAGACTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTCAAGCCTAAAGCCCGCA  
 CGTCCAGCCTGACGGAGTGGGTGTGAAACAAGGCCACGAAATGTCCGCCACTGGACAAACCCCCAGTCTCA  
 ATGCATTAGA-3'

Fig. 5B

```

metdtlllv11wvpgstgqsvtqpdarvtvsegasqlrcckysysgtpylfwvgyprgglqlllkyyys
< Péptido señal >< TCR Va
-----
gdpvvgvngfaefsknsafhlrkesvhwdsavyfcvlseidnyqlingsgtkliikpdtsgggsgg
TCR Va >< conector
-----
ggsgggsgggssnkvitqprylvkgggqkkmrcipokghpvvfwyqgnknefkflinfqngvlg
conector >< TCR Vb
-----
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfqgktrltvvedlnkvfppevav
TCR Vb >< TCR Cb
-----
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevshgvstpplkeqpalsndryclsrlrvsa
TCR Cb
-----
tfwqnrnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpytqivsaawgradvntcppppmsvehadiwvksyslys
TCR Cb >< IL-15RaSushi
-----
Reryicnsgfkrkagtsstecvlnkatnvahwttpalkcir
IL-15RaSushi >

```

Fig. 5C

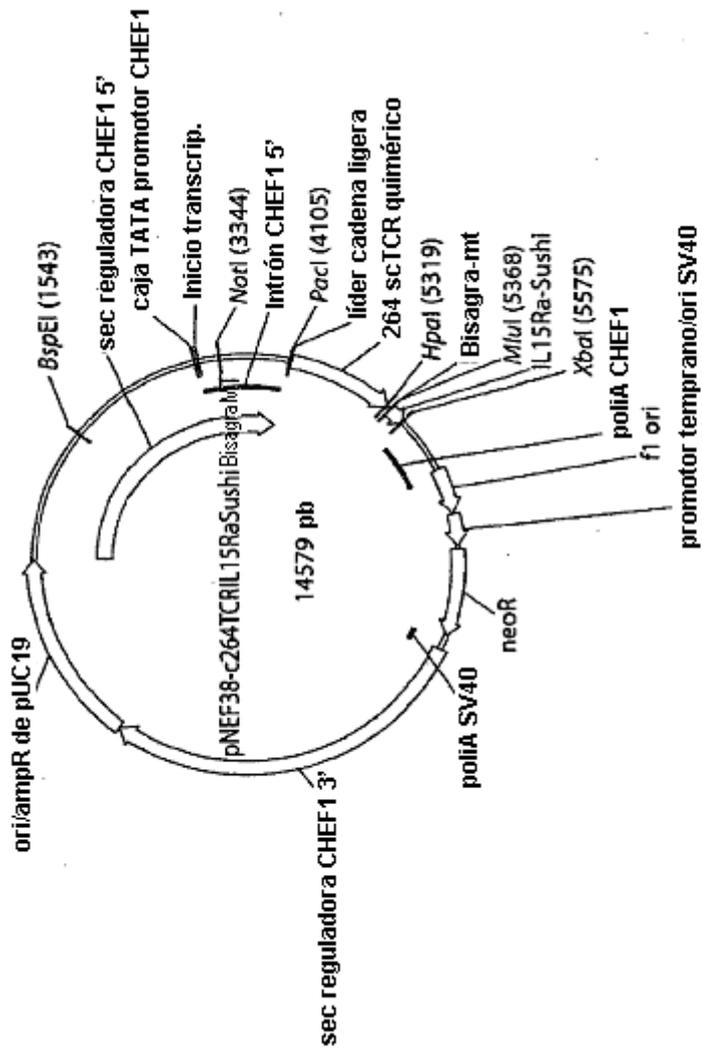


Fig. 6A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAGT  
 CAGTGA CGCAGCCCGATGCTCGGTCACCTGTCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTC  
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCCGCGGACGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAG  
 TACTATTCAGGAGACCCAGTGGTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGFTCAGCAAGAGTAACTCTT  
 CCTTCCACCTGGGAAAGCCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGGAGGA  
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGCTCTGGACCAAGCTAATATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT  
 GGCAGCGCGGTGGTTCGGTGGCGGGCTCTGGCGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGCGGGTCTCGAGCAATTCAAAAGTCA  
 TTCAGACTCCARGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAAGCAAAAGCAAAAGATGAGGTGATCCCTGAAAAGGG  
 ACATCCAGTTGTATCTGGTATCAACAAAATAAGAACAAATGATGATTAATTTTGGATTAACTTTCAGAAAT  
 CAAAGATTTCTTCAGCAAAATGACATGACTGA AAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTT  
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCCTGTACCTCTGTGCCAGCCAGTCTGTCCAGG  
 GGGCGGCACAGAGTTTTCTTTGGTAAAGAACCCAGACTCAGACTGTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTTC  
 CCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT  
 GCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAAGGAGGTGCACAG  
 TGGGTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATCTGCTGAGC  
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGCAAGTCCAGTTCT  
 ACGGGCTCTCGGAGAA TGACGAGTGGACCCAGGRTAGGGCCAAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGA  
 GCGCTGGGGTAGAGCAGCGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACTCTCCACCGTCTCCA  
 ACGGATACACGTGCCCTCCCGCATGTCGTTGGAAACAGGACACTCTGGTCAAGAGCTACAGCTTGT  
 ACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCAGCCCTGACGGAGTG  
 CGTGTGAAACAAGGCCACGAAATGTGCGCCCACTGGACAAACCCCGACTCAAAATGCCATTAGATGATAA -3'

Fig. 6B

```

metdtlllwllwvpgstgqsvtqpdarvtvsegaaqlrckysygtpylfwyvqprgglqlikyys
< Péptido señal > TCR Va
gdpvvgvngfeaeafsksnssfhlrkasvhwsdaavyfcvlsedsnyqliwsgtkliikpdtsgggsgg
TCR Va >< Conector
ggsgggsgggssnsvkviqtprylvkqggkakmrcipekghpvvfwyqqknnefkflinfgnqevlq
Conector >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpnspscslsleiqsseagdsalylcasslsgggevffgktrltvvedlnkvfppevay
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgfpdhvelswvngkevhsgvstppkqpakegpalandryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaawgradvnepkssdkthtspsptritcPPP
TCR Cβ > < Conector > <
msvehadiwksyslysreryicnsgfkrkagtsltecvlnkatnvahwttpsllkcir
IL-15RaSushi >

```

Fig. 6C

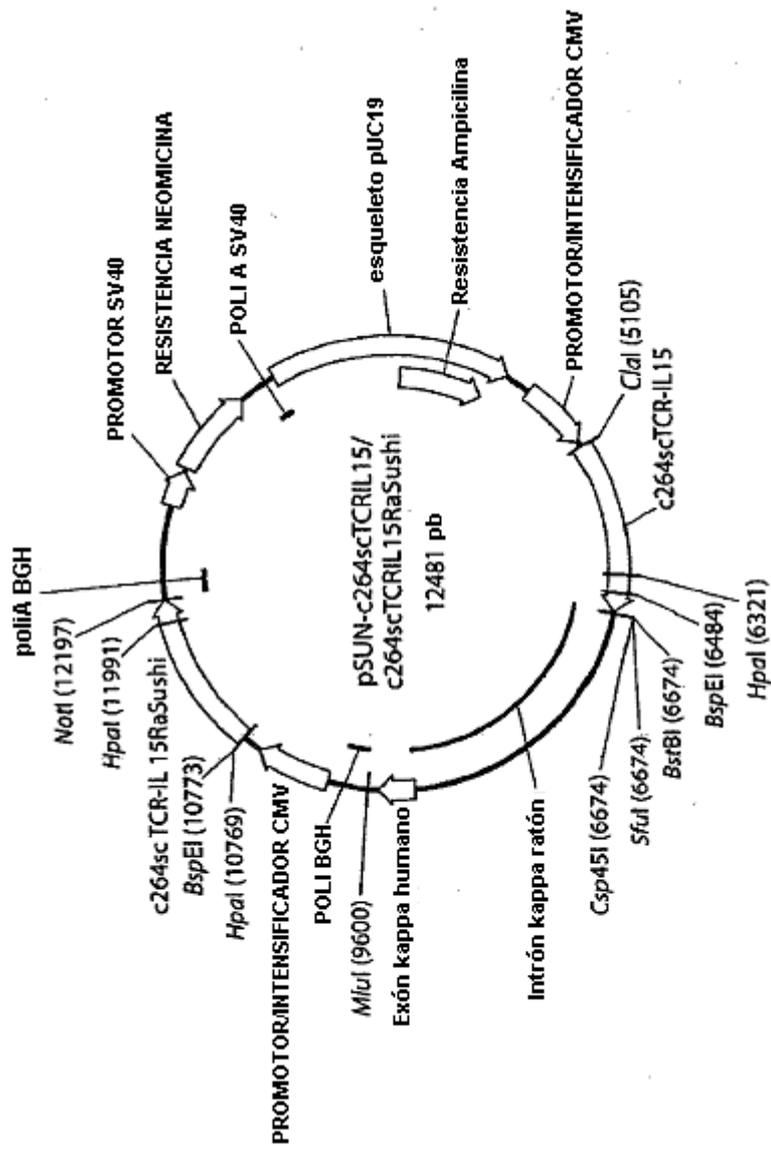


Fig. 7

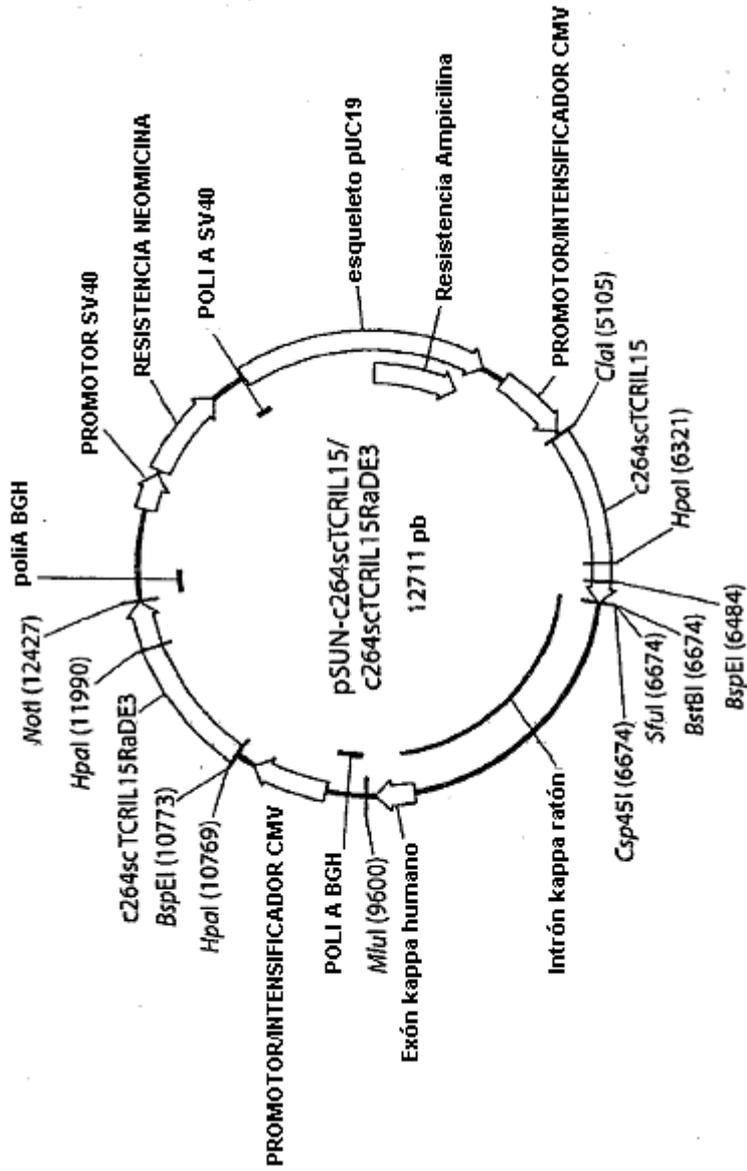


Fig. 8

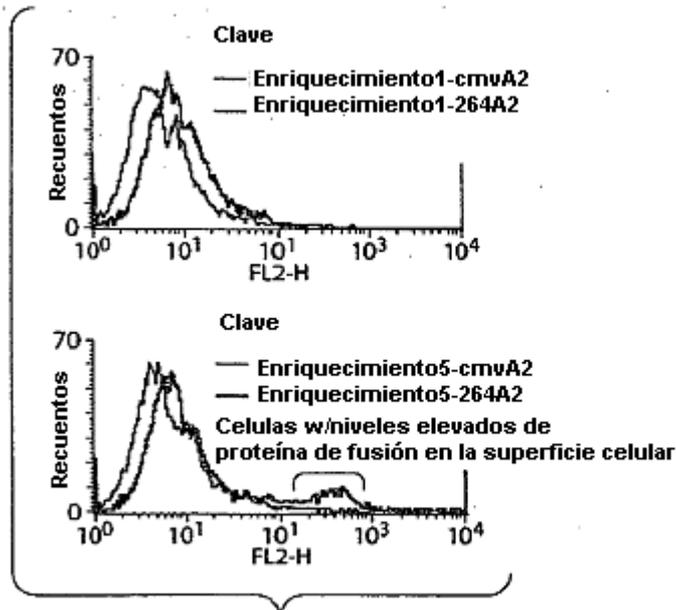


Fig. 9A

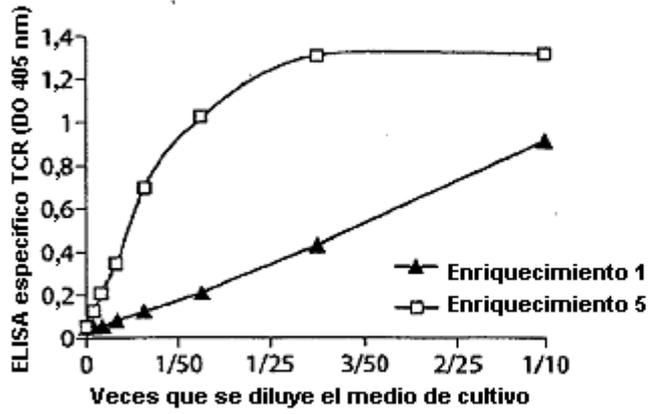


Fig. 9B

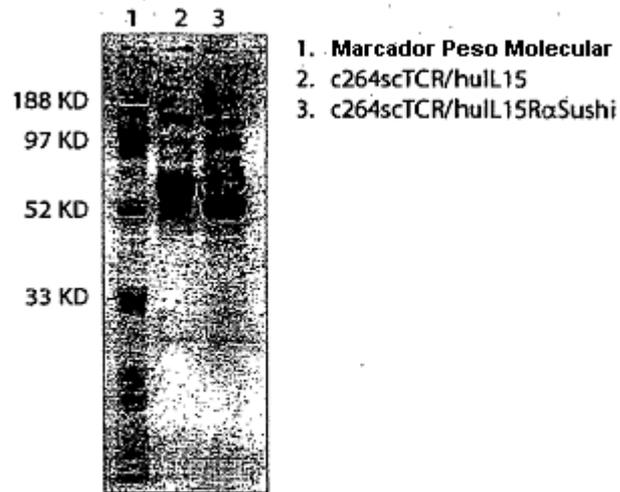


Fig. 10A

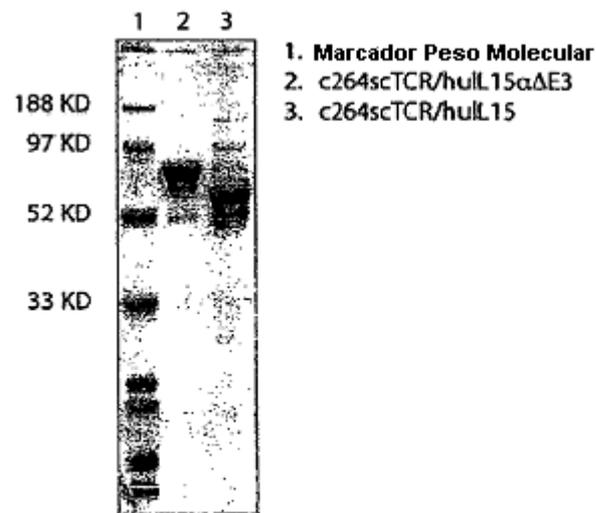


Fig. 10B

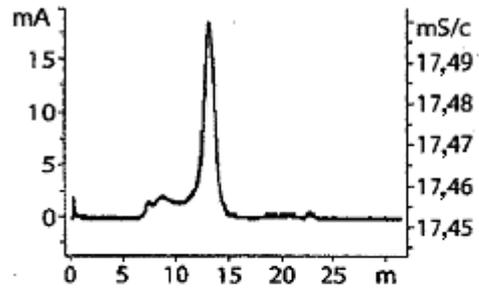


Fig. 11A

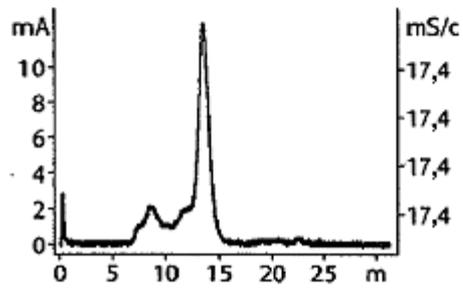


Fig. 11B

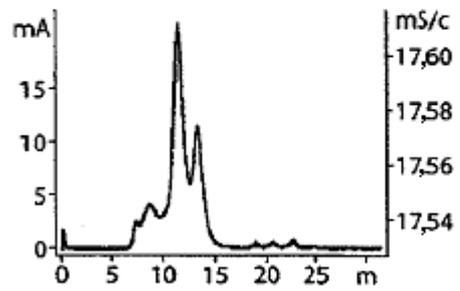


Fig. 11C

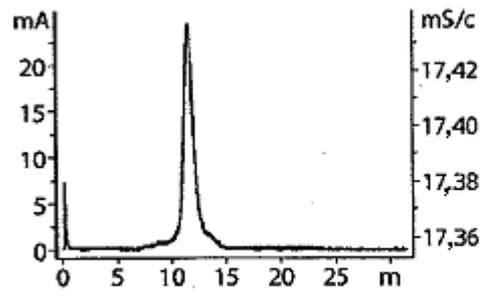


Fig. 12A

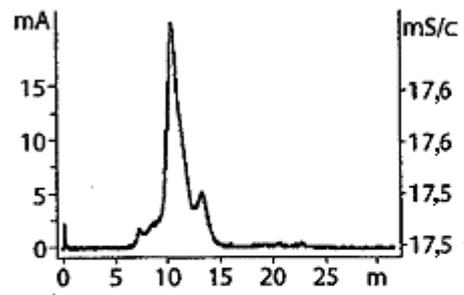


Fig. 12B

Clave

- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15
- T2 cargada péptido p53 teñida w/ c264scTCR/IL15
- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15 + c264scTCR/IL15R $\alpha$ Sushi
- T2 cargada péptido p53 teñida w/ c264scTCR/IL15 + c264scTCR/IL15R $\alpha$ Sushi
- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15R $\alpha$ Sushi
- T2 cargada péptido p54 teñida w/ 264TCR/IL15R $\alpha$ Sushi

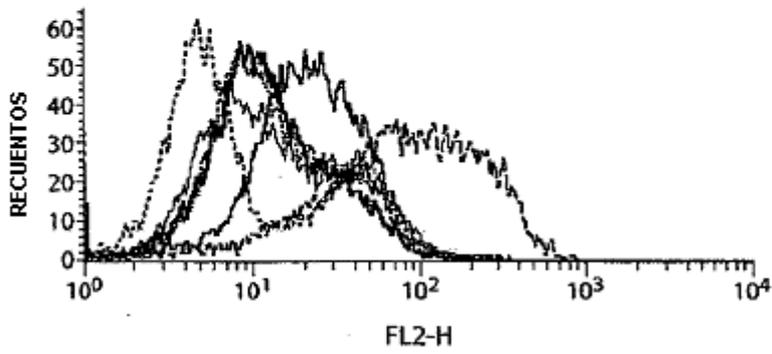


Fig. 13

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASI  
 HDTVENLILANNLSLSSNGNVTESGCKECEBLEEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS

Fig. 14A

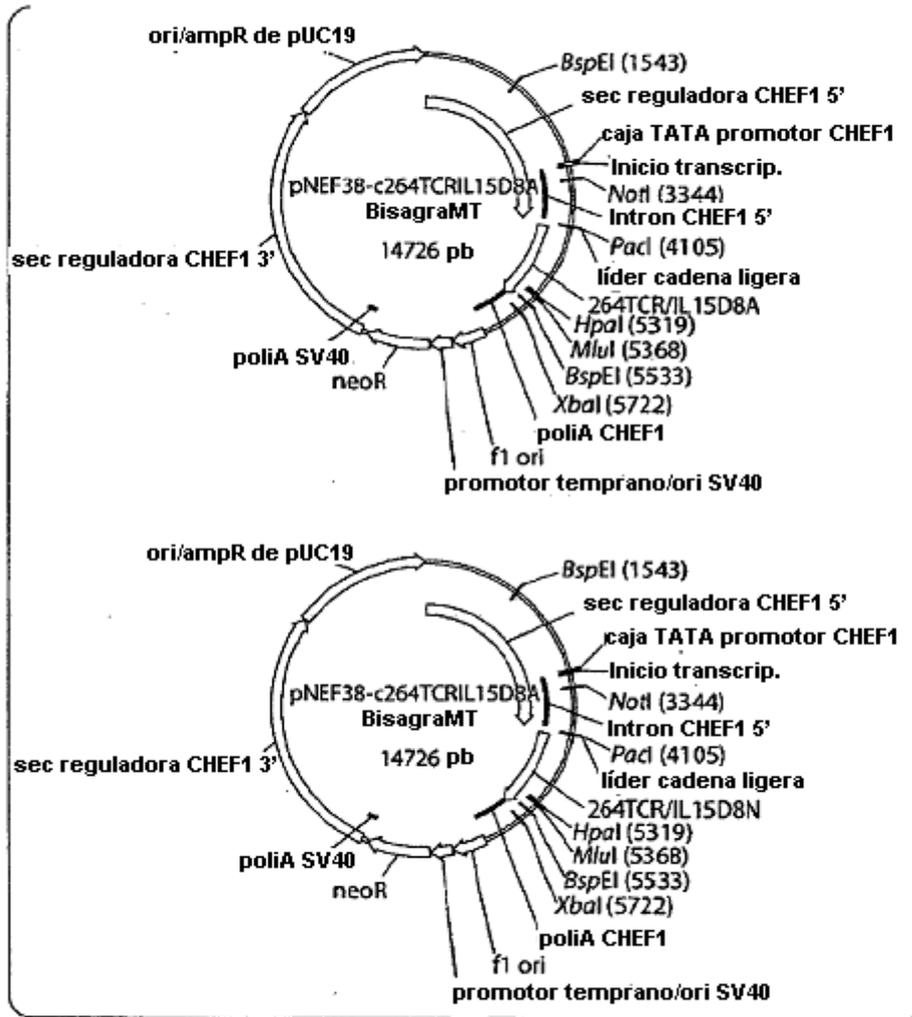


Fig. 14B

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTTC  
 CAGGTTCCACCGGTTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC  
 TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT  
 TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA  
 AGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA  
 GTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG  
 AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT  
 TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACAC TAGTGGTGG  
 CGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGT  
 TCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTAGACTCCAAGATATCTGGTGAAGCGGC  
 AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT  
 ATCTGGTATCAACAAAATAAGAAACAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACCTT  
 CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATPCTCTG  
 CTGAGTGTCCTCAAACCTCACCTTGACGCTAGAAATTCAGTCTCTCGAGGC  
 AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTGAGGGGGCGGCACA  
 GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA  
 AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGGCCATCAGAAGCAGAGATCTC  
 CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC  
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA  
 GCACGGACCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA  
 CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGC  
 AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT  
 GGACCCAGGATAGGGCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG  
 GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT  
 CCACCGTCTCCAACGCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTGCTTTGAAAAAAA  
 TTGAAGATCTTATCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACCGAAAG  
 TGATGTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAG  
 TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG  
 AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC  
 AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA  
 TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTTGCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT  
 AA -3'

Fig. 14C-1

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8H

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTTC  
 CAGGTTCCACCGGTTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC  
 TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT  
 TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA  
 AGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA  
 GTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG  
 AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT  
 TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGG  
 CGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGT  
 TCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC  
 AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT  
 ATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACTTT  
 CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG  
 CTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGC  
 AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTCAGGGGGCGGCACA  
 GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA  
 AGGTGTTCCCAACCGAGGTGCTGTGTTTGGCCATCAGAAGCAGAGATCTC  
 CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC  
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA  
 GCACGGACCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA  
 CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGC  
 AACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT  
 GGACCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG  
 GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT  
 CCACCGTCTCCAACGCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTAAATTTGAAAAAA  
 TTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG  
 TGATGTTACCCCGAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTCTTCTCTTGGAG  
 TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG  
 AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC  
 AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA  
 TTTTTCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT  
 AA -3'

Fig. 14C-2

Proteina c264scTCR-hmt-IL15D8A

metdtlllwvlllwvpgstggsvtqpdarvtvsegaslqrcrkysygtpylfrwyqyprqglqllkyyys  
 < Péptido señal >< TCR Vα

gdpvvgvngfeaeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqliwsgtqliikpdtsgggsgg  
 TCR Vα >< conector

ggsgggsgggssskvigtprylvksggqakarcipekghpvmfyggknnefkflinfqngvlg  
 conector >< TCR Vβ

qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgrltvvedlnkvfppevay  
 TCR Vβ >< TCR Cβ

fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvwngkevshgsvtdpqp.kegpaldndryclssrlrvsa  
 TCR Cβ

tfwqnpnrnhfrcqvfylsendewtdrakpvtqivsaaawgradvnepkssdkthtsppttrnwvvi  
 TCR Cβ >< conector > <

salkkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllqlvislesgdasihdtvenliilannslsn  
 \* IL-15 D8A

gnvtesgkeceeeleeknikeflqsfvhivqmifnts >  
 IL-15 D8A

Fig. 14D-1

Proteína c26-4scTCR-hmt-IL15D8N

```

metdtlllwlwlllwpgstggsvtqpdarvtvsegaelqrcrkysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyys
< Péptido señal : ><
TCR Vα
gdpvvqgvngfeaeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqlwgsqtkllikpdtsgggsggg
TCR Vα
>< conector
ggsgggsgggsgggssnkviqtprylvkqggqkkmrcipekghpvvfwyqqknnefkflinfqngvlg
conector ><
TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnpsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfkgktrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ
>< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdpqplkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwgnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpytqivsaawgradvnepkssdkthtsppsptnrvnvi
TCR Cβ
> < conector > <
sNlkkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcflllelqvlesgdasindtvenliilannslssn
*
IL-15 D8N
gntesgckeceeeleeknikeflqsfvhivqmfints
IL-15 D8N
>

```

Fig. 14D-2

Clave

- CTLL2 teñida w/péptido p53/reactivo HLA-A2 solo
- CTLL2 teñida w/c264scTCR/huL15+péptido p53/HLA-A2
- CTL2 teñida w/c264scTCR/huL15+c264scTCR/huL15R $\alpha$ Sushi + péptido 053/HLA-A2
- CTLL2 teñida w/c264scTCR/huL15R $\alpha$ Sushi + péptido p53/HLA-A2

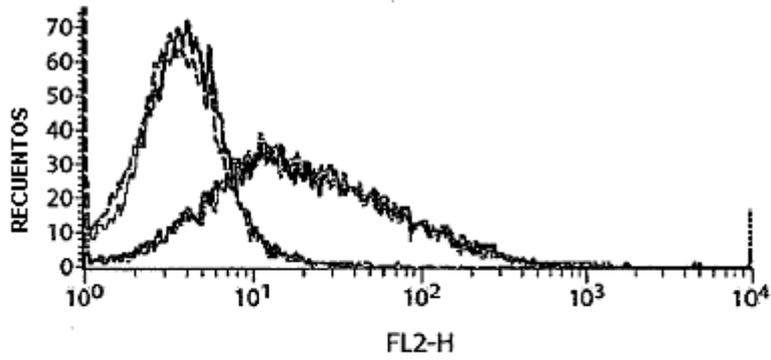
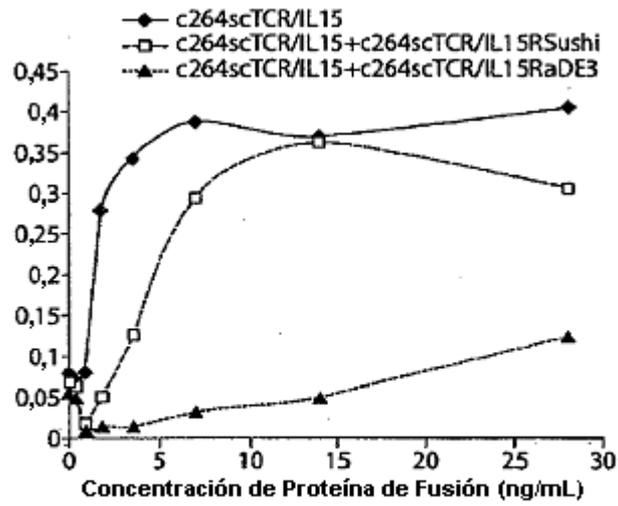


Fig. 15

**Análisis de Proliferación de Células CTLL-2 de Actividad IL15**



**Fig. 16**

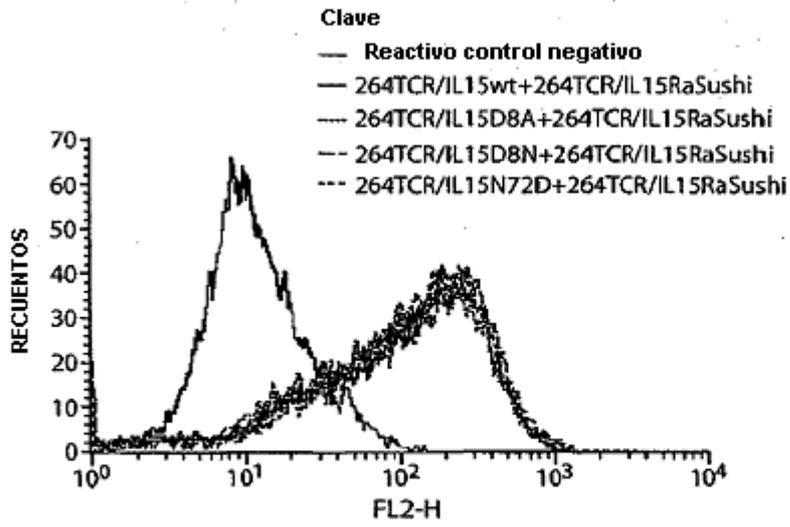


Fig. 17A

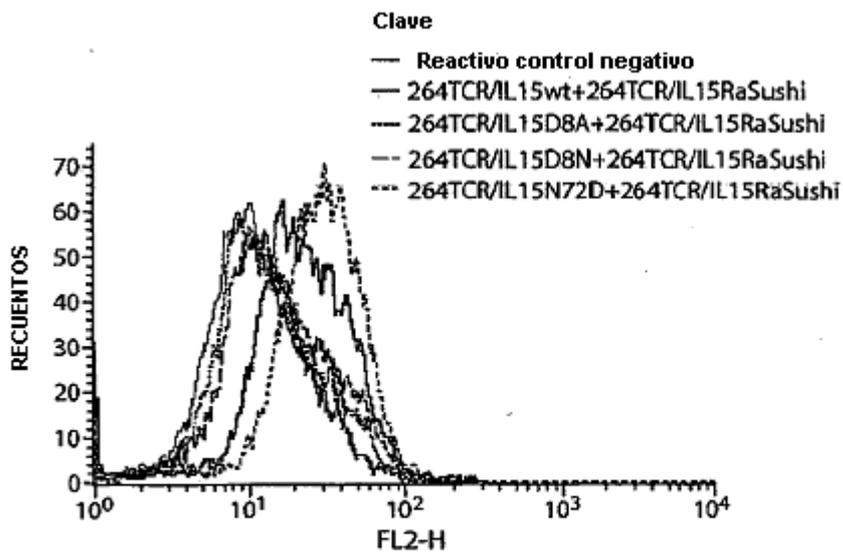


Fig. 17B

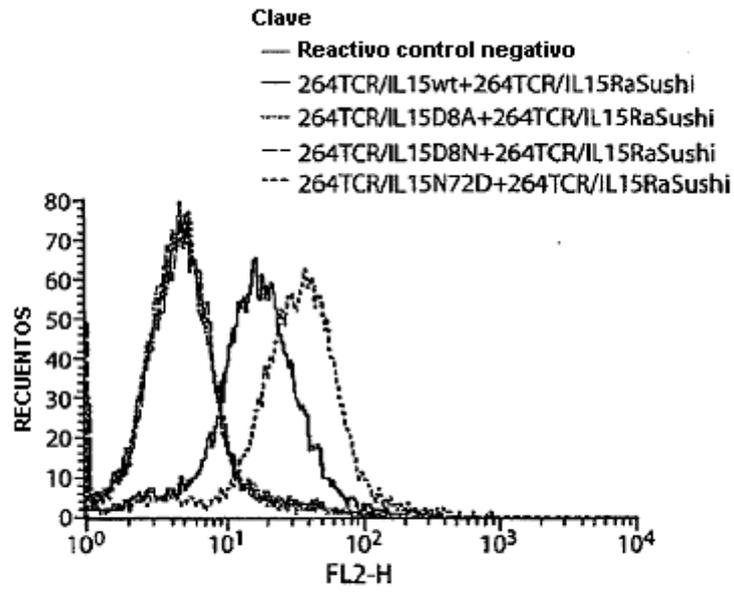


Fig. 17C

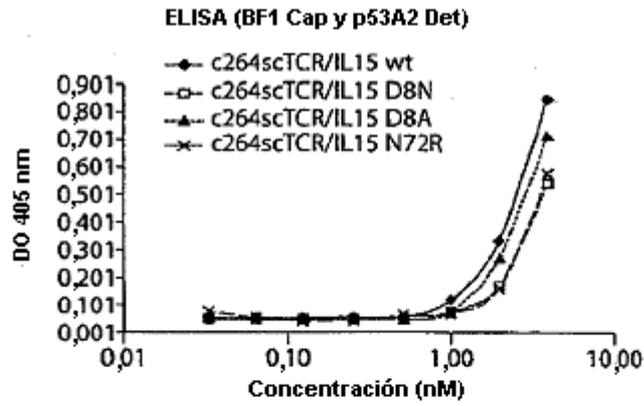


Fig. 18A

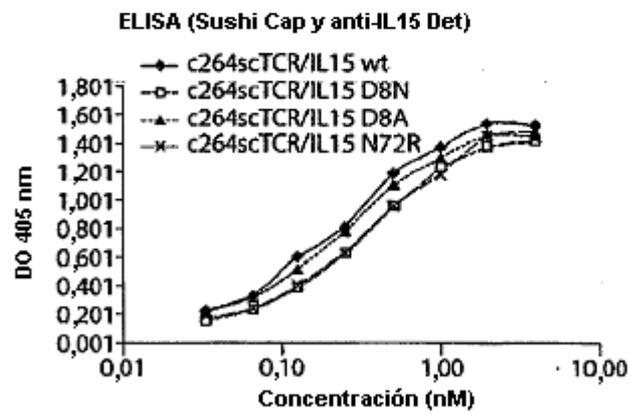
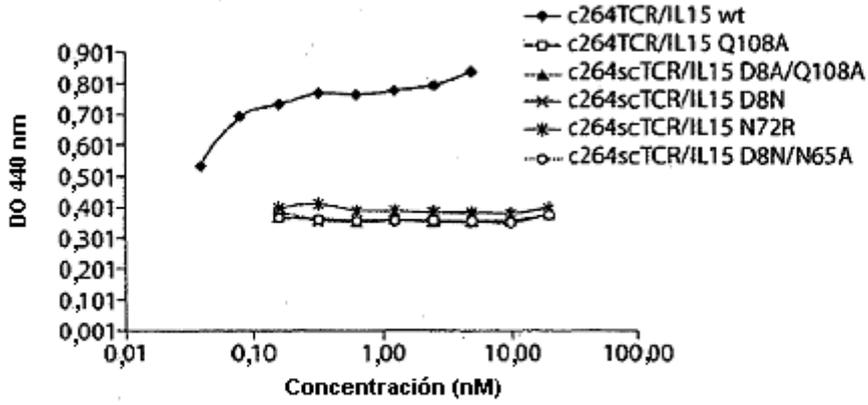


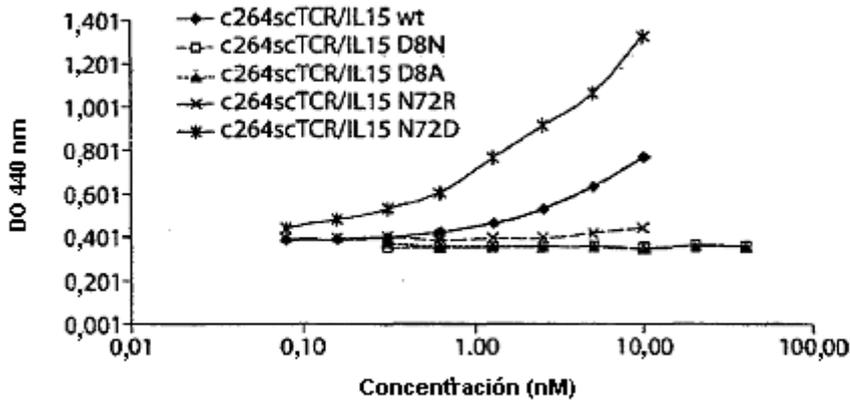
Fig. 18B

**Análisis proliferación células CTLL-2**



**Fig. 19A**

**Análisis proliferación células 32Db**



**Fig. 19B**

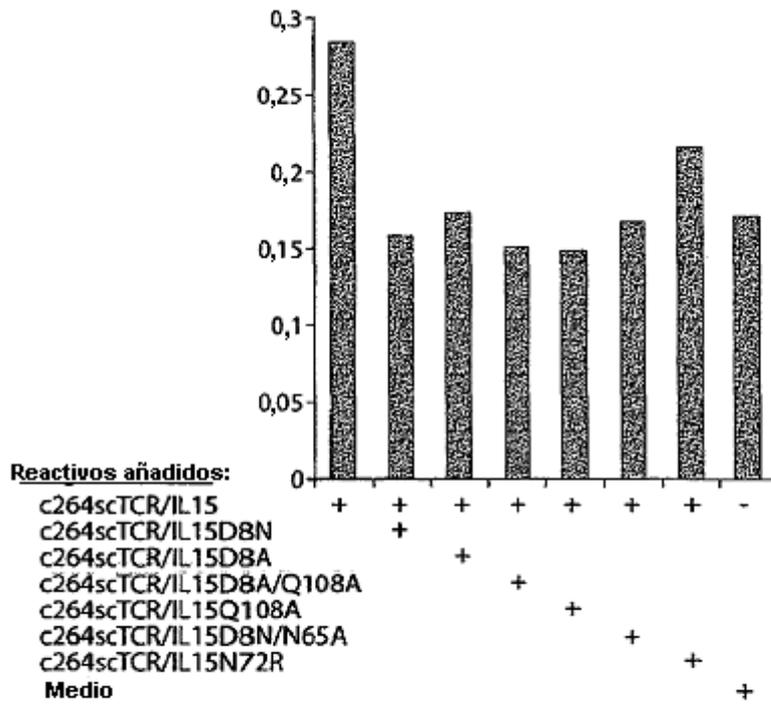


Fig. 19C

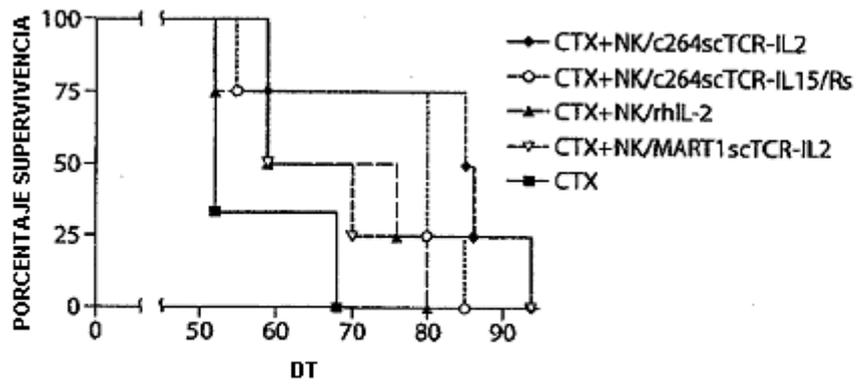


Fig. 20

Tabla 1

Mutantes	Posición	8	61	65	72	108	Unión receptor IL15R $\beta$ γ C	Unión IL15R $\alpha$	Actividad proliferación
	WT aa	D	D	N	N	Q	+	+	+
1	8	N					-	+	-
2	8	A					-	+	-
3	61		A				-	+	-
4	65			D			-	+	-
5	65			A			-	+	-
6	72				D		3+	+	3+
8	72				R		-	+	-
9	108					A	-	+	-
10	8+65	N		A			-	+	-
11	8+108	A				A	-	+	-
12	8+65	S		R			-	+	-

Fig. 21

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFILLELQVISLES GDASIH  
DTVENLIIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMPINTS

Fig. 22A

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAT  
ATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATG  
AAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCAT  
GATACAGTAGAAAACTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTA  
ACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAC TGGAGGAAAAAATATTTAAAGAATTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA

Fig. 22B