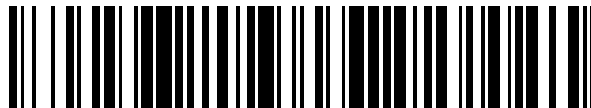


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 375**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2014 PCT/EP2014/063637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2014 E 14735525 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3013356**

54 Título: **Antagonistas de interleucina 15 (IL-15) y usos de los mismos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

27.06.2013 EP 13305896

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

04.02.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITE DE NANTES (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%) y
UNIVERSITÉ D'ANGERS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**JACQUES, YANNICK;
MORTIER, ERWAN;
QUEMENER, AGNÈS y
PLET, ARIANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 698 375 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

Antagonistas de interleucina 15 (IL-15) y usos de los mismos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias

Campo

- 5 La presente invención se refiere a antagonistas de interleucina 15 (IL-15) y a usos de los mismos, en particular para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

Antecedentes

- 10 La IL-15 es un citocina de 14-15 kDa identificada simultáneamente por dos grupos de investigación como factor activador de células T (Grabstein, K. H. et al., Science 1994, 264, 965-968; Burton, I. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4935-4939) y que está implicada en la diferenciación y la proliferación de células NK y T. Unos niveles elevados de expresión de IL-15 han sido asociados a la patogénesis de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la enfermedad de Crohn (Kirman I., Am. J. Gastroenterol. 1996, 91: 1789-1794), la soriasis (Rickert R., J. Immunol., 2000, 165: 2240-2250), las leucemias (Yamada Y., Leukemia and Lymphoma 1999, 35: 37-45) y la artritis reumatoide (AR) (McInnes I. B., Immunology Today 1998, 19: 75-79); el rechazo de injerto (Pavlakakis M., Transplantation 1996, Manfro RC., Transplant Proc. 1997). Por consiguiente, los antagonistas de IL-15 podrían constituir un potencial agente terapéutico para tratar enfermedades inflamatorias, y en la técnica anterior se han descrito varios antagonistas de IL-15. Por ejemplo, Ferrari-Lacraz S. et al. describieron un antagonista de IL-15 que consiste en un mutante de IL-15 fusionado a un dominio Fc de una inmunoglobulina y demostraron que dicho antagonista podría ser útil para el tratamiento de la artritis reumatoide (Ferrari-Lacraz S., Zanelli E., Neuberger M., Donskoy E., Kim Y.S., Zheng X.X., Hancock W.W., Maslinski W., Li X.C., Strom T.B., Moll T. El ataque a células portadoras de receptor de IL-15 con una proteína IL-15/Fc mutante antagonista previene el desarrollo y la progresión de la enfermedad en artritis inducida por colágeno en ratones. J. Immunol. 2004, Nov 1; 173(9): 5818-26). Bernard et al. identificaron en 2004 dos secuencias de la molécula de IL-15 para la unión a IL-15-Ralfa. Dichas secuencias comprenden los aminoácidos 44 a 52 y 64 a 68 en la proteína madura, y también describieron muteínas que podían actuar como agonistas o antagonistas de IL-15 (Bernard I. et al. I Biol Chem 2004, 279: 24313-24322). Además Pedreau H. et al. (Harmonie Pedreau; Ariane Plet; Yannick Jacques; Université de Nantes. Unité de Formation et de Recherche de Médecine et des Techniques Médicales; École doctorale 502 Biologie-Santé (Nantes-Angers). Biologie de l'interleukine-15: de son ADN à ses voies de signalisation. 2010; Thèse de doctorat : Médecine. Biologie, médecine et santé. Immunologie : Nantes : 2010) describieron dos muteínas de IL-15 para la producción en baculovirus.
- 30 Kim et al. demostraron que un polipéptido mutante de IL-15 (IL-15 Q101D/Q108D-Fc) presenta actividad antagonista en un modelo animal DTH (hipersensibilidad de tipo retardado) y por tanto puede ser un candidato para tratar enfermedades inflamatorias/inmunes dependientes de células T (Kim, Yon Su, et al., "Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fcγ2a protein blocks delayed-type hypersensitivity". The Journal of Immunology 160.12 (1998): 5742-5748).

35 Sumario

- La presente invención se refiere a antagonistas de interleucina 15 (IL-15) y a usos de los mismos, en particular para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido mutante de IL-15 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1, donde el residuo de leucina de la posición 45 es sustituido por un residuo de ácido aspártico, el residuo de asparagina de la posición 65 es sustituido por un residuo de lisina y el residuo de leucina de la posición 69 es sustituido por un residuo de arginina. Más particularmente, la presente invención se define en las reivindicaciones.

Descripción detallada

- 45 Los inventores han diseñado una nueva molécula mutante de IL-15 que puede fusionarse a un fragmento de Fc. Las mutaciones están localizadas en la interfaz de la IL-15 que interactúa con la cadena IL-15Rβ para prevenir la señalización de IL-15 a través de receptores heterodiméricos de IL-15Rβ/γ y los receptores homodiméricos de IL-15Rββ que son receptores putativos para IL-2 e IL-15. Por consiguiente, la estrategia de usar un antagonista de IL-15 que ataca la cadena IL-15Rβ más que la cadena γ habitual, sería por tanto más eficiente ya que el especialista puede anticipar que bloqueando todas las formas posibles de los receptores de IL-15 (IL15Rα/β/γ, IL-15R β/γ e IL-15Rβ/β), la molécula bloquearía más eficientemente la acción de células T CD8 y de células NK.
- 50 La presente descripción se refiere a un polipéptido mutante de IL-15 que tiene una secuencia de aminoácidos como la establecida en la SEQ ID NO:1, en donde el residuo de leucina de la posición 45 es sustituido por residuo de ácido aspártico, el residuo de asparagina de la posición 65 es sustituido por un residuo de lisina y el residuo de leucina de la posición 69 es sustituido por un residuo de arginina.

SEQ ID NO:1: IL-15 (Homo sapiens)

NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI
 SLESGDASIH DTVENLILLA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL
 QSFVHIVQMF INTS

La presente descripción también se refiere a una proteína de fusión que consiste en un polipéptido mutante de IL-15 según la invención fusionado a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL-15 o un mutante de la misma).

5 Tal como se usa en la presente memoria, una “proteína de fusión” comprende la totalidad o una parte (típicamente una parte biológicamente activa) de un polipéptido descrito en la presente memoria ligado operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido diferente del mismo polipéptido descrito en la presente memoria). Dentro de la proteína de fusión, el término “ligado operativamente” pretende indicar que el polipéptido descrito en la presente memoria y el polipéptido heterólogo están fusionados en marco uno al otro. El polipéptido heterólogo puede fusionarse en el extremo N o en el extremo C del polipéptido descrito en la presente memoria. Típicamente, el polipéptido heterólogo es particularmente adecuado para aumentar la vida media en circulación del polipéptido mutante de IL-15 *in vivo*.

15 En una realización particular, la proteína de fusión es una inmunoadhesina. Tal como se usa en la presente memoria, el término “inmunoadhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión del polipéptido mutante de IL-15 descrito en la presente memoria con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la secuencia de dominio constante de inmunoglobulina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (que incluye IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. En algunas realizaciones, la secuencia de inmunoglobulina típicamente, aunque no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las propiedades químicas y biológicas valiosas de los anticuerpos humanos. Puesto que las inmunoadhesinas se pueden preparar a partir de secuencias de proteína humanas con una especificidad deseada ligada a una secuencia de dominio de bisagra y dominio constante (Fc) de inmunoglobulina humana apropiada, la especificidad de unión puede alcanzarse usando componentes enteramente humanos. Dichas inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente, y son seguras para un uso crónico o repetido. El especialista en la técnica puede seleccionar fácilmente el dominio Fc más apropiado (Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2010 May; 10(5): 301-16. doi: 10.1038/nri2761. Revisión). En una realización particular, la región Fc incluye o no mutación que inhibe la fijación de complemento y/o la unión a receptor de Fc (Zheng et al, Transplantation. 2006 Jan 15; 81(1): 109-16).

30 En una realización particular, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En una realización particular, la región Fc es una región Fc variante. En otra realización adicional, la región Fc es una región Fc funcional. Tal como se usa en la presente memoria, el término “región Fc” se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque las fronteras de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se define de tal modo que se extienda desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma.

40 En algunas realizaciones, la porción de adhesión y la porción de secuencia de inmunoglobulina están ligadas mediante un ligando mínimo. Tal como se usa en la presente memoria, el término “ligando” se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une la porción de adhesión con la porción de secuencia de inmunoglobulina. Dicho ligando puede ser útil para prevenir impedimentos estéricos. En algunas realizaciones, el ligando tiene 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30 residuos de aminoácido. Sin embargo, el límite superior no es crítico, aunque se elige por razones de conveniencia relativas, p.ej., a la producción biofarmacéutica de dichos polipéptidos. La secuencia de ligando puede ser una secuencia natural o una secuencia no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el ligando preferiblemente es no inmunogénico en el sujeto al cual se administra la inmunoadhesina. Un grupo útil de secuencias ligando son los ligandos derivados de la región de bisagra de anticuerpos de cadena pesada, como se describe en los documentos WO 96/34103 y WO 94/04678. Otros ejemplos son secuencias de ligando de poli-alanina. Otros ejemplos preferidos adicionales de secuencias ligando son ligandos Gly/Ser de diferente longitud que incluyen (gly4ser)3 (SEQ ID NO:10), (gly4ser)4 (SEQ ID NO:11), (gly4ser) (SEQ ID NO:12), (gly3ser) (SEQ ID NO:13), gly3 (SEQ ID NO:14) y (gly3ser)2 (SEQ ID NO:15).

50 SEQ ID NO:10 (GGGGS GGGGS GGGGS)
 SEQ ID NO:11 (GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS)
 SEQ ID NO: 12 (GGGGS)
 SEQ ID NO:13 (GGS)
 SEQ ID NO:14 (GGG)
 SEQ ID NO:15 (GGGSS GGGSS GGGSS)

55 En una realización particular, la proteína de fusión presenta la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:2: IL-15-IgG1Fc (Murina)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQ
FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA
AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGL
HNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO:3 IL-15-IgG1Fc (Humana)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:4 IL-15-IgG2Fc (Humana)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:7 IL-15- Ligando-IgG1Fc (Murina)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSGGGGSGGGGSGGGSSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPK
VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQ
DWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS
LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSN
WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO:8 IL-15- Ligando - IgG1Fc (Humana)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:9 IL-15- Ligando - IgG2Fc (Human)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLDELQVISLES
GDASIHDTVEKLIIRANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSGGGGSGGGGSGGGGSEVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 Los polipéptidos y las proteínas de fusión descritas en la presente memoria se pueden producir mediante cualquier técnica conocida per se en el campo de la técnica, tal como, aunque sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, tanto sola como en combinación. Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, el especialista en la técnica puede producir rápidamente dichos polipéptidos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando un método en fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los polipéptidos y proteínas de fusión descritos en la presente memoria se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinantes como es bien sabido hoy día en el campo de la técnica. Por ejemplo, dichos fragmentos se pueden obtener como productos de expresión de ADN tras incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedantes eucarióticos o procarióticos adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir del cual se pueden aislar posteriormente usando técnicas bien conocidas.

Los polipéptidos y las proteínas de fusión descritos en la presente memoria se pueden usar en forma aislada (p.ej., purificados) o contenidos en un vector, tal como una membrana o una vesícula de lípido (p.ej., un liposoma).

20 En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos y las proteínas de fusión descritos en la presente memoria puedan modificarse para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de los compuestos terapéuticos se puede usar para reducir la toxicidad, aumentar el tiempo en circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede reducir significativamente mediante combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de eliminación del organismo. Para lograr un efecto dirigido o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos químicos farmacológicos como grupos terminales, como parte de la cadena estructural, o como grupos anexos en la cadena polimérica. Por ejemplo, la pegilación es una estrategia bien establecida y validada para la modificación de un rango de polipéptidos. Los beneficios incluyen entre otros: (a) vidas medias en circulación *in vivo* marcadamente mejoradas debido a que se evita la eliminación renal como resultado de que el polímero aumenta el tamaño aparente de la molécula por encima del límite de filtración glomerular, y/o a que se evitan los mecanismos de eliminación celular; (b) una antigenicidad e inmunogenicidad reducidas de la molécula a la cual se incorpora PEG; (c) una farmacocinética mejorada; (d) una resistencia proteolítica potenciada de la proteína conjugada; y (e) una estabilidad térmica y mecánica del polipéptido PEGilado.

Otro objeto de la descripción se refiere a un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que codifica un polipéptido o una proteína de fusión descritos en la presente memoria.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede ser incluida en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector vírico. Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” indican el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (p.ej., un gen extraño) en una célula hospedante, de tal modo que transforme al hospedante y promueva la expresión (p.ej., la transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Por tanto, otro objetivo de la descripción se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico descrito en la presente memoria.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras administración a un sujeto. Los vectores pueden comprender además uno o varios orígenes de replicación y/o marcadores seleccionables. La región promotora puede ser homóloga o heteróloga con respecto a la secuencia codificadora, y proporcionar una expresión ubicua, constitutiva, regulada y/o específica de tejido, en cualquier célula hospedante apropiada, incluyendo para uso *in vivo*. Los ejemplos de promotores incluyen promotores bacterianos (T7, pTAC, promotor Trp, etc), promotores virales (LTR, TK, CMV-IE, etc.), promotores de gen de mamíferos (albúmina, PGK, etc), y similares. Los ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen vectores retrovíricos, de virus del herpes y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden ser producidos mediante técnicas conocidas en el arte de la técnica, tal como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos colaboradores o virus. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes con defecto de replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Otro objetivo de la presente descripción se refiere a una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada mediante un ácido nucleico y/o vector descrito en la presente memoria. El término “transformación” significa la introducción de un gen “extraño” (es decir, extrínseco o extracelular), una secuencia de ADN o ARN en una célula hospedante, de tal modo que la célula hospedante expresará el gen o la secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducidos. Una célula hospedante que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido “transformada”.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden usar para producir un polipéptido recombinante o una proteína de fusión descritos en la presente memoria en un sistema de expresión adecuado. El término “sistema de expresión” significa una célula hospedante y un vector compatible bajo condiciones adecuadas, p.ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula hospedante.

Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedantes de *E. coli* y vectores de plásmido, células hospedantes de insecto y vectores de Baculovirus, y células hospedantes de mamífero y vectores. Otros ejemplos de células hospedantes incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras de *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas de células de mamífero (p.ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos de células de mamífero primarios o establecidos (p.ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.).

La presente especificación también describe un método para producir una célula hospedante recombinante que expresa un polipéptido o una proteína de fusión descritos en la presente memoria, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como el descrito anteriormente en una célula hospedante competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedante recombinante obtenida, y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan el polipéptido o proteína de fusión descritos en la presente memoria. Dichas células hospedantes recombinantes se pueden usar para la producción de polipéptidos y proteínas de fusión descritos en la presente memoria.

La descripción se refiere además a un método para producir un polipéptido o proteína de fusión descrito en la presente memoria, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedante transformada según la descripción en las condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o proteína de fusión expresados.

En alguna realización, la presente descripción se refiere a un antagonista de IL-15 que consiste en un dímero de la proteína de fusión descrita en la presente memoria. El antagonista de IL-15 descrito en la presente memoria se puede obtener mediante una célula hospedante transformada con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Típicamente, el antagonista de IL-15 descrito en la presente memoria puede ser producido según el protocolo descrito en el EJEMPLO 1.

El polipéptido, proteína de fusión y antagonista descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para fines terapéuticos, que incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

Por consiguiente, la presente especificación describe un método para suprimir la respuesta inmune en un paciente mediante la administración de una dosis de un polipéptido, una proteína de fusión o un antagonista descrito en la presente memoria, y modular con ello respuestas inmunes dependientes de IL-15.

5 Este método se puede usar para tratar un paciente que padece una enfermedad autoinmune, que incluye, aunque sin limitación, las siguientes: (1) una enfermedad reumática tal como la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, el síndrome de Sjogren, escleroderma, enfermedad mixta de tejido conectivo, dermatomiositis, polimiositis, síndrome de Reiter o enfermedad de Behcet; (2) diabetes de tipo II; (3) una enfermedad autoinmune del tiroides, tal como tiroiditis de Hashimoto o enfermedad de Graves; (4) una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple, miastenia gravis, o encefalomiелitis; (5) una variedad de pénfigos, tal como *phemphigus vulgaris*,
10 *phemphigus vegetans*, *phemphigus foliaceus*, síndrome de Seneer-Usher, o pénfigo del Brasil; (6) soriasis; y (7) enfermedad inflamatoria del intestino (p.ej., colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn).

La administración del polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista descritos en la presente memoria también puede ser útil para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA).

15 Otro uso creíble para el polipéptido, la proteína fusión o el antagonista descrito en la presente memoria incluye el tratamiento de leucemia-linfoma de célula T en adultos inducida por HTLV I (virus linfotrófico de célula T humano) de fase tardía. Véase Burton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4935 (1994).

De forma similar, el método se puede usar para tratar un paciente que ha recibido un trasplante de materiales biológicos, tal como un trasplante de órgano, tejido o células. Por ejemplo, el polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista descritos en la presente memoria pueden ser particularmente adecuados para promover la supervivencia de injerto (aloinjerto o xenoinjerto) y para tratar a pacientes de la enfermedad de injerto contra hospedante.
20

Típicamente, el polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista de la presente memoria se administran habitualmente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se pretende indicar una cantidad suficiente de la proteína de fusión o del antagonista descritos en la presente memoria para tratar y/o prevenir la enfermedad con una ratio razonable de beneficios/riesgos aplicable a cualquier tratamiento médico. Se debe entender que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente descripción será decidido por el médico responsable aplicando la sensatez del juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente efectiva para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la enfermedad que va a ser tratada y la gravedad de la enfermedad; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo y dieta del paciente; el momento de la administración, la ruta de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; de fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, los especialistas en la técnica saben que se debe empezar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado, e ir incrementando gradualmente la dosis hasta obtener el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos se puede variar en un amplio rango desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto y día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que va a ser tratado. Un medicamento contiene típicamente entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente entre 1 mg y aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad efectiva del fármaco es suministrada de forma ordinaria a un nivel de dosis de entre 0,0002 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal y día, especialmente entre aproximadamente 0,001 mg/kg y 7 mg/kg de peso corporal y día.
25
30
35
40

Un objetivo adicional de la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido, una proteína de fusión o un antagonista descritos en la presente memoria.

45 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo, que sea sólido, semi-sólido o líquido no tóxico.

El polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista descritos en la presente memoria se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.
50

En las composiciones farmacéuticas para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de ruta oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica,
55

intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

5 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstos pueden ser en particular disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, cálcico o magnésico, y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente secadas por congelación, que al añadirlas, dependiendo del caso, agua esterilizada o salino fisiológico, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones estériles acuosas; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilen glicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto en que se pueda manejar de forma adecuada con una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 Las disoluciones que comprenden los compuestos descritos en la presente memoria en forma de base libre o como sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, dichas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 El polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista descritos en la presente memoria se pueden formular en una composición en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como el acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilos libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

30 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los ingredientes adicionales enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los ingredientes adicionales requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y de secado por congelación, que dan lugar a un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

45 Tras formulación, las disoluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosis y en cantidad tal que sean terapéuticamente efectivas. Las formulaciones son administradas fácilmente en una variedad de formas de dosis, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

50 Para administración parenteral en disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería tamponarse de forma adecuada si es necesario y el diluyente líquido primero debería hacerse isotónico con salino o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán bien conocidos por los especialistas en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis podría disolverse en 1 mL de disolución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 mL de fluido hipodermoclisis o inyectarse en sitio propuesto de infusión. Necesariamente se producirán algunas variaciones en la dosis dependiendo de la condición del sujeto en tratamiento. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto concreto.

55 El polipéptido, la proteína de fusión o el antagonista descritos en la presente memoria pueden formularse en una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a

0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o así. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos descritos en la presente memoria formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p.ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

La descripción se ilustrará adicionalmente a través de las siguientes figuras y ejemplos. No obstante, dichos ejemplos y figuras no deberían interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente descripción.

FIGURAS:

Figura 1. IL-15AN-Fc inhibió el desarrollo de CIA. Ratones DBA/1 imprimados con colágeno fueron divididos aleatoriamente en grupos de 10, expuestos el día 21, e inyectados i.p. 14 veces de forma diaria con 1,5 µg de IL-15AN-Fc (■) o con IgG2A de ratón de control (●) comenzando en el día 22. Los ratones fueron monitorizados cada dos o tres días en términos de peso corporal y progresión de la enfermedad, que se cuantificó como peso corporal (A), número medio de zarpas artríticas (B), grosor de zarpa medio (C) y puntuación clínica media (D). Los valores son la media ± SEM. En A, la línea vertical indica el día de la exposición. En C, se presentó la curva de grosor de zarpa medio de 5 ratones sanos (Δ). **P<0,01 frente a sanos, n° P<0,05 frente a IgG2a de ratón, test de comparación múltiple de Newman Keuls.

Figura 2. El tratamiento con IL-15AN-Fc no modificó células T CD8+ y NK esplénicas. Se tiñeron los linfocitos esplénicos aislados de ratones usando mAb CD3w anti-ratón conjugados a FITC, mAb NKp46 anti-ratón conjugado a APC, mAb CD11b anti-ratón conjugado a FITC y CD27 anti-ratón conjugado a picroeritina(PE) (BD Pharmigen), o mAb CD3e anti-ratón conjugado a FITC, mAb CD8 anti-ratón conjugado a APC, mAb CD122 anti-ratón conjugado a PE y mAb CD44 anti-ratón conjugado a FITC, y a continuación se analizó usando citometría de flujo.

Figura 3. IL-15AN-Fc es efectivo para prevenir la progresión de enfermedad en ratones con artritis establecida. Tras una inmunización intradérmica y exposición i.p. con CII, los ratones fueron monitorizados diariamente en términos de desarrollo de artritis. El tratamiento con IL-15AN-Fc (■) o IgG2a de control (●) (1,5 µg/ratón·día) se inició tan pronto como se obtuvo una puntuación de al menos 1 en animales individuales. El tratamiento se continuó durante 14 días. Los ratones fueron monitorizados cada día en términos de peso corporal y progresión de la enfermedad, que se cuantificó como peso corporal (A), número medio de zarpas artríticas (B), grosor de zarpa medio (C) y puntuación clínica media (D). Los valores son la media ± SEM. En A, la línea vertical indica el día de la exposición. En C, se presentó la curva de grosor de zarpa medio de 3 ratones sanos (Δ). En B, C y D, ***P<0,001 para IL-15AN-Fc frente a IgG2a, test de Mann-Whitney.

Figura 4: farmacocinética de IL-15AN-Fc. Ratones C57BL/6 machos recibieron una inyección intravenosa de 10 mg de IL-15AN-Fc, se tomaron muestras de sangre y se midió la concentración de IL-15AN-Fc cada 2 horas (n=3).

Figura 5: Efecto de IL-15AN-Fc en la homeostasis de células NK y T. Análisis de citometría de flujo de poblaciones en bazo de (a) CD3⁺CD8⁺T y (B) CD3⁺NK1.1⁺. Se usó el test de *t* de Student para comparar entre condiciones; ns: no significativo.

EJEMPLO 1:

Material y métodos:

Expresión y purificación de proteína de fusión IL-15AN-Fc

Se diseñó el antagonista de IL-15 para mantener las dos mutaciones puntuales antagonísticas N65K y L69R, generadas con el kit de mutagénesis sito-dirigida Quick change (Stratagene, La Jolla, EE.UU.), para suprimir la unión a IL-15 a la subunidad β del receptor. Para aumentar la expresión de IL-15, se mutó con PCR una cadena rica en AT presente en el extremo 3' de la secuencia codificadora sin cambio de aminoácido, usando los oligos 5'-fosforilados: oligo antisentido 5'-CTCCTTGATGTTCTTCTCCTCCAGTTCCTCAC-3' (SEQ ID NO:5) y oligo sentido 5'-TTCCTGCAGAGCTTCGTACATATTGTCCAAATGTTTCATC-3' (SEQ ID NO:6). Para aumentar la solubilidad de la IL-15 sin cambiar de forma notable la actividad biológica de la IL-15, se cambió mediante PCR la leucina 45 a ácido aspártico. Además, el mutante triple de antagonista de IL-15 se fusionó a una región Fc de IgG2a diseñada de ratón, mutada en los aminoácidos críticos para la unión a FcγRs y C1q, y la expresión dirigida por péptido señal de IL-2 (pFuse-mIgG2Aa1-Fc2, Invivogen, San Diego). El fragmento de ADN de IL-15 se ligó entre los sitios de EcoRI y NcoI del plásmido pFuse, creando un ligando de péptido AMVRS entre los dos dominios. La casete de expresión resultante fue extraída mediante PCR y ligada adicionalmente en plásmido de expresión lentiviral pLV-EF1-MCS por debajo del promotor EF1α humano mediante ligación roma. Se produjeron vectores derivados de virus por parte de Vectalys (Labège, Francia) y se usaron para transducir células CHO-S, cultivadas adicionalmente en medio CD-CHO que contenía 10 mL/L de suplemento HT. El antagonista de IL-15 fue recolectado del sobrenadante de cultivos de 5 días de células CHO-S recombinantes, se purificó por afinidad en una columna de proteína A sepharose con GTP Technology (Labège, Francia), y se filtró en gel en un Superdex G200.

Inducción del modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA) de tipo II (CII)

En todos los experimentos se usaron ratones DBA/1 machos (Janvier®) de 6-8 semanas de edad. Se disolvió CII procedente de cartílago traqueal bovino (Sigma C1188) en ácido acético 0,1M a una concentración de 2 mg/mL a 4°C durante una noche. A continuación la disolución de CII se emulsionó usando un homogeneizador con una pala pequeña con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco 231131) como se ha descrito previamente (Ruchatz, The Journal of Immunology, 1998, 160: 5654-5660). Para inducir CIA, se inyectaron 200 µg de CII intradérmicamente en la base de la cola de ratones DBA/1. Veintiún días después de la inmunización, los animales fueron expuestos a 200 µg de CII i.p. en ácido acético 0,05 M.

Tratamiento de los animales

Tras la inmunización y posterior exposición a CII, comenzando en el día 22, los animales fueron divididos en dos grupos: cada grupo recibió una inyección i.p. diaria con una concentración de 1,5 µg/inyección·día durante 2 semanas de IgG2a (eBioscience 14-4724) o de proteína de fusión IL-15AN-Fc. Los ratones fueron evaluados todos los días para determinar signos de artritis en base a los siguientes criterios: grado 0, articulaciones normales y sin hinchamiento; grado 1, hinchamiento ligero y/o eritema; grado 2, edema pronunciado o rojez en la zarpa o en varios dedos; y grado 3, hinchamiento grave de toda la zarpa y/o anquilosis. Como se puntuó individualmente cada miembro, la puntuación clínica máxima por cada ratón era de 12.

Tratamiento de animales con artritis establecida

Ratones DBA/1 fueron inmunizados y expuestos a CII como se ha descrito anteriormente, y fueron monitorizados a diario para determinar signos de artritis en base a los siguientes criterios: grado 0, articulaciones normales y sin hinchamiento; grado 1, hinchamiento ligero y/o eritema; grado 2, edema pronunciado o rojez en la zarpa o en varios dedos; grado 3, hinchamiento grave de toda la zarpa; y grado 4, anquilosis. Cuando los animales desarrollaron artritis evidente con una puntuación clínica mínima de 1, fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento y se les administró IgG2a o proteína de fusión IL-15AN-Fc (1,5 µg/inyección·día) durante 14 días consecutivos. En el análisis solo se incluyeron los animales que desarrollaron artritis.

Análisis de citometría de flujo de células NK y CD8+ in vivo

Se determinaron células NK y T CD8+ de bazo usando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) 1h después de la última inyección i.p. de IL-15AN-Fc o IgG2A (día 35). Los esplenocitos de ratón fueron incubados con cantidades saturantes (1 µg/10⁶ células) de mAb CD3e anti-ratón conjugado a FITC, mAb NKp46 anti-ratón conjugado a APC, mAb CD11b anti-ratón conjugado a FITC y CD27 anti-ratón conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen), o mAb CD3e anti-ratón conjugado a FITC, mAb CD8 anti-ratón conjugado a APC, mAb CD122 anti-ratón conjugado a PE y mAb CD44 anti-ratón conjugado a FITC. Los datos fueron procesados usando el software FlowJo (BD Biosciences).

Histología

Las zarpas fueron seccionadas post-mortem, fijadas en paraformaldehído al 1% durante 3 días, y descalcificadas en EDTA al 5% durante 2 semanas antes de ser embebidas en parafina para disección. Se prepararon secciones sagitales en serie, se montaron sobre portas de vidrio y se tiñeron con H&E. Las secciones de tejido fueron analizadas mediante microscopio de luz.

Resultados**Generación de IL-15AN-Fc**

Para obtener un antagonista de IL-15 específico para estudios preclínicos, la secuencia correspondiente a IL15 humana fue clonada en un vector de expresión (GTP Technology, Labège, Francia) y expresada en células CHO-S, tras ser mutada, optimizada y ligada a una región Fc de IgG2a modificada de ratón. La proteína IgG2a-antagonista de IL-15 fue extraída y purificada mediante cromatografía de afinidad de proteína A sepharose. Su análisis mostró una proteína con una pureza del 97% que eluyó en una columna de filtración de gel como un único pico homogéneo con un peso aparente de 260 kDa. Este tamaño mayor de lo esperado puede deberse a un comportamiento atípico de la proteína glicosilada o a la presencia de dímeros de Fc-dímeros. La actividad antagonista *in vitro* de la proteína purificada en un ensayo de proliferación de CTLL2, inducida con IL-15 10 pM, demostró la inhibición total con una concentración máxima de la mitad (IC₅₀) de 2,5 nM (no mostrado).

El tratamiento con IL-15AN-Fc disminuyó la gravedad de CIA

Los ratones inyectados intradérmicamente con colágeno de tipo II en adyuvante completo de Freund desarrollaron artritis severa cuando se expusieron i.p. 21 días después con colágeno. Las articulaciones afectadas exhibieron hinchamiento prominente y edema, eventualmente dando lugar a una movilidad restringida y a anquilosis. La incidencia de la enfermedad vino acompañada de una pérdida de peso corporal que comenzó justo después de la exposición a colágeno, y continuó durante aproximadamente 2 semanas, tras lo cual el peso corporal de los ratones se elevó (Fig.

1A y Fig. 3A). La gravedad del desarrollo de la enfermedad se vio reducida marcadamente en los ratones que recibieron diariamente inyecciones i.p. de 1,5 μ de IL-15AN-Fc comenzando el día después de la exposición a colágeno, en comparación con los controles que recibieron IgG2a. El efecto de IL-15AN-Fc fue particularmente obvio en el espesor medio de zarpa (Fig. 1C), pero también fue visible, aunque no significativo, en la puntuación clínica media (Fig. 1D). Dos semanas de tratamiento diario con IL-15AN-Fc no afectaron a los porcentajes de células NKp46+ CD3- CD11b+ CD27- totales y maduras, así como a las células CD8+ totales y las células CD8+CD44+CD122+ de memoria en los bazo de los ratones (Fig. 2).

Efecto terapéutico del tratamiento de IL-15AN-Fc sobre CIA en curso

Para determinar la eficacia de IL-15AN-Fc sobre la progresión de la enfermedad en ratones con artritis ya establecida, el tratamiento de los animales inmunizados fue iniciado solo cuando los ratones desarrollaron artritis evidente con una puntuación clínica media de al menos 1 (puntuación clínica media, $1,2 \pm 0,4$ y $2,0 \pm 0,9$, respectivamente para los grupos de IL-15AN-Fc e IgG2a), y los ratones recibieron entonces IgG2a o IL-15AN-Fc (1,5 μ g/día) i.p. durante 14 días. Tal como se muestra en la Fig. 3C y D, el tratamiento con IgG2a de control no afectó a la progresión de la artritis. Por el contrario, el tratamiento con IL-15AN-Fc limitó la progresión de la enfermedad durante el transcurso del tratamiento y posteriormente (no mostrado). Este efecto terapéutico fue altamente significativo (test de Mann Whitney, $p < 0,001$).

EJEMPLO 2:

Material y métodos:

Ratón:

Se usaron ratones C57BL/6 (JANVIER LABS) de 8 semanas.

Farmacocinética de IL-15AN-Fc in vivo:

Se evaluó la vida media de IL-15AN-Fc en ratones C57BL/6 macho después de una única inyección intravenosa de 10 mg de IL-15AN-Fc. En cada punto temporal, se tomaron muestras de sangre (tres ratones/punto), se centrifugó y se almacenó el plasma a -20°C . Se determinó la concentración de IL-15AN-Fc mediante ELISA. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando un modelo de un compartimento: Ae^{-Bx} , A es la concentración inicial de IL-15AN-Fc (10 μ g) y B se determinó con el software GraphPad Prism. La vida media $T_{1/2} = \ln(2)/B$.

Ensayo ELISA:

Para determinar la cantidad de IL-15AN-Fc en el plasma. Como molécula de captura se usó un Fc-IL-15R α (R&D system) a la concentración de 1,25 μ g/mL. La placa se saturó con PBS-Tween 5% en leche durante 1h. Después de lavar, se añadió suero durante 2h a temperatura ambiente. Se añadió durante 1h IgG (H+L) anti-ratón de cabra HRP diluida a 250 ng/mL (INTERCHIM) dirigida contra el Fc. Tras lavar, finalmente se añadió disolución de sustrato TMB (INTERCHUM) y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría (450 nm). En paralelo se realizó un rango estándar con IL-15AN-Fc.

Efecto de IL-15AN-Fc sobre la homeostasis de células NK y T:

Para determinar si IL-15AN-Fc tiene un efecto sobre el desarrollo de células NK y T en el estado estacionario, se inyectó a tres grupos (3 ratones/grupo) de ratones C57BL/6 machos intraperitonealmente con diferentes dosis de IL-15AN-Fc (1,5, 5 y 25 μ g), una vez al día y fueron sacrificados en el día 5. Se extrajeron los bazo y se determinaron las poblaciones de células NK (CD3 anti-ratón de hámster FITC de BD Biosciences y NK1.1 anti-ratón APC de e-Bioscience) y células T CD8+ (CD3 anti-ratón de hámster FITC de BD Biosciences y CD8 α anti-ratón APC de e-Bioscience) mediante citometría de flujo CALIBUR y los datos se analizaron mediante el software FlowJo.

Resultados:

IL-15AN-Fc tiene una vida media de aproximadamente 12 horas *in vivo* (Figura 4). Su inyección durante cuatro días a diferente concentración no tuvo efecto sobre la homeostasis de células NK y T CD8+ de ratón (Figura 5).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- 5 <120> Antagonistas de interleucina 15 (IL-15) y usos de los mismos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias
- <130> BIO12129 JACQUES / MC
- <160> 15
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 114
- 15 <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 | Asx | 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 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 698 375 T3

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 Asp 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			
Lys Leu Ile Ile Arg Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val 65 70 75 80			
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile 85 90 95			
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn 100 105 110			
Thr Ser Ser Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser 115 120 125			
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr 130 135 140			
Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp 145 150 155 160			
Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr 165 170 175			
Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser 180 185 190			
Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 195 200 205			
Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys 210 215 220			
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr 225 230 235 240			
Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr 245 250 255			

ES 2 698 375 T3

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
 260 265 270

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
 275 280 285

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
 290 295 300

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 305 310 315 320

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 325 330 335

Lys

<210> 3

<211> 341

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IL-15-IgG1Fc (Humano)

<400> 3

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 Asp 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

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

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

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

Thr Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

ES 2 698 375 T3

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

ES 2 698 375 T3

225		230		235		240									
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
				245					250					255	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
			260					265					270		
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu
		275					280					285			
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
	290					295						300			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
305					310					315					320
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				325					330					335	

Lys

<210> 5
 <211> 32
 5 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 10

<400> 5
 ctcttgatg ttcttctct ccagttctc ac 32

<210> 6
 <211> 39
 15 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> TTCCTGCAGAGCTTCGTACATATTGTCCAAATGTCATC

<400> 6
 ttctgcaga gcttcgtaca tattgtccaa atgttcac 39

<210> 7
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25

<220>
 <223> IL-15-ligando-IgGIFc
 30

<400> 7

ES 2 698 375 T3

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 Asp 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
 Lys Leu Ile Ile Arg Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Ser Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
 130 135 140
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
 145 150 155 160
 Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
 165 170 175
 Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
 180 185 190
 Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val
 195 200 205
 Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe
 210 215 220
 Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225 230 235 240
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile

ES 2 698 375 T3

245 250 255
 Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys
 260 265 270
 Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp
 275 280 285
 Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp
 290 295 300
 Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
 325 330 335
 Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 340 345 350
 <210> 8
 <211> 356
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> IL-15-ligando-IgGIFc
 <400> 8
 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 Asp 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
 Lys Leu Ile Ile Arg 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

10

ES 2 698 375 T3

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 130 135 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 165 170 175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 180 185 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 195 200 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys

355

- 5 <210> 9
- <211> 352
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> IL-15-ligando-IgG2Fc

ES 2 698 375 T3

<400> 9

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 Asp 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

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

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

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

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145 150 155 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165 170 175

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala
180 185 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195 200 205

ES 2 698 375 T3

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210 215 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225 230 235 240

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245 250 255

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260 265 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275 280 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290 295 300

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305 310 315 320

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325 330 335

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345 350

<210> 10
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ligando

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

15 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ligando

<400> 11
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

25 Gly Gly Gly Ser
 20

30 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 698 375 T3

<220>
<223> ligando

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser
5 1 5

<210> 13
<211> 3
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> ligando

15 <400> 13
Gly Gly Ser
1

<210> 14
<211> 3
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GGG

25 <400> 14
Gly Gly Gly
1

<210> 15
30 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> ligando

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

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido mutante de IL-15 que presenta la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1, donde el residuo de leucina de la posición 45 es sustituido por un residuo de ácido aspártico, el residuo de asparagina de la posición 65 es sustituido por un residuo de lisina y el residuo de leucina de la posición 69 es sustituido por un residuo de arginina.
2. Una proteína de fusión que consiste en un polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 fusionado a un polipéptido heterólogo.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, donde el polipéptido heterólogo es un dominio constante de inmunoglobulina.
- 10 4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde el dominio constante de inmunoglobulina se obtiene a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG4, IgA (que incluye IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde el dominio constante de inmunoglobulina es una región Fc.
- 15 6. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde el polipéptido mutante de IL-15 y el dominio constante de inmunoglobulina están unidos mediante un ligando mínimo.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, donde el ligando tiene 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30 residuos de aminoácido.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 6, donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15.
- 20 9. La proteína de fusión según la reivindicación 3, que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9.
10. Un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9.
11. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.
- 25 12. Una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico según la reivindicación 10, o por un vector según la reivindicación 11.
13. Un método para producir un polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedante transformada según la reivindicación 12 en las condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o proteína de fusión expresados.
- 30 14. Un antagonista de IL-15 que consiste en un dímero de la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9.
15. El polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 o la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, o el antagonista de IL-15 según la reivindicación 14, para uso en un método de supresión de la respuesta inmune en un paciente, modulando de este modo las respuestas inmunes dependientes de IL-15.
- 35 16. El polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9 o un antagonista según la 14, para uso según la reivindicación 15, donde el paciente padece una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad reumática tal como artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjogren, escleroderma, enfermedad mixta de tejido conectivo, dermatomiositis, polimiositis, síndrome de Reiter o enfermedad de Behcet, diabetes de tipo II, una enfermedad autoinmune del tiroides, tal como tiroiditis de Hashimoto o enfermedad de Graves, una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple, miastenia gravis o encefalomiелitis, una variedad de pénfigos, tal como *phemphigus vulgaris*, *phemphigus vegetans*, *phemphigus foliaceus*, síndrome de Senear-Usher, o pénfigo del Brasil, soriasis, y enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn.
- 40 17. El polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1 o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9 o un antagonista según la 14, para uso según la reivindicación 15 para promover la supervivencia de injerto y para tratar pacientes con enfermedad de injerto contra hospedante.
- 45 18. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido mutante de IL-15 según la reivindicación 1, una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9 o un antagonista según la 14.

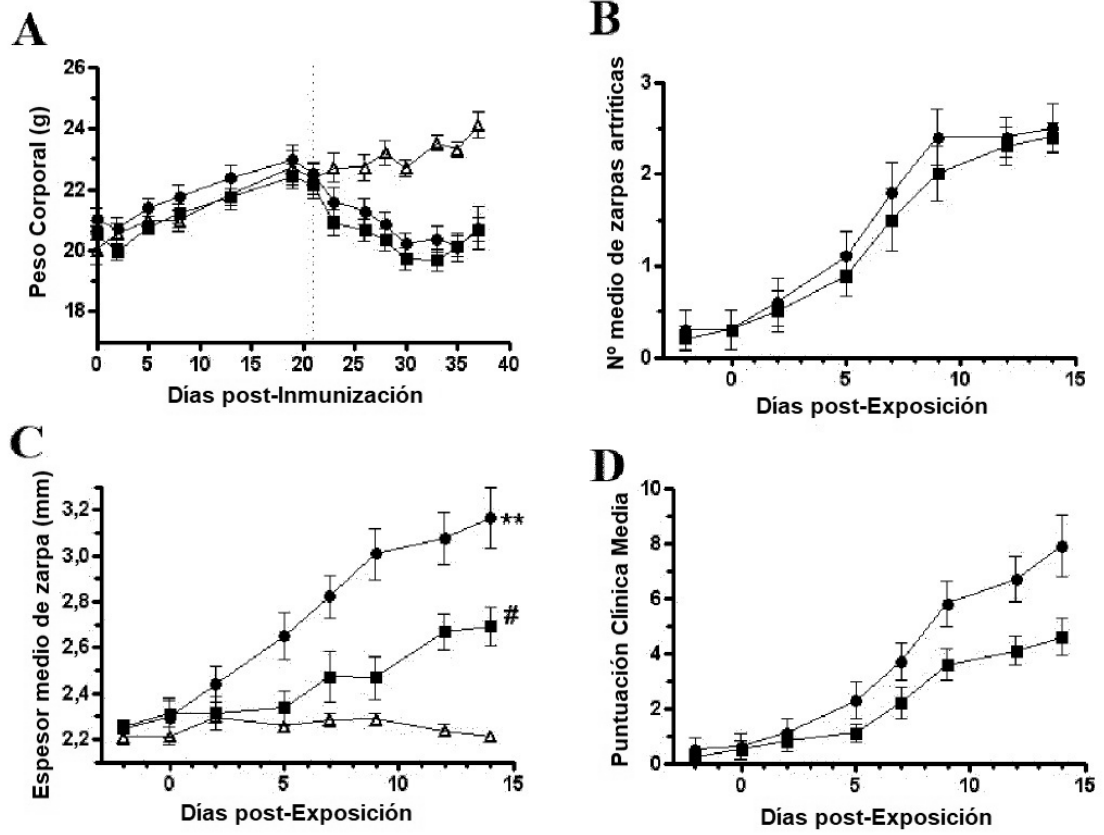


Figura 1

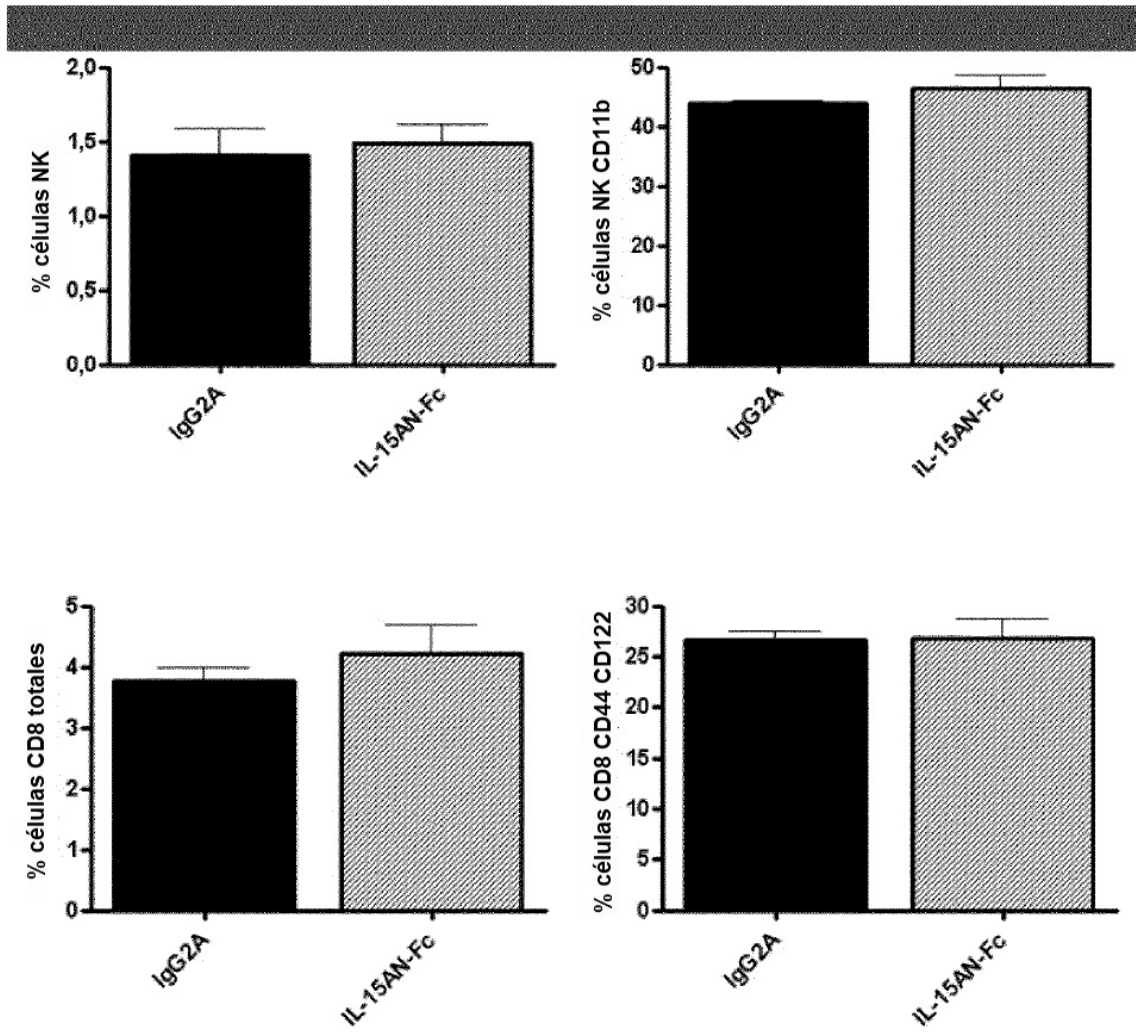


Figura 2

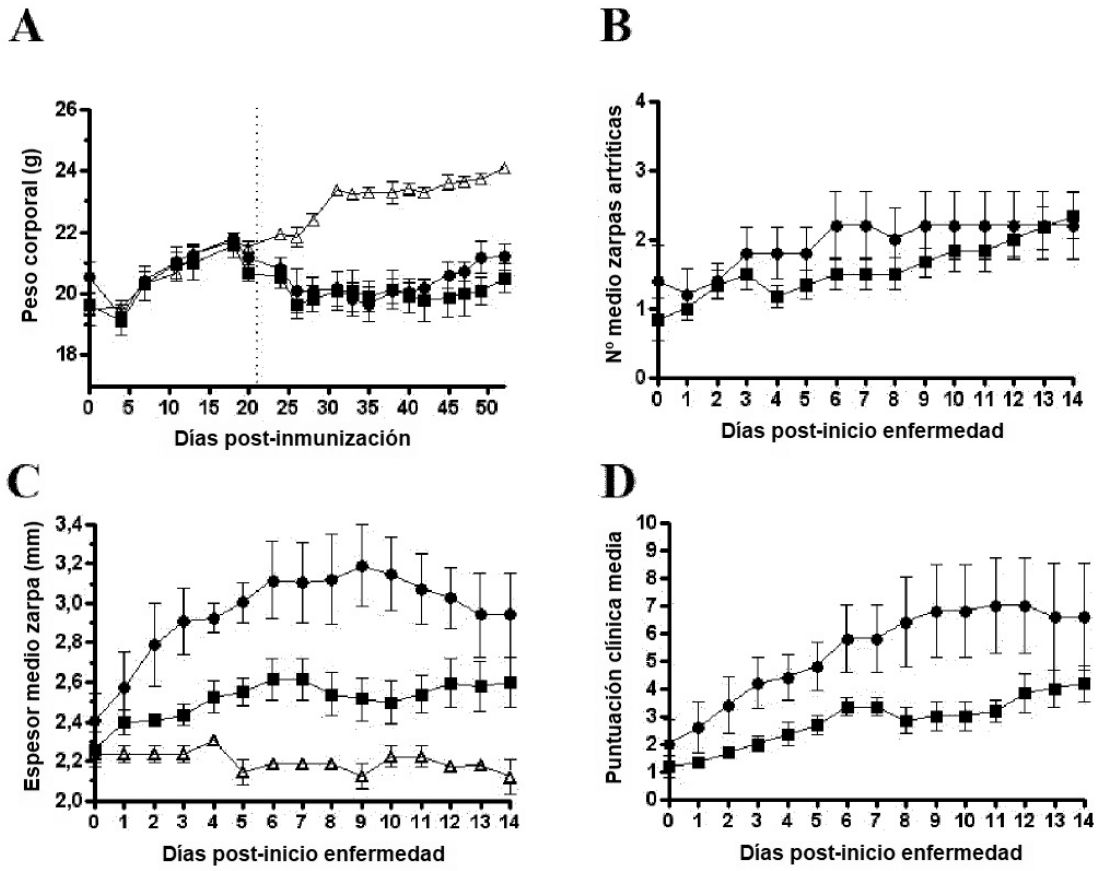


Figura 3

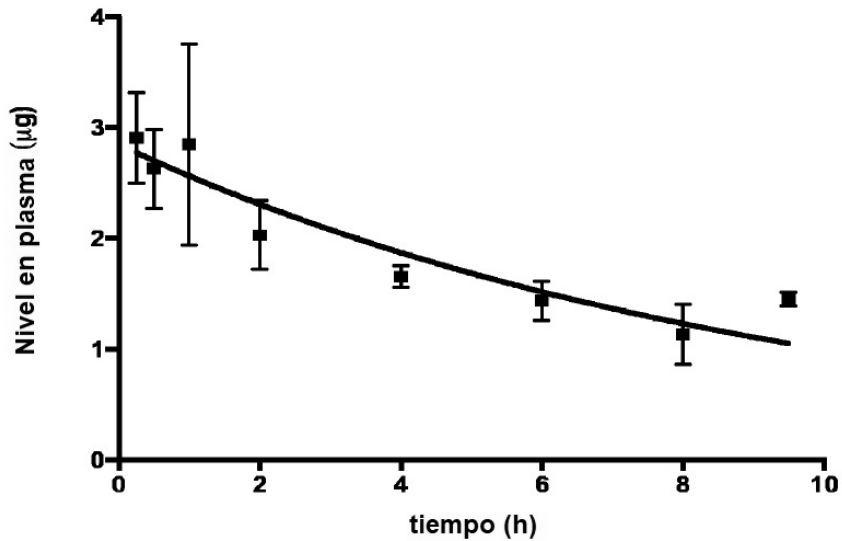


Figura 4

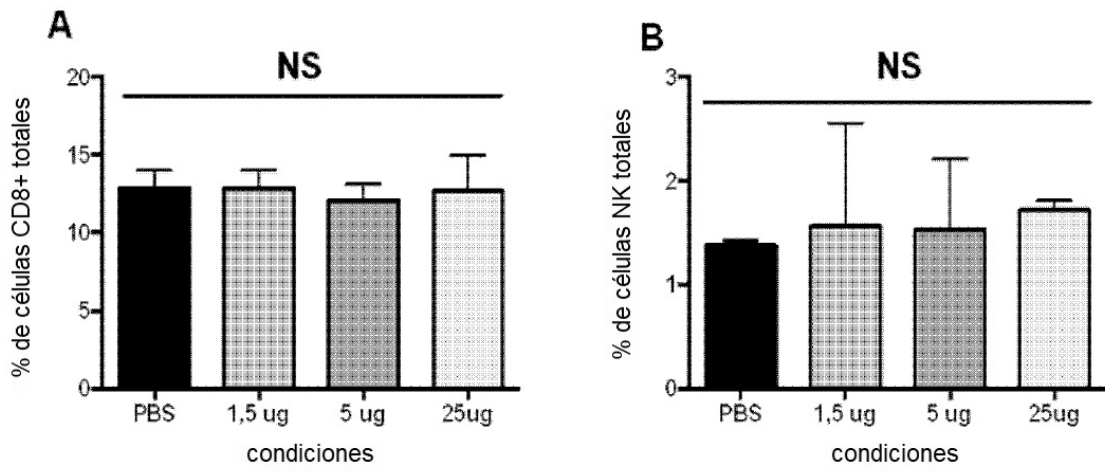


Figura 5