

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 476**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008** E 13195499 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** EP 2724728

54 Título: **Complejos de IL15 e IL15Ralfa y sus usos**

30 Prioridad:

27.06.2007 US 937471 P

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

12.06.2019

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)
Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US y
NOVARTIS AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PAVLAKIS, GEORGE N.;
VOURNAKIS, JOHN N.;
FELBER, BARBARA K. y
FINKIELSZTEIN, SERGIO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 716 476 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

Complejos de IL-15 e IL-15Ralfa y sus usos

5 La presente invención se refiere a células diseñadas para expresar agentes terapéuticos que modulan la función mediada por IL-15.

2. Antecedentes de la invención

10 La citoquina, interleuquina-15 (IL-15), es un miembro de la familia de linfoquinas de cuatro alfa-hélices producidas por muchas células en el cuerpo. La IL-15 desempeña un papel fundamental en la modulación de la actividad del sistema inmune innato y del sistema adaptativo, por ejemplo, el mantenimiento de la respuesta de las células T de la memoria frente a patógenos invasores, la inhibición de la apoptosis, la activación de células dendríticas y la inducción de "natural killer" (NK), la proliferación celular y la actividad citotóxica.

15 El receptor de IL-15 consta de tres polipéptidos, el receptor de IL-15 alfa específico del tipo ("IL-15Ra"), el receptor beta de IL-2/IL-15 (o CD122) ("β") y la cadena gamma común (o CD132) ("γ") que es compartida por múltiples receptores de citoquinas. Se cree que el IL-15Ra se expresa en una amplia variedad de tipos de células, pero no necesariamente en combinación con β e γ. Se ha demostrado que la señalización de IL-15 ocurre a través del complejo heterodimérico de IL-15Ra, β y γ; a través del complejo heterodimérico de β y γ, oa través de una subunidad, IL-15RX, que se encuentra en los mastocitos.

20 La IL-15 es una proteína soluble, pero la IL-15 endógena no es fácilmente detectable en el suero o en los fluidos corporales; en cambio, se presenta principalmente como una forma unida a la membrana que es expresada o adquirida por varios tipos de células accesorias. Por ejemplo, aunque el ARNm de IL-15 se detecta en células de linaje tanto hematopoyético como no hematopoyético, las células T no producen IL-15. En cambio, la IL-15 se une a IL-15Ra, formando complejos de superficie celular en las células T, IL-15 se une específicamente a IL-15Ra con alta afinidad a través del "dominio sushi" en el exón 2 del dominio extracelular del receptor. Después del reciclado transendosomal y la migración de regreso a la superficie celular, estos complejos de IL-15 adquieren la propiedad de activar las células espectadoras que expresan el complejo receptor de baja afinidad IL-15R βγ, induciendo la señalización mediada por IL-15 a través de la vía de Jak/Stat. Se ha observado una forma soluble natural de IL-15Ra ("sIL-15Ra") que se escinde en un sitio de escisión en el dominio extracelular inmediatamente distal al dominio transmembrana del receptor. La enzima convertidora del factor alfa de necrosis tumoral (TACE/ADAM17) se ha implicado como una proteasa involucrada en este proceso.

35 El documento WO2007/084342 describe ácidos nucleicos mejorados para la expresión de IL-15 y/o IL-15Ra en células de mamíferos. Tales ácidos nucleicos se han optimizado con codones para mejorar los niveles de expresión de proteínas. Tagaya Y. et al., 1996, Immunity 4(1): 329-336, describen las características de la IL-15 en relación con sus acciones pleiotrópicas y sus diversas vías de señalización/de receptor. Esta publicación describe el control de la expresión de IL-15 en múltiples niveles. Un artículo de reseña de Waldmann y Tagaya (1999, Annu. Rev. Immunol.17: 19-49) describe la regulación multifacética de la expresión de IL-15 y el papel de esta citoquina en la diferenciación de las células NK y la respuesta del huésped a los patógenos intracelulares. Los estudios de Bamford et al. (1998, J. Immunol. 160 (9): 4418-26) demostraron que las secuencias de nucleótidos o proteínas del péptido señal de IL-15 y el término carboxilo también contribuyeron a la mala traducción de los transcritos de IL-15 y que el intercambio de la secuencia codificadora del

péptido señal de IL-15 con la de IL-2 incrementó los niveles celulares y secretados de la proteína IL-15 de 15 a 20 veces en las células COS. Además, la adición de una marca de epítipo artificial a la secuencia de codificación 3' de IL-15 aumentó su producción de proteínas de 5 a 10 veces. Los estudios de Onu et al. (1997, J. Immunol. 158(1): 255-62) mostraron que los linfoblastos T humanos transcriben el gen IL-15 y generan un producto de empalme alternativo que codifica la misma composición de aminoácidos que la proteína IL-15 madura, pero produce una proteína precursora de IL-15 con un péptido señal más corto. Ambos productos de empalme alternativos son transcriptos por linfocitos que no secretan IL-15.

Sobre la base de su papel multifacético en el sistema inmunológico, se han explorado varias terapias diseñadas para modular la función mediada por IL-15. Por ejemplo, la administración de IL-15 exógena puede mejorar la función inmune de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Al mantener su actividad de mejora inmunológica, se observa una mayor expresión de la IL-15 endógena en pacientes con enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa y psoriasis. Debido a que algunos estudios informaron que la forma soluble de IL-15Ra (sIL-15Ra) es un antagonista de la señalización mediada por IL-15, el sIL-15Ra se ha explorado para tratar enfermedades inflamatorias autoinmunes. Sin embargo, informes recientes sugieren que la IL-15, cuando está en complejo con sIL-15Ra, o el dominio de sushi, mantiene su función de mejora inmunológica.

A pesar de la cantidad de progreso realizado en la comprensión de la función de la IL-15, no está claro cómo se pueden usar varias formas de IL-15Ra, solo o cuando se complejan con la IL-15, para modular la función de la IL-15 como parte de un régimen terapéutico.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una célula aislada que expresa de manera recombinante (i) una IL-15 humana y (ii) una forma soluble de un IL-15Ra humano, o un polipéptido que comprende una forma soluble de un IL-15Ra humano y una molécula heteróloga. En una forma de realización específica, la célula expresa al menos 150 ng/millón de células de IL-15 humana por día cuando se cultivan en medios sin suero. En una determinada forma de realización, la célula puede expresar 150 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 por día. En una forma de realización particular, la IL-15 humana:

- (a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;
- (b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 2;
- (c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;
- (d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;
- (e) está codificada por la SEQ ID NO: 2; o
- (f) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;
- (g) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1257 de la SEQ ID NO: 9;
- (h) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1218 de la SEQ ID NO: 11; o
- (i) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1164 de la SEQ ID NO: 17.

En una forma de realización adicional, la forma soluble de IL-15Ra humana:

- (a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;
- 5 (b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 6;
- (c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6;
- (d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;
- (e) está codificada por la SEQ ID NO: 6; o
- 10 (f) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, la molécula heteróloga es el dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento de la misma. En otra forma de realización, la célula es una línea celular de mamífero, que se puede seleccionar de la línea celular 293H o 293 o se puede seleccionar de la línea 293T, COS, CHO, HeLa, NIH3T3, HepG2, MCF7, RD, PC12, K562, skBr3, BT27, A204, M07Sb, TFβ1, Raji, Jurkat, MOLT-4, CTLL-2, MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SYS5Y, C127, o línea celular BE(2) -C. En una forma de realización alternativa, la célula es una célula de cáncer irradiada.

La presente invención también proporciona un método para producir de manera recombinante (i) IL-15 humana y (ii) una forma soluble de IL-15Ra humana o un polipéptido que comprende la forma soluble de IL-15Ra humana y una molécula heteróloga, que comprende:

- (a) cultivar la célula de la presente invención; y
- (b) purificar la IL-15 humana y la forma soluble de IL-15Ra humana o el polipéptido que comprende la forma soluble de IL-15Ra humana y una molécula heteróloga.

En la presente, se describen agentes que modulan la transducción o función de la señal de la interleuquina-15 ("IL-15") ("agentes terapéuticos") y el uso de esos agentes para modular la función inmune. Los agentes terapéuticos se dirigen a la interacción entre la IL-15 y su receptor y modulan la transducción de señales inducida por la IL-15. Los agentes terapéuticos pueden formularse con polímeros, como la poli-β-1→4-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto humano para modular la función inmune mediada por IL-15.

En la presente, se describen agentes terapéuticos que inducen la transducción de señales de IL-15 y mejoran la función inmune mediada por la IL-15 (es decir, agentes terapéuticos agonistas). Los agentes terapéuticos agonistas son de utilidad para mejorar la función inmune mediada por IL-15 en un sujeto que necesita tal terapia. En particular, los agentes terapéuticos agonistas son útiles para la prevención, tratamiento y/o manejo de trastornos en los que es beneficioso mejorar la función inmune mediada por la IL-15. Ejemplos no limitativos de tales trastornos incluyen cáncer y enfermedades infecciosas.

Los agentes terapéuticos agonistas incluyen complejos que se unen a las subunidades β del receptor IL-15 y comprenden IL-15 unida covalente o no covalentemente al receptor alfa de la interleuquina-15 ("IL-15Ra") ("complejos de IL-15/IL-15Ra"). El complejo de IL-15/IL-15Ra puede comprender IL-15 nativa o un derivado de IL-15 unido covalente o no covalentemente a IL-15Ra nativo o un derivado de IL-15Ra. En una forma de realización, el complejo IL-15/IL-15Ra comprende un derivado de IL-15Ra y el derivado de IL-15Ra es una forma soluble del IL-15Ra nativo. En otra forma de realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende un derivado de IL-15Ra y el derivado de IL-15Ra

comprende mutaciones que inhiben la escisión por una proteasa endógena. En una forma de realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza con un sitio de escisión que es reconocido específicamente por una proteasa heteróloga. En una forma de realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que se escinde por una enzima de procesamiento endógeno se reemplaza por un dominio heterólogo (por ejemplo, un dominio transmembrana heterólogo) o una secuencia de aminoácidos sintética que no permite la escisión y la generación de soluble IL-15Ra. En determinadas formas de realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que se escinde por una enzima de procesamiento endógeno se muta para inhibir la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En una forma de realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza con un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo (por ejemplo, el dominio transmembrana heterólogo que se reconoce y se escinde por otra enzima no relacionada con la enzima de procesamiento endógeno que escinde la IL-15Ra).

Además de IL-15 e IL-15Ra, los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden comprender una molécula heteróloga. La molécula heteróloga puede conjugarse con IL-15 y/o IL-15Ra. La molécula heteróloga se conjuga con IL-15 o IL-15Ra de una manera que no interfiere o evita que IL-15 e IL-15Ra se unan entre sí y no interfiere ni impide la interacción entre el complejo de IL-15/IL-15Ra y las subunidades $\beta\gamma$ del receptor IL-15. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar. Los ejemplos no limitativos de tales antígenos incluyen antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos parásitos y antígenos tumorales. En otras formas de realización, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno celular (por ejemplo, un receptor) expresado por una célula a la que se desea dirigir. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. En determinadas formas de realización, la molécula heteróloga es un dominio Fc de una inmunoglobulina, o un fragmento de la misma. En otras formas de realización, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

Los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden formularse para la administración a un sujeto humano para potenciar una función inmune mediada por IL-15. En una forma de realización específica, los complejos de IL-15/IL-15Ra se formulan con un polímero, como poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto (preferentemente, un sujeto humano). Los complejos de IL-15/IL-15Ra también pueden administrarse a un sujeto no humano para usos veterinarios y/o para producir anticuerpos que se unen específicamente a los complejos de IL-15/IL-15Ra.

En este documento se incluye un método para mejorar una función inmune mediada por IL-15 en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesite una composición que comprende una cantidad eficaz de un complejo de IL-15/IL-15Ra formulado con un polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina, en el que el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana o un derivado de la misma unido de manera covalente o no covalente a la IL-15Ra humana o un derivado de la misma. En una forma de realización adicional, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana e IL-15Ra humana. En otra forma de realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana y un derivado de IL-15Ra humana. En otra forma de realización más, el IL-15Ra humano o el derivado de IL-15Ra humano es soluble. En una forma de realización particular, el método comprende además administrar al sujeto humano uno o más polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, citoquinas o factores de crecimiento) o terapia.

Los agentes terapéuticos agonistas también incluyen ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra que cuando se expresan producen complejos de IL-15/IL-15Ra, y células modificadas genéticamente para expresar complejos de

5 IL-15/IL-15Ra mediante la introducción de ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra en las células. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos pueden transfectarse (en una forma de realización específica, transfectarse de manera estable) en células para producir grandes cantidades de complejo de IL-15/IL-15Ra adecuado para usos in vitro y/o in vivo. En una forma de realización, las células diseñadas para expresar los ácidos nucleicos son líneas celulares. En otra forma de realización, las células diseñadas para expresar los ácidos nucleicos son células primarias de un sujeto humano. En una forma de realización específica, las células diseñadas para expresar los ácidos nucleicos son células cancerosas o células infectadas con un patógeno.

10 Las células diseñadas para expresar IL-15 e IL-15Ra se pueden usar para generar grandes cantidades del complejo de IL-15/IL-15Ra adecuado para usos in vitro e in vivo.

15 En formas de realización específicas, la presente invención proporciona una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero o un derivado del mismo, en donde la célula expresa al menos 0,6 pg de IL-15 de mamífero o un derivado dela misma, en formas de realización particulares, la célula que expresa al menos 0,6 pg de IL-15 de mamífero o un derivado dela misma crece en medios sin suero.

3.1 Terminología

20 Como se usa en la presente, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan para modificar un valor numérico o rango numérico, indican que las desviaciones razonables del valor o rango, normalmente 5% o 10% por encima y 5% o 10% por debajo del valor o rango, permanecen dentro del significado previsto del valor o rango mencionado.

25 Como se usa en la presente, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se refieren a moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, inmunoglobulinas. Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único, anticuerpos camelizados, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos (sdFv) unidos por enlaces disulfuro, intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-id y anti-anti-id
30 contra anticuerpos), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

35 Como se usa en la presente, los términos “enfermedad” y “trastorno” se usan indistintamente para referirse a una afección, en particular, una afección patológica, y más particularmente una enfermedad afectada por la transducción de señales de IL-15.

40 Como se usa en la presente, las expresiones “se une de forma inmunespecífica”, “reconoce de forma inmunespecífica”, “se une específicamente”, “reconoce específicamente” y las expresiones análogas en el contexto de los anticuerpos se refieren a las moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítipo o complejo inmune) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con una afinidad más baja según lo determinado, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no

reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

5 Como se usa en la presente, las expresiones “se une específicamente”, “reconoce específicamente” y expresiones análogas en el contexto de la interacción del receptor (por ejemplo, IL-15Ra nativo) y ligando (por ejemplo, IL-15 nativa) se refieren a la unión específica o asociación entre el ligando y el receptor. Preferentemente, el ligando tiene mayor afinidad por el receptor que por otras moléculas. En una forma de realización específica, el ligando es IL-15 nativa y el receptor nativo es IL-15Ra. En otra forma de realización específica, el ligando es el complejo de IL-15/IL-15Ra nativo y el receptor nativo es el complejo receptor. En una forma de realización adicional, el complejo de IL-15/IL-15Ra se une al
10 complejo del receptor $\beta\gamma$ y activa la transducción de señales mediada por IL-15. Los ligandos que se unen específicamente a un receptor pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

15 Como se usa en la presente, las expresiones “IL-15 nativa” e “interleuquina-15 nativa” en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos de interleuquina-15 de mamífero natural, incluidas las formas inmaduras o precursoras y maduras. Los ejemplos no limitativos de los números de acceso de GeneBank para la secuencia de aminoácidos de varias especies de interleuquina-15 de mamíferos nativos incluyen NP_000576 (forma humana, inmadura), CAA62616 (forma humana, inmadura), NP_001009207 (Felis catus, forma inmadura), AAB94536 (rattus, forma inmadura), AAB41697 (rattus, forma inmadura), NP_032383 (Mus musculus, forma inmadura), AAR19080
20 (canino), AAB60398 (macaca mulatta, forma inmadura), AAI00964 (humano, forma inmadura), AAH23698 (mus musculus, forma inmadura), y AAH18149 (humano). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa, que comprende el péptido de señal larga (subrayado) y la IL-15 nativa humana madura (en cursiva):

MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSS
25 **NGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 1).**

En algunas formas de realización, la IL-15 nativa es la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero natural. En otras formas de realización, la IL-15 nativa es la forma madura de una IL-15 de mamífero natural. En una forma de realización específica, la IL-15 nativa es la forma precursora de la IL-15 humana natural. En otra forma de realización, la IL-15 nativa es la forma madura de la IL-15 humana natural. En una forma de realización, la proteína/polipéptido de IL-15
30 nativa se aísla o se purifica.

Como se usa en la presente, las expresiones “IL-15 nativa” e “interleuquina-15” nativa en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a cualquier secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica la interleuquina-15 de mamíferos, incluyendo las formas inmaduras o precursoras y maduras. Los ejemplos no limitativos de los números de acceso de GeneBank para la secuencia de nucleótidos de varias especies de IL-15 de mamíferos nativos incluyen NM_000585
35 (humano), NM_008357 (Mus musculus) y RNU69272 (rattus norvegicus). Se proporciona la secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal largo (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica la IL-15 nativa humana madura (en cursiva):

40 **atgagaat ttcgaaacca catttgagaa gtatttccat**

ccagtgtac ttgtttac ttctaacag tcatttcta actgaagctg gcattcatgt cttcatttg ggctgttca gtcagggt
tcctaaaaca gaagccaact gggatgatgt aataagtgat ttgaaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct atgcatattg
atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca gcaatgaagt gctttctett ggagttacaa
gttatttcac ttgagtcgg agatgcaagt attcatgata cagtagaaaa tctgatcate ctagecaaca acagttgtc
ttctaatggg aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaaa tattaaagaa ttttgcaga
gtttgtaca tattgtccaa atgttcatca acattettg a (SEQ ID NO: 2).

5 En una forma de realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos codifican la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero natural. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos codifican la forma madura de una IL-15 de mamífero natural. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa codifican la forma precursora de la IL-15 humana natural. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa codifican la maduración de la IL-15 humana natural.

10 Como se usa en la presente, las expresiones “derivado de IL-15” y “derivado de interleuquina-15” en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a: (a) un polipéptido que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11,12,13,14,15, 16,17,18,19, 20 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) relativas a un polipéptido de IL-15 nativa de mamífero; (d) un polipéptido codificado por ácidos nucleicos puede hibridarse en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos; o (f) un fragmento de un polipéptido de IL-15 nativa de mamífero. Los derivados de IL-15 también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura natural de un polipéptido de IL-15 de mamífero y una secuencia de aminoácidos peptídica señal heteróloga. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15 es un derivado de un polipéptido de IL-15 humano nativo. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma inmadura o precursora de polipéptido de IL-15 humano natural. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma madura de polipéptido de IL-15 humana de origen natural. En una forma de realización, un derivado de IL-15 se aísla o se purifica.

35 En una forma de realización preferida, los derivados de IL-15 retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 nativa de mamífero para unirse al polipéptido de IL-15Ra, medido por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, Biacore, coimmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, los derivados de IL-15 retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 nativa de mamífero para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, medida por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de movilidad eléctrica, ELISA y otros inmunoensayos.

El porcentaje de identidad se puede determinar utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica. En una forma de realización específica, el porcentaje de identidad se determina utilizando el programa "Best Fit" o "Gap" del Paquete de Software de Análisis de Secuencias (Versión 10; Genetics Computer Group, Inc., Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin). Se describió la información con respecto a las condiciones de hibridación (por ejemplo, condiciones de rigurosidad alta, moderada y típica), ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente U. S. N.° US 2005/0048549 (por ejemplo, los párrafos 72-73).

Como se usa en la presente, las expresiones "derivado de IL-15" y "derivado de interleuquina-15" en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a: (a) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (c) una secuencia de ácidos nucleicos que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de la base de ácido nucleico (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) en relación con la secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (d) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (e) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; y (f) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15 humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica una forma inmadura o precursora de un polipéptido de IL-15 humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica una forma madura de un polipéptido de IL-15 humano.

Las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15 incluyen secuencias de ácidos nucleicos optimizadas en codón que codifican el polipéptido de IL-15 nativa de mamífero, incluidas formas maduras e inmaduras del polipéptido de IL-15. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos derivados de IL-15 incluyen ácidos nucleicos que codifican transcritos de ARN de IL-15 de mamíferos que contienen mutaciones que eliminan sitios de empalme potenciales y elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U) sin afectar la secuencia de aminoácidos para aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15 de mamíferos.

En una forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa para unirse a IL-15Ra, según se mide por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, Biacore, coimmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, como se mide por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de movilidad eléctrica, ELISA y otros inmunoensayos.

Como se usa en la presente, las expresiones “IL–15” e “interleuquina–15” se refieren a un IL–15 nativa, un derivado de IL–15 o un IL–15 nativa y un derivado de IL–15.

5 Como se usa en la presente, las expresiones “IL–15Ra nativo” y “receptor alfa de interleuquina–15 nativo” en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos del receptor alfa de interleuquina–15 (“IL–15Ra”) de mamífero natural, incluidas las formas inmaduras o precursoras y maduras y las isoformas naturales. Los ejemplos no limitativos de los números de acceso de GeneBank para la secuencia de aminoácidos de diversos IL–15Ra de mamífero nativos incluyen NP_002180 (humano), ABK41438 (Macaca mulatta), NP_032384 (Mus musculus), Q60819 (Mus musculus), CAI41082 (humano)). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura de IL–15Ra humano de longitud completa nativo, que comprende el péptido señal (subrayado) e IL–15Ra nativo humano maduro (en cursiva):

MAPRRARGCR

TLGLPALLLL LLLRPPATRG *ITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN*

SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIRDPALV HQRPAPPSTV

TTAGVTPQPE SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAIVPGS QLMPSKSPST GTTEISSHES

SHGTPSQTTA KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTTVAIST STVLLCGLSA VSLLACYLKS

15 ***RQTPPLASVE MEAMEALPVT WGTSSRDEDL ENCSHHL*** (SEQ ID NO: 3).

Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura de IL–15Ra humano soluble nativo, que comprende el péptido señal (subrayado) e IL–15Ra nativo humano maduro (en cursiva):

MAPRRARGCR TLGLPALLLL LLLRPPATRG *ITCPPMSVE HADIWVKSYS*

LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIRDPALV HQRPAPPSTV

TTAGVTPQPE SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAIVPGS QLMPSKSPST GTTEISSHES

SHGTPSQTTA KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTT (SEQ ID NO: 4).

20 En algunas formas de realización, el IL–15Ra nativo es la forma inmadura de un polipéptido de IL–15Ra de mamífero natural. En otras formas de realización, el IL–15Ra nativo es la forma madura de un polipéptido de IL–15Ra de mamífero natural. En determinadas formas de realización, el IL–15Ra nativo es una forma soluble de un polipéptido de IL–15Ra de mamífero natural. En otras formas de realización, el IL–15Ra nativo es la forma de longitud completa de un polipéptido de IL–15Ra de mamífero natural. En una forma de realización específica, el IL–15Ra nativo es la forma inmadura de un polipéptido de IL–15Ra humano natural. En otra forma de realización, el IL–15Ra nativo es la forma madura de un polipéptido de IL–15Ra humano natural. En determinadas formas de realización, el IL–15Ra nativo es la forma soluble de un polipéptido de IL–15Ra humano natural. En otras formas de realización, el IL–15Ra nativo es la forma de longitud completa de un polipéptido de IL–15Ra humano natural. En una forma de realización, una proteína o polipéptido de IL–15Ra nativo se aísla o se purifica.

30 Como se usa en la presente, las expresiones “IL–15Ra nativo” y “receptor alfa de interleuquina–15 nativo” en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a cualquier secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica el receptor alfa de la interleuquina–15 de mamíferos, incluido las formas inmaduras o precursoras y maduras. Los ejemplos no limitativos de los números de acceso de GeneBank para la secuencia de nucleótidos de varias especies de IL–15Ra de mamíferos nativo incluyen NM_002189 (humano), EF033114 (Macaca mulatta) y NM_008358 (Mus musculus). Se proporciona la secuencia

de nucleótidos que codifica la forma inmadura de IL-15Ra humano nativo, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica el IL-15Ra nativo humano maduro (en cursiva):

atggcccc gggcgggcg cgggctgcc

ggaccctcgg tctccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg ggcacgcggg gcatcacgtg ccctcccc
atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgctactc caggagcgg tacatttga actctggtt
caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg
acaaceccca gtctcaaatg cattagagac cctgccctgg ttaccaaag gccagegcca ccctccacag taacgacggc
 5 *aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctctgga aaagagcccg cagcttcate tccagctca*
aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct ccagctgat gcctcaaaa tcacctcca caggaaccac
agagataage agtcagagt cctcccacgg caccctctc cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca
gcatccgct cccaccagcc gccaggtgtg tateccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt
cctgctgtgt gggctgagcg ctgtgtctc cctggcatgc taccicaagt caaggcaaac tccccgctg gccagcgtg
aatggaage catggaggct ctgccgtga cttgggggac cagcagcaga gatgaagaact tggaaaactg
ctctcaccac ctatga (SEQ ID NO: 5).

La secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura de la proteína o polipéptido de IL-15Ra humano nativo soluble, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica el IL-15Ra nativo humano soluble maduro (en cursiva), se proporciona:

atggcccc gggcgggcg

cgggctgcc ggaccctcgg tctccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg ggcacgcggg gcatcacgtg
ccctcccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgctactc caggagcgg tacatttga
actctggtt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg
acaaceccca gtctcaaatg cattagagac cctgccctgg ttaccaaag gccagegcca ccctccacag taacgacggc
aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctctgga aaagagcccg cagcttcate tccagctca
aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct ccagctgat gcctcaaaa tcacctcca caggaaccac
agagataage agtcagagt cctcccacgg caccctctc cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca
gcatccgct cccaccagcc gccaggtgtg tateccacagg gccacagcga caccact (SEQ ID NO: 6).

En una forma de realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma inmadura de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero natural. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma madura de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero natural. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma soluble de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero natural. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma de longitud completa de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero natural. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma precursora de polipéptido de IL-15 humano natural. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la maduración del polipéptido de IL-15 humano natural. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma soluble de un polipéptido de IL-15Ra

humano natural. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos naturales codifican la forma de longitud completa de un polipéptido de IL-15Ra humano natural.

5 Como se usa en la presente, las expresiones “derivado de IL-15Ra” y “derivado del receptor alta de interleuquina-15” en el contexto de una proteína o polipéptido se refieren a: (a) un polipéptido que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de una secuencia de ácidos nucleicos idéntica que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18,19, 20
10 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) relativas a un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo; (d) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridar en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a secuencias de ácidos nucleicos que codifican un fragmento de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos; o (f) un fragmento de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo. Los derivados de IL-15Ra también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura natural del polipéptido de IL-15Ra de mamífero y una secuencia de aminoácidos de péptidos señal heteróloga. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15Ra es un derivado de un polipéptido de IL-15Ra humano nativo. En otra forma de realización, un derivado de IL-15Ra es un derivado de una forma inmadura de polipéptido de IL-15 humano natural. En otra forma de realización, un derivado de IL-15Ra es un derivado de una forma madura de polipéptido de IL-15 humano natural. En una forma de realización, un derivado de IL-15Ra es la forma soluble de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15Ra se purifica o se aísla.
15
20
25

En una forma de realización preferida, los derivados de IL-15Ra retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo para unirse a un polipéptido de IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, Biacore, coimmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, los derivados de IL-15Ra retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de movilidad eléctrica, ELISA y otros inmunoensayos.
30

35 Como se usa en la presente, las expresiones “derivado de IL-15Ra” y “derivado del receptor alfa de interleuquina-15” en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a: (a) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero; (b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que es al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la
40 secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo; (c) una secuencia de ácidos nucleicos que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6,7, 8, 9,10,11,12,13,14, 15,16,17,18,19,20 o más mutaciones de ácido nucleico (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) en relación con la secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero; (d) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero;

(e) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica a un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero; y (f) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15Ra en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica un polipéptido de IL-15Ra humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15Ra en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica una forma inmadura de un polipéptido de IL-15Ra humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15Ra en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácidos nucleicos natural que codifica una forma madura de un polipéptido de IL-15Ra humano. En una forma de realización, un derivado de IL-15Ra se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de IL-15Ra de mamífero que es soluble.

Las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15Ra incluyen secuencias de ácidos nucleicos optimizadas en codón que codifican el polipéptido de IL-15Ra nativo, que incluyen las formas maduras e inmaduras del polipéptido de IL-15Ra. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos derivados de IL-15Ra incluyen ácidos nucleicos que codifican los transcritos de ARN de IL-15Ra que contienen mutaciones que eliminan sitios potenciales de empalme y elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U) sin afectar la secuencia de aminoácidos a aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15Ra.

En una forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15Ra codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15Ra de mamífero nativo para unirse a IL-15, según se mide por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, Biacore, coimmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15Ra codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un IL-15Ra de mamífero nativo para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, como se mide por ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de movilidad eléctrica, ELISA y otros inmunoensayos.

Como se usa en la presente, las expresiones "IL-15Ra" y "receptor alfa de interleuquina-15" se refieren a un IL-15Ra nativo, un derivado de IL-15Ra, o un IL-15Ra nativo y un derivado de IL-15Ra.

Como se usa en la presente, la expresión "complejo de IL-15/IL-15Ra" se refiere a un complejo que comprende IL-15 e IL-15Ra unidos de manera covalente o no covalente entre sí. En una forma de realización preferida, el IL-15Ra tiene una afinidad relativamente alta por la IL-15, por ejemplo, K_d de 10 a 50 pM según se mide mediante una técnica conocida en el arte, por ejemplo, ensayo KinEx A, resonancia de la superficie del plasma (por ejemplo, ensayo BIAcore). En otra forma de realización preferida, el complejo de IL-15/IL-15Ra induce la transducción de señales mediada por IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de movilidad eléctrica, ELISA y otros inmunoensayos. En algunas formas de realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra conserva la capacidad de unirse específicamente a la cadena β .

Como se usa en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente y se refieren a un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y humano), más preferentemente un humano.

5 Como se usa en la presente, los términos “purificado” y “aislado” en el contexto de un compuesto o agente (incluidos, por ejemplo, agentes proteínicos como los anticuerpos) que se sintetizan químicamente se refieren a un compuesto o agente que está sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. En una forma de realización específica, el compuesto o agente está libre en un 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% (en peso seco) de otros compuestos o agentes diferentes.

10 Como se usa en la presente, los términos “purificado” y “aislado” cuando se usan en el contexto de un compuesto o agente (incluidos los agentes proteínicos como los anticuerpos y polipéptidos) que pueden obtenerse de una fuente natural, por ejemplo, células, se refieren a un compuesto o agente que está sustancialmente libre de materiales contaminantes de la fuente natural, por ejemplo, partículas del suelo, minerales, sustancias químicas del medio ambiente y/o materiales celulares de la fuente natural, tales como, pero sin limitación, restos celulares, materiales de la pared celular, membranas, organelas, la mayor parte de los ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y/o lípidos presentes en las células. La frase “sustancialmente libre de materiales de fuente natural” se refiere a preparaciones de un compuesto o agente que se ha separado del material (por ejemplo, componentes celulares de las células) a partir de los cuales se aísla. Por lo tanto, un compuesto o agente que se aísla incluye preparaciones de un compuesto o agente que tiene menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5%, 2% o 1% (en peso seco) de materiales celulares y/o materiales contaminantes.

20 Una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos “aislada” es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en una fuente natural de la secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos. Además, una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos cuando se sintetiza químicamente. En determinadas formas de realización, una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos “aislada” es una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos que se expresa en forma recombinante en una célula heteróloga.

30 En algunas formas de realización, las expresiones “ácido nucleico”, “nucleótido” y “polinucleótido” se refieren a desoxirribonucleótidos, ácidos desoxirribonucleicos, ribonucleótidos y ácidos ribonucleicos, y sus formas poliméricas, e incluyen formas de cadena simple o doble. En determinadas formas de realización, dichas expresiones incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (“PNA”), que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. En algunas formas de realización, dichas expresiones se refieren a ácidos desoxirribonucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN). En otras formas de realización, dichas expresiones se refieren al ácido ribonucleico (por ejemplo, ARNm o ARN).

35 Como se usa en la presente, los términos “terapias” y “terapia” pueden referirse a cualquier protocolo, método, composición, formulación y/o agente que se puede usar en la prevención, tratamiento, manejo, o mejoría de una enfermedad, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, enfermedad de injerto versus huésped y rechazo de trasplante, o un síntoma asociado. En determinadas formas de realización, los términos “terapias” y “terapia” se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención o mejoría de una enfermedad o un síntoma asociado conocido por un experto en la técnica. En una forma de realización, una terapia incluye un agente terapéutico agonista. En una forma de realización, una terapia incluye un agente terapéutico antagonista. En una forma de realización, una terapia no es un agente terapéutico agonista. En una forma de realización, una terapia no es un agente terapéutico antagonista.

Como se usa en la presente, los términos “proteína(s)” y “polipéptido(s)” se refieren indistintamente a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas formas de realización, los términos “proteína(s)” y “polipéptido(s)” se refieren a una macromolécula que comprende aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces peptídicos.

- 5 Como se usa en la presente, el término “fragmento” en el contexto de una secuencia de nucleótidos se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 5 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 10 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 15 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 20 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 25 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 40 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 50 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 60 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 70 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 80 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 90 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 100 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 125 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 150 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 175 bases de ácido nucleico contiguas, al menos 200 bases de ácido nucleico contiguas, o al menos 250 bases de ácido nucleico contiguas de la secuencia de nucleótidos del gen de interés, por ejemplo, IL-15, IL-15Ra. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN o una variante del mismo modificada químicamente.
- 10
- 15 En una forma de realización específica, el fragmento es un fragmento de IL-15 o IL-15Ra.

Como se usa en la presente, el término “fragmento” es el contexto de un fragmento de un agente proteínico (por ejemplo, una proteína o polipéptido) se refiere a un fragmento que está compuesto por 8 o más aminoácidos contiguos, 10 o más aminoácidos contiguos, 15 o más aminoácidos contiguos, 20 o más aminoácidos contiguos, 25 o más aminoácidos contiguos, 50 o más aminoácidos contiguos, 75 o más aminoácidos contiguos, 100 o más aminoácidos contiguos, 150 o más aminoácidos contiguos, 200 o más aminoácidos contiguos, 10 a 150 aminoácidos contiguos, 10 a 200 aminoácidos contiguos, 10 a 250 aminoácidos contiguos, 10 a 300 aminoácidos contiguos, 50 a 100 aminoácidos contiguos, 50 a 150 aminoácidos contiguos, 50 a 200 aminoácidos contiguos, 50 a 250 aminoácidos contiguos o 50 a 300 aminoácidos contiguos de un agente proteínico, por ejemplo, polipéptidos de IL-15 e IL-15Ra.

20

25

Como se usa en la presente, la expresión “en combinación” se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos). El uso de la expresión “en combinación” no restringe el orden en que se administran las terapias a un sujeto con una enfermedad o trastorno. Se puede administrar una primera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) antes (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente o después (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto con una enfermedad o trastorno o uno de sus síntomas.

30

35

Como se usa en la presente, la expresión “bebé prematuro humano” se refiere a un bebé humano nacido con menos de 37 semanas de edad gestacional.

40 Como se usa en la presente, la expresión “bebé humano” se refiere a un recién nacido a un humano de 1 año de edad.

Como se usa en la presente, la expresión “niño humano” se refiere a un humano que tiene de 1 año a 18 años.

Como se usa en la presente, la expresión “adulto humano” se refiere a un humano que tiene 18 años o más.

Como se usa en la presente, la expresión “humano anciano” se refiere a un humano de 65 años o más.

5 Como se usa en la presente, los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia, tales como, pero sin limitación, la reducción o inhibición de la progresión, la propagación y/o la duración de una enfermedad o trastorno, la reducción o la mejoría de la gravedad de una enfermedad o trastorno, la mejoría de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, y/o la reducción en la duración de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno resultante de la administración de una o más terapias. En formas de realización específicas, dichos términos en el contexto de
 10 cáncer incluyen, pero sin limitación, uno, dos, o tres o más resultados luego de la administración de una terapia a un sujeto: (1) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasma; (2) una reducción en la formación de un tumor; (3) una erradicación, extirpación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (4) una reducción en la diseminación metastásica; (5) una reducción de la mortalidad; (6) un aumento en la tasa de supervivencia; (7) un aumento en la duración de la supervivencia; (8) un aumento en el número de pacientes en remisión; (9) una disminución en la tasa de
 15 hospitalización; (10) una disminución en la duración de la hospitalización; y (11) el mantenimiento del tamaño del tumor para que no aumente en más del 10%, o en más del 8%, o en más del 6%, o en más del 4%; preferentemente el tamaño del tumor no aumenta en más del 2%.

20 Como se usa en la presente, los términos “prevenir”, “prevenir” y “prevención” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a la inhibición de la aparición o recurrencia de una enfermedad o trastorno en un sujeto.

Como se usa en la presente, los términos “manejar”, “manejando” y “manejo”, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia, que no dar lugar a una cura de una enfermedad o trastorno. En determinadas formas de realización, a un sujeto se le administran una o más terapias para “manejar” una enfermedad o trastorno de modo de prevenir la progresión o empeoramiento de los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno.
 25

4. Breve descripción de los dibujos

30 FIGs. 1A–B: Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la IL–15 humana nativa. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 1A) (SEQ ID NO: 2) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 1B) (SEQ ID NO: 1). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos del péptido de señal larga (subrayado) y la forma madura (en cursiva).

35 FIGs. 2A–B: Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de IL–15Ra humano nativo de longitud completa. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 2A) (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 2B) (SEQ ID NO: 3). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos del péptido señal (subrayado) y la forma madura (en cursiva).

40 FIGs. 3A–B: Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la IL–15 humana nativa soluble. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 3A) (SEQ ID NO: 6) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 3B) (SEQ ID NO: 4). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos del péptido señal (subrayado) y la forma madura (en cursiva).

FIGs. 4A–D: constructo de ácido nucleico AG32 que codifica la IL–15 humana optimizada. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 4A) (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 4B) (SEQ ID NO: 10). FIG. 4C muestra un esquema del constructo de ácido nucleico que comprende el promotor CMV. FIG. 4D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos traducida del marco de lectura abierto de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la IL–15 humana optimizada (AG32 huIL15opt).

FIGs. 5A–D: constructo de ácido nucleico AG59 que codifica IL–15 humana optimizada con un péptido señal y propéptido de tPA. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 5A) (SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 5B) (SEQ ID NO: 12). FIG. 5C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor CMV. FIG. 5D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos traducida del marco de lectura abierto de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la IL–15 humana optimizada (AG59 CMV huIL15tPA6).

FIGs. 6A–D: constructo de ácido nucleico AG79 que codifica el IL–15Ra humano optimizado. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (Figura 6A) (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos (Figura 6B) (SEQ ID NO: 14). FIG. 6C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor CMV. FIG. 6D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos traducida del marco de lectura abierto de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el IL–15Ra humano (AG79 huIL15Ra).

FIGs. 7A–D: constructo de ácido nucleico AG98 que codifica el IL–15Ra humano soluble optimizado. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 7A) (SEQ ID NO: 15) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 7B) (SEQ ID NO: 16). FIG. 7C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor CMV. FIG. 7D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos traducida del marco de lectura abierto de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el IL–15Ra humano soluble (AG98 CMV huIL15Ra).

FIGs. 8A–D: constructo de ácido nucleico AG151 que codifica la IL–15 humana optimizada con un péptido señal de GM–CSF humano. Se muestran la secuencia de ácidos nucleicos (FIG. 8A) (SEQ ID NO: 17) y la secuencia de aminoácidos (Figura 8B) (SEQ ID NO: 18). FIG. 8C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor CMV. FIG. 8D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos traducida del marco de lectura abierto de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la IL–15 humana con un péptido señal de GM–CSF humano (AG151 CMV/huIL15huGMCSF).

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una célula aislada que expresa de manera recombinante (i) una IL–15 humana y (ii) una forma soluble de un IL–15Ra humano, o un polipéptido que comprende una forma soluble de un IL–15Ra humano y una molécula heteróloga. En una forma de realización específica, la célula expresa al menos 150 ng/millón de células de IL–15 humana por día cuando se cultivan en medios sin suero. En una determinada forma de realización, la célula puede expresar 150 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células de IL–15 humana por día.

En este documento se describen agentes que modulan la función o la transducción de señales de IL–15 (“agentes terapéuticos”) y el uso de esos agentes para modular la función inmune. Los agentes terapéuticos se dirigen a la interacción entre la IL–15 y su receptor y modulan la transducción de señales inducida por la IL–15. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos modulan la interacción entre el receptor beta de IL–15 y el complejo gamma y los complejos compuestos por IL–15 e IL–15Ra.

En la presente, se describen agentes terapéuticos que inducen la transducción de señales de IL-15 y mejoran la función inmune (es decir, agentes terapéuticos agonistas). Dichos agentes terapéuticos agonistas incluyen (i) complejos de IL-15/IL-15Ra que se unen al complejo receptor beta/gamma e inducen la transducción de señales mediada por IL-15, (ii) 5 secuencias de ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra para formar tales complejos, y (iii) células que expresan tales complejos en altas cantidades. En una forma de realización, altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresadas por células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o más de 20 veces más que las cantidades de complejos IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (por ejemplo, células que no han sido 10 modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). Los agentes terapéuticos agonistas son útiles para la prevención, tratamiento y/o manejo de trastornos en los cuales es beneficioso mejorar ciertos aspectos de la función del sistema inmune, en particular, las funciones del sistema inmune que están mediadas por la señalización de IL-15. Los ejemplos no limitativos de tales trastornos incluyen cáncer y enfermedades infecciosas.

15 Se describen en la presente agentes terapéuticos que reducen o inhiben la transducción de señales de IL-15 y suprimen la función del sistema inmune (es decir, agentes terapéuticos antagonistas). Dichos agentes terapéuticos antagonistas incluyen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un complejo de IL-15/IL-15Ra y evitan que IL-15/IL-15Ra endógeno se una al complejo receptor beta/gamma e induzca la transducción de señales mediada por IL-15. Los agentes 20 terapéuticos antagonistas son útiles para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de trastornos en los que es beneficioso suprimir ciertos aspectos de la función inmune, en particular, las funciones del sistema inmune que están mediadas por la señalización de IL-15. Los ejemplos no limitativos de tales trastornos incluyen enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedad de injerto versus huésped y rechazo de trasplantes.

25 En otros aspectos, se describe en este documento un agente terapéutico agonista o un agente terapéutico antagonista formulado con cualquier fibra de polímero natural adecuada para uso biomédico que incluye, pero sin limitación, quitina y quitosano, derivados de fuentes de mariscos, hongos o microalgas. En una forma de realización preferida, la fibra polimérica es poli-β-1→4- N-acetilglucosamina (p-GlcNAc), que incluye formas desacetiladas de pGlcNAc. En una 30 forma de realización específica, el agente terapéutico agonista o el agente terapéutico antagonista formulado con un polímero natural se administra a un sujeto. En una forma de realización, el agente terapéutico agonista o el agente terapéutico antagonista está purificado.

Los agentes terapéuticos pueden usarse ventajosamente en terapia de combinación. La terapia de combinación incluye la administración concurrente y sucesiva de un agente terapéutico y otra terapia. Tal como se usa en la presente, se dice que 35 el agente terapéutico y otra terapia se administran simultáneamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo, simultáneamente, o con 1,2,3,4, 5,6,7 u 8 horas de diferencia. En contraste, se dice que el agente terapéutico y la terapia se administran sucesivamente si se administran al paciente en diferentes días, por ejemplo, el agente terapéutico y la terapia se pueden administrar a intervalos de 1 día, 2 días o 3 días. En los métodos descritos en la presente, la administración del agente terapéutico puede preceder o seguir a la administración de la segunda terapia.

40 Como ejemplo no limitativo, el agente terapéutico y otra terapia pueden administrarse simultáneamente durante un primer período de tiempo, seguido de un segundo período de tiempo en el que se alternan la administración del agente terapéutico y la otra terapia.

Cuando se administra simultáneamente, el agente terapéutico y la otra terapia pueden estar en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones farmacéuticas.

5 Las subsecciones a continuación describen con más detalle los agentes terapéuticos, los ensayos de selección para identificar o validar agentes terapéuticos, los métodos para caracterizar agentes terapéuticos, las formulaciones que comprenden los agentes terapéuticos y los métodos para usar los agentes terapéuticos para modular la función del sistema inmune.

10 5.1. Agentes terapéuticos

15 En este documento se describen agentes terapéuticos que modulan la función o señalización mediada por IL-15. En particular, aquí se describen los agentes terapéuticos que mejoran la función o señalización mediada por IL-15 (es decir, agentes terapéuticos agonistas). La administración de un agente terapéutico agonista a un sujeto que lo necesita mejora la función o señalización mediada por IL-15, que en toneladas resulta en la mejora de ciertos aspectos de la función inmune en el sujeto. La mejora de la función inmune puede estar en forma de, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una respuesta inmune celular, por ejemplo, la secreción de citoquinas (por ejemplo, interferón-gamma), la actividad de las células helper o la citotoxicidad celular. En una forma de realización, la mejora de la función inmune es un aumento de la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T y/o la proliferación de células NK.

20 En el presente documento, se describen agentes terapéuticos que suprimen o reducen la función o señalización mediada por IL-15 (es decir, agentes terapéuticos antagonistas). La administración de un agente terapéutico antagonista a un sujeto que lo necesita suprime o disminuye la función o señalización mediada por IL-15 que, a su vez, resulta en la supresión de ciertos aspectos de la función inmune en el sujeto. La supresión de la función inmune puede estar en forma de, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos más baja (respuesta humoral) o una respuesta inmune celular más baja, por ejemplo, la secreción de citoquinas (por ejemplo, interferón-gamma), la actividad de células helper o la citotoxicidad celular. En una forma de realización, la supresión de la función inmune es la disminución de la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T y/o la proliferación de células NK.

30 5.1.1. Complejos de proteínas

35 En el presente documento, se describen agentes terapéuticos que son complejos que comprenden IL-15 unida covalente o no covalentemente a IL-15Ra ("complejos de IL-15/IL-15Ra"). El complejo de IL-15/IL-15Ra es capaz de unirse al complejo receptor. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos agonistas son complejos de IL-15/IL-15Ra que pueden inducir la transducción de señales mediada por IL-15, por ejemplo, la transducción de señales Jak/Stat mediada por IL-15. Dicha inducción en la señalización mediada por IL-15 da como resultado la mejora de la función inmune en un sujeto.

40 Los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden estar compuestos por IL-15 nativa o un derivado de IL-15 e IL-15Ra nativo o un derivado de IL-15Ra. En una forma de realización específica, el complejo de IL-15/IL-15Ra está compuesto por un derivado de IL-15 y un derivado de IL-15Ra. En una forma de realización, el derivado de IL-15Ra es una forma soluble de IL-15Ra. En una forma de realización específica, la forma soluble de IL-15Ra carece del dominio transmembrana de IL-15Ra nativo, y opcionalmente, el dominio intracelular de IL-15Ra nativo. En otra forma de realización, el derivado de IL-15Ra es el dominio extracelular de IL-15Ra nativo o un fragmento del mismo. En determinadas formas de realización,

el derivado de IL-15Ra es un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio de sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo. En algunas formas de realización, el derivado de IL-15Ra comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y al menos un aminoácido que está codificado por el exón 3. En determinadas formas de realización, el derivado de IL-15Ra comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio de sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y una región bisagra de IL-15Ra o un fragmento del mismo. En una forma de realización específica, el derivado de IL-15Ra está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos optimizada para mejorar la expresión de IL-15Ra, por ejemplo, utilizando métodos como los descritos en la Solicitud Provisional U. S. N.º 60/812.566, presentada el 9 de junio de 2006; y las patentes U. S. Nros. 5.965.726, 6.174.666, 6.291.664, 6.414.132 y 6.794.498. En otra forma de realización, el derivado de IL-15 está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos optimizada para mejorar la expresión de IL-15, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en las solicitudes provisionales U. S. Nros. 60/812.566, presentada el 9 de junio de 2006 y 60/758.819, presentada el 13 de enero de 2006 y la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2007/084342; y las patentes U. S. Nros. 5.965.726, 6.174.666, 6.291.664, 6.414.132 y 6.794.498.

En otra forma de realización, el derivado de IL-15Ra comprende una mutación en el sitio de escisión del dominio extracelular que inhibe la escisión por una proteasa endógena que escinde la IL-15Ra nativa. En una forma de realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza con un sitio de escisión que es reconocido y escindido por una proteasa heteróloga conocida. Los ejemplos no limitativos de tales sitios de escisión de proteasas heterólogas incluyen Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 7), que es reconocida y escindida por la furina proteasa; y A-B- Pro-Arg-X-Y (SEQ ID NO: 8) (A y B son aminoácidos hidrófobos y X e Y son aminoácidos no ácidos) y Gly-Arg-Gly, que son reconocidos y escindidos por la trombina proteasa.

En la presente invención, la IL-15 humana:

- (a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;
- (b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 2;
- (c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;
- (d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;
- (e) está codificada por la SEQ ID NO: 2;
- (f) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;
- (g) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1257 de la SEQ ID NO: 9;
- (h) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1218 de la SEQ ID NO: 11; o
- (i) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1164 de la SEQ ID NO: 17.

En la presente invención, la forma soluble de IL-15Ra humana:

- (a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;
- (b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 6;
- (c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos

nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6;

(d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;

(e) está codificada por la SEQ ID NO: 6; o

(f) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6.

5

Además de la IL-15 y IIL-15Ra, los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden comprender una molécula heteróloga. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar (por ejemplo, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno parásito o un antígeno de

10 cáncer). Los ejemplos no limitativos de tales antígenos incluyen antígenos del flavivirus, Virus del Nilo Occidental (WNV) que incluyen proteínas estructurales, por ejemplo, C, M y E, y proteínas no estructurales, por ejemplo, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5; antígenos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) gp41, gp120, gp160, Nef, Gag y Rev, Tat, Vif, Vpu, Vpr o vpx; virus de la gripe hemaglutinina; glicoproteína G del virus sincicial respiratorio humano; proteína del

15 núcleo, proteína de la matriz u otra proteína del virus del dengue; hemaglutinina del virus del sarampión; glicoproteína gB del virus herpes simplex tipo 2; poliovirus IVP1 (Emini et al., 1983, Nature 304: 699); una glicoproteína de la envuelta del VIH I; antígeno de superficie de hepatitis B; toxina diftérica; epítipo de estreptococo 24M; pilina gonocócica, virus de la pseudorabia g50 (gpD); virus de la pseudorabia II (gpB); virus de la pseudorabia gIII (gpC); glicoproteína H del virus de la pseudorabia; glucoproteína E del virus de la pseudorabia; glicoproteína 195 de gastroenteritis transmisible; proteína de matriz de la gastroenteritis transmisible; glicoproteína 38 del rotavirus porcino; proteína de la cápside del parvovirus

20 porcino; antígeno protector de *Serpulina hydodysenteriae*; glicoproteína 55 de diarrea viral bovina; virus de la enfermedad de Newcastle hemaglutinina-neuraminidasa; gripe porcina hemaglutinina; gripe porcina neuraminidasa; antígenos del virus de la fiebre de aftosa; antígenos del virus del cólera porcino; antígenos del virus de la influenza porcina; antígenos del virus de la peste porcina africana; *Mycoplasma hyopneumoniae*; antígenos del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa (por ejemplo, la glicoproteína E o la glicoproteína G del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa); antígenos del virus de

25 la laringotraqueítis infecciosa (por ejemplo, la glicoproteína G o la glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa); una glicoproteína del virus La Crosse; antígenos del virus de la diarrea neonatal; virus de la encefalomiелitis equina venezolana; virus punta toro; virus de la leucemia murina; virus de tumor mamario de ratón; proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y/o antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo (ver, por ejemplo, la publicación de patente del Reino Unido N.º GB 2034323A publicada el 4 de junio de 1980; Ganem y Varmus, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56 : 651-693; Tiollais et al., 1985, Nature 317: 489-495); antígeno del virus de la influenza

30 equina o del virus del herpes equino (por ejemplo, neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Alaska 91, neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Miami 63; neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Kentucky 81; glicoproteína B del virus equino del herpes tipo 1, glicoproteína D del virus equino del herpes tipo 1); antígeno del virus sincicial respiratorio bovino o virus parainfluenza bovino (por ejemplo, proteína de unión del virus sincicial respiratorio bovino (BRSVG); proteína de fusión del virus sincicial respiratorio bovino (BRSV F); proteína de la nucleocápside del virus sincicial respiratorio bovino (BRSV N); proteína de fusión del virus de parainfluenza bovina tipo 3; la hemaglutinina neuraminidasa del virus de la parainfluenza bovina tipo 3; glicoproteína 48 o glicoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina.

35

40

Otros ejemplos no limitativos de antígenos incluyen antígeno de pan-carcinoma KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA125), fosfato de ácido prostático, antígeno prostático específico, antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales, tales como: CEA, TAG-72, CO17-1A; GICA 19-9, CTA-1

y LEA, antígeno 38.13 de linfoma de Burkitt, CD19, antígenoCD20 de linfoma B humano, CD33, antígenos específicos de melanoma como gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3, tumor específico tipo de trasplante de antígeno de superficie celular (TSTA), como los antígenos tumorales inducidos por virus, incluidos los virus tumorales de ADN de antígeno T y los antígenos de la envoltura de los virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína, como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor vesical, antígeno de diferenciación como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20, antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células TGp37 de leucemia humana, neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama como el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), receptor EphA2, mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno linfocítico humano malignoAPO-1, antígeno de diferenciación tal como el antígeno I encontrado en los eritrocitos fetales y el endodermo primario, I(Ma) encontrado en los adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en el epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 encontradas en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 en adenocarcinoma de pulmón, AH6 en cáncer gástrico, Y hapteno, Ley encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF, serie de E1 (grupo sanguíneo B) en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T5A7 encontrado en células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en estadio de 4-8 células.

En otras formas de realización, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno viral, antígeno bacteriano, antígeno parasitario o antígeno de cáncer). Los ejemplos no limitativos de tales anticuerpos incluyen anticuerpos anti-CD34, anticuerpos anti-CD56, anticuerpos anti-CD8, anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-ckit, anticuerpo anti-flt3, anticuerpo anti-hemaglutinina, anticuerpo anti-gp41, anticuerpo anti-gp120, y anticuerpo anti-HSV-II glicoproteína gB. En otras formas de realización, el anticuerpo se une inmunespecíficamente a uno de los antígenos enumerados anteriormente. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno celular (por ejemplo, un receptor o antígeno de superficie celular) expresado por una célula a la que se pretende apuntar. Por ejemplo, el complejo de IL-15/IL-15Ra puede dirigirse a células progenitoras CD34+ con un anticuerpo anti-CD34 para inducir el desarrollo de dichas células en células NK CD56+. El complejo de IL-15/IL-15Ra puede dirigirse a células NK CD56+ con un anticuerpo anti-CD56 para inducir la proliferación de tales células.

En algunas formas de realización, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. Los ejemplos no limitativos de tales moléculas incluyen polietilenglicol (PEG), dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento de la misma, o albúmina que aumenta la vida media de IL-15 o IL-15Ra in vivo. En determinadas formas de realización, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

En aquellos complejos de IL-15/IL-15Ra que comprenden una molécula heteróloga, la molécula heteróloga puede conjugarse con IL-15 y/o IL-15Ra. En una forma de realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15Ra. En otra forma de realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15.

Los componentes de un complejo de IL-15/IL-15Ra pueden fusionarse directamente, usando enlaces no covalentes o

enlaces covalentes (por ejemplo, combinando secuencias de aminoácidos a través de enlaces peptídicos), y/o pueden combinarse usando uno o más enlazadores. En una forma de realización específica, IL-15 e IL-15Ra se fusionan directamente entre sí utilizando enlaces no covalentes o enlaces covalentes (por ejemplo, combinando secuencias de aminoácidos a través de enlaces peptídicos), y/o pueden combinarse utilizando uno o más enlazadores. En formas de realización específicas, un polipéptido que comprende IL-15 e IL-15Ra fusionados directamente entre sí usando enlaces no covalentes o enlaces covalentes es funcional (por ejemplo, capaz de unirse específicamente al complejo IL-15R $\beta\gamma$ e inducir la transducción de señales mediada por IL-15 y/o la función inmune mediada por IL-15). Los enlazadores adecuados para preparar los complejos de IL-15/IL-15Ra comprenden péptidos, grupos alquilo, grupos alquilo químicamente sustituidos, polímeros o cualquier otra sustancia química unida covalente o no covalentemente capaz de unir entre sí dos o más componentes. Los enlazadores poliméricos comprenden cualquier polímero conocido en la técnica, incluido el polietilenglicol ("PEG"). En algunas formas de realización, el enlazador es un péptido que tiene una longitud de 1,2,3,4, 5,6,7, 8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17,18, 19, 20 o más aminoácidos. En una forma de realización específica, el enlazador es lo suficientemente largo para preservar la capacidad de IL-15 para unirse a IL-15Ra. En otras formas de realización, el enlazador es lo suficientemente largo para preservar la capacidad del complejo IL-15/IL-15Ra para unirse al complejo del receptor $\beta\gamma$ y actuar como un agonista para mediar en la transducción de señales de IL-15.

En la presente, se describen agentes terapéuticos que comprenden complejos de IL-15/IL-15Ra para usar en los métodos descritos en el presente documento. En formas de realización particulares, los complejos de IL-15/IL-15Ra se acoplan previamente antes de su uso en los métodos descritos en este documento (por ejemplo, antes de poner en contacto las células con los complejos de IL-15/IL-15Ra o antes de administrar los complejos de IL-15/IL-15Ra a un sujeto). En otras formas de realización, los complejos de IL-15/IL-15Ra no están acoplados previamente antes de su uso en los métodos descritos en este documento. En formas de realización específicas, el complejo de IL-15/IL-15Ra se administra en combinación con una composición de vacuna para potenciar la respuesta inmune provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto. En una forma de realización específica, un agente terapéutico agonista que comprende IL-15 e IL-15Ra directamente fusionados entre sí se administra en combinación con una composición de vacuna para mejorar una respuesta inmune provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto

5.1.2. Ácidos nucleicos

En este documento se describen agentes terapéuticos que son ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra. Los ácidos nucleicos codifican IL-15 e IL-15Ra que son capaces de unirse covalente o no covalentemente entre sí para formar los complejos de IL-15/IL-15Ra descritos en la Sección 5.1.1, supra. Dichos complejos de IL-15/IL-15Ra pueden unirse al complejo del receptor $\beta\gamma$ e inducir la transducción de señales mediada por IL-15.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa son bien conocidas en la técnica y han sido descritas; para una revisión, ver, Fehniger y Caligiuri, Blood, 2001, 97:14-32. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa se pueden encontrar fácilmente en publicaciones y bases de datos disponibles al público, por ejemplo, el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica en ncbi.nlm.nih.gov. Se han descrito las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el IL-15Ra nativa, por ejemplo, ver la publicación internacional N.º WO 95/30695, y también se pueden encontrar fácilmente en publicaciones y bases de datos disponibles al público, por ejemplo, en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica en ncbi.nlm.nih.gov. Se pueden usar técnicas de clonación bien conocidas en la técnica para generar ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1995); Sambrook et al., Molecular

Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989); Birren et al., Genome Analysis: A Laboratory Manual, volúmenes 1 a 4, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1997–1999).

5 En una forma de realización, el agente terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican el IL-15Ra nativo. En otra forma de realización, el agente terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es una forma soluble de IL-15Ra nativo. En una forma de realización específica, el agente terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es una forma soluble de IL-15Ra que carece del dominio transmembrana de IL-15Ra nativo, y opcionalmente el dominio intracelular de IL-15Ra nativo. En otras formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es el dominio extracelular de IL-15Ra nativo o un fragmento del mismo. En determinadas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio de sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio de sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y al menos un aminoácido que está codificado por el exón 3. En determinadas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio de sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y una región bisagra de IL-15Ra o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que consiste esencialmente en el dominio sushi o el exón 2 del receptor. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican un polipéptido quimérico que comprende IL-15 e IL-15Ra directamente fusionados entre sí. En otra forma de realización, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende una mutación en el sitio de escisión del dominio extracelular que inhibe la escisión por una proteasa endógena que escinde el IL-15Ra. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende mutaciones (en el sitio de escisión del dominio extracelular) que inhiben la escisión por una proteasa endógena. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican un derivado de IL-15Ra, en donde un sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza con un dominio heterólogo (por ejemplo, dominio transmembrana heterólogo) o una secuencia de aminoácidos sintética que no permite la escisión y generación de IL-15Ra soluble. En determinadas formas de realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que se escinde por una enzima de procesamiento endógeno se muta para inhibir la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En una forma de realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza con un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo (por ejemplo, el dominio transmembrana heterólogo que se reconoce y se escinde por otra enzima no relacionada con la enzima de procesamiento endógeno que escinde el IL-15Ra).

35 En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra que están optimizados, por ejemplo, por optimización de codón/ARN, reemplazo con secuencias de señal heterólogas y eliminación de elementos de inestabilidad de ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican IL-15 e IL-15Ra para la expresión mediante la introducción de cambios en el codón y/o la eliminación de las regiones inhibitorias en el ARNm pueden llevarse a cabo adaptando los métodos de optimización descritos, por ejemplo, en las patentes U. S. Nros. 5.965.726, 6.174.666, 6.291.664, 6.414.132 y 6.794.498, para IL-15 e IL-15Ra. Ver también la solicitud provisional U. S. N.º 60/812.566, presentada el 9 de junio de 2006 y 60/758.819, presentada el 13 de enero de 2007 y la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2007/084342. Por ejemplo, los sitios de empalme y los elementos de inestabilidad potenciales (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U)

- dentro del ARN de IL-15 e IL-15Ra pueden mutarse sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos para aumentar la estabilidad del ARN para la expresión. Las alteraciones utilizan la degeneración del código genético, por ejemplo, utilizando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas formas de realización, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservadora, por ejemplo, un aminoácido similar con estructura y propiedades químicas similares y/o funcionar como el aminoácido original. Tales métodos pueden aumentar la expresión de las proteínas IL-15 y/o IL-15Ra al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces o más en relación con la expresión de las proteínas de IL-15 y/o IL-15Ra codificadas por secuencias de ácidos nucleicos nativas.
- Además, la secuencia peptídica de señal nativa de IL-15 y/o IL-15Ra puede reemplazarse con un péptido señal heterólogo, por ejemplo, un péptido señal de GM-CSF humano (ver Figuras 8A-D), activador de plasminógeno tisular (tPA) (ver Figuras 5A-D), preprolactina, hormona del crecimiento o una proteína de inmunoglobulina (por ejemplo, IgE). En una forma de realización específica, el péptido señal de IL-15 se reemplaza con la secuencia señal de tPA. En otras formas de realización específicas, el péptido señal de IL-15 se reemplaza con el péptido señal de GM-CSF humano.
- Dichas alternancias pueden aumentar la expresión de las proteínas/polipéptidos de IL-15 y/o IL-15Ra al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces o más en relación con la expresión de las proteínas de IL-15 y/o IL-15Ra con el péptido señal nativo respectivo, según lo medido/detectado por una técnica conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, ELISA.
- En algunas formas de realización, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra se hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 nativa o IL-15Ra, respectivamente. En formas de realización específicas, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con una secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 nativa o IL-15Ra, respectivamente, o uno de sus fragmentos. En una forma de realización específica, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra se hibrida en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, de rigurosidad intermedia o inferior a una secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 nativa o IL-15Ra, respectivamente, o uno de sus fragmentos. Se describió la información sobre las condiciones de hibridación, ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2005/0048549 (por ejemplo, los párrafos 72-73).
- En el presente documento se describen ácidos nucleicos que codifican IL-15, IL-15Ra y una molécula heteróloga en una forma que permite que IL-15 se una covalente o no covalentemente a IL-15Ra para formar los complejos de IL-15/IL-15Ra. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar. Los ejemplos no limitativos de tales antígenos incluyen los enumerados anteriormente en la Sección 5.1.1. En otras formas de realización, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o manejar. Los ejemplos no limitativos de dichos anticuerpos incluyen los enumerados anteriormente en la Sección 5.1.1 y los conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno de superficie celular (por ejemplo, un receptor) expresado por una célula a la que uno desea dirigirse. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. Los ejemplos no limitativos de tales moléculas incluyen polietilenglicol (PEG), dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento de la misma, o albúmina que aumenta la vida media de IL-15 o IL-15Ra in vivo. En determinadas formas de realización, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

En aquellos complejos IL-15/IL-15Ra que comprenden una molécula heteróloga, la molécula heteróloga puede

conjugarse con IL-15 y/o IL-15Ra. En una forma de realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15Ra. En otra forma de realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15.

5 En formas de realización específicas, IL-15 e IL-15Ra están codificados por un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, constructo bicistrónico). En algunas formas de realización, IL-15 e IL-15Ra están codificados por un constructo de ácido nucleico que comprende un solo marco de lectura abierto (ORF) de IL-15 e IL-15Ra. En algunas formas de realización, IL-15 o IL-15Ra codificados por un constructo de ácido nucleico puede conjugarse con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés. En otras formas de realización, IL-15 e IL-15Ra están codificados por dos constructos de ácido nucleico, en donde un primer constructo de ácido nucleico codifica la IL-15 y un segundo constructo de ácido nucleico codifica IL-15Ra. La IL-15 codificada por el primer constructo de ácido nucleico puede conjugarse con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés. Alternativa o adicionalmente, el IL-15Ra codificado por el segundo constructo de ácido nucleico puede conjugarse con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés

15

5.1.2.1 Constructos

20 Los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra pueden insertarse en constructos de ácido nucleico para la expresión en células de mamíferos, bacterias, levaduras y virus. IL-15 e IL-15Ra se pueden expresar de forma recombinante desde el mismo constructo de ácido nucleico (por ejemplo, usando un constructo de ácido nucleico bicistrónico) o desde diferentes constructos de ácido nucleico (por ejemplo, usando constructos de ácido nucleico monocistrónico). En una forma de realización, IL-15 e IL-15Ra se pueden expresar de forma recombinante a partir de un único constructo de ácido nucleico que comprende un solo marco de lectura abierto (ORF) de IL-15 e IL-15Ra.

25 Los constructos de ácido nucleico pueden comprender uno o más elementos reguladores de la transcripción unidos operativamente a la secuencia de codificación de IL-15 y/o IL-15Ra. Los elementos reguladores de la transcripción están normalmente 5' de la secuencia de codificación y dirigen la transcripción de los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra. En algunas formas de realización, uno o más de los elementos reguladores de la transcripción que se encuentran en la naturaleza para regular la transcripción del gen de IL-15 nativa y/o de IL-15Ra nativo se usan para controlar la transcripción. En otras formas de realización, uno o más elementos reguladores de la transcripción que son heterólogos del gen de IL-15 nativa y/o de IL-15Ra nativo se usan para controlar la transcripción. Puede usarse cualquier elemento regulador transcripcional conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitativos de los tipos de elementos reguladores de la transcripción incluyen un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido y un promotor inducible. En una forma de realización específica, la transcripción está controlada, al menos en parte, por un elemento regulador de la transcripción de mamífero (en algunas formas de realización, de humano). En una forma de realización específica, la transcripción está controlada, al menos en parte, por un promotor fuerte, por ejemplo, CMV.

40 Los ejemplos específicos de promotores que pueden usarse para controlar la transcripción incluyen, pero sin limitación, la región del promotor temprano de SV40 (Bemoist & Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), el promotor contenido en repetición del terminal largo 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787-797), el promotor del herpes timidina quinasa (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42); adenovirus (ADV), citomegalovirus (CMV), virus del papiloma bovino (BPV), promotor B19p6 de parovirus, vectores de expresión procarióticos como el promotor de lactamasa β (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 80: 21–25); ver también “Useful proteins from recombinant bacteria” in Scientific American, 1980, 242: 74–94; vectores de expresión de plantas que comprenden la región promotora de la nopalina sintetasa (Herrera–Estrella et al., Nature 303: 209–213) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9: 2871) y el promotor de la enzima fotosintética ribosa bifosfato carboxilasa (Herrera–Estrella et al., 1984, Nature 310: 115–120); elementos promotores de la levadura u otros hongos como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcional de los animales, que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38: 639–646; Omitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399–409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425–515); la región de control del gen de la insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315: 115–122), la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en las células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647–658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533–538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436–1444), región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45: 485–495), región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268–276), región de control del gen de la alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639–1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53–58; región de control del gen alfa 1–antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161–171), la región de control del gen de la beta–globina que es activa en las células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338–340; Kollias et al., 1986, Cell. 46: 89–94; región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en las células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703–712); la región de control del gen de la cadena ligera–2 de la miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314: 283–286), y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234: 1372–1378). En otros aspectos, se puede usar un promotor inducible.

Los constructos de ácido nucleico también pueden comprender uno o más elementos reguladores postranscripcionales operativamente unidos a la secuencia de codificación de IL–15 y/o IL–15Ra. Los elementos reguladores postranscripcionales pueden estar 5' y/o 3' de la secuencia de codificación y dirigir la regulación postranscripcional de la traducción de transcritos de ARN que codifican IL–15 y/o IL–15Ra.

En otro aspecto, el constructo de ácido nucleico puede ser un vector de direccionamiento génico que reemplaza la región reguladora existente de un gen con una secuencia reguladora aislada de un gen diferente o una secuencia reguladora novedosa como se describe, por ejemplo, en la publicación internacional N.º WO 94/12650 y WO 01/68882.

El constructo de ácido nucleico elegido dependerá de una variedad de factores que incluyen, sin limitación, la fuerza de los elementos reguladores de la transcripción y la célula huésped que se usará para expresar IL–15 y/o IL–15Ra. Los constructos de ácido nucleico pueden ser un plásmido, fagémido, cósmido, vector viral, fago, cromosoma artificial, y similares. En un aspecto, los vectores pueden ser vectores episomales o integradores homóloga/no homológamente, que pueden introducirse en las células huésped apropiadas por cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.) para transformarlos.

Los constructos de ácido nucleico pueden ser un plásmido o un vector de integración estable para la expresión transitoria o estable de IL–15 y/o IL–15Ra en células huésped. Para una expresión estable, el vector puede mediar la integración cromosómica en un sitio objetivo o en un sitio cromosómico aleatorio. Los ejemplos no limitativos de sistemas de vectores

de células huésped que pueden usarse para expresar IL-15 y/o IL-15Ra incluyen sistemas de células de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus de la vacuna, adenovirus, retrovirus, lentivirus, etc.); sistemas celulares de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido o ADN cósmido; y líneas celulares estables generadas por transformación usando un marcador seleccionable. En algunas formas de realización, los constructos de ácido nucleico incluyen un gen marcador seleccionable que incluye, entre otros, neo, gpt, dhfr, ada, pac, hyg, CAD y hisD.

Los constructos de ácido nucleico pueden ser monocistrónicos o multicistrónicos. Un constructo de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2,3,4,5,6,7,8,9,10 o más, o en el rango de 2-5,5-10 o 10-20 genes/secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico bicistrónico puede comprender en el siguiente orden un promotor, un primer gen (por ejemplo, IL-15) y un segundo gen (por ejemplo, IL-15Ra). En tal constructo de ácido nucleico, la transcripción de ambos genes es impulsada por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen es por un mecanismo de escaneo dependiente de la tapa y la traducción del ARNm del segundo gen es por un mecanismo independiente de la tapa, por ejemplo, por un IRES.

Las técnicas para practicar aspectos de esta invención emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y manipulación y producción de ADN recombinante, que son practicadas rutinariamente por un experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*; DNA Cloning, Volumes I and II (Glover, Ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, Ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames & Higgins, Eds. 1984); *Transcription and Translation* (Hames & Higgins, Eds. 1984); *Animal Cell Culture* (Freshney, Ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos, Eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155* (Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectively), (Mayer & Walker, Eds., 1987); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London, Scopes, 1987), *Expression of Proteins in Mammalian Cells Using Vaccinia Viral Vectors in Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2* (Ausubel *et al.*, Eds., 1991).

El constructo de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra puede administrarse in vivo a un mamífero o transfectarse en células primarias o inmortalizadas en cultivo. En ciertos aspectos, los constructos de ácido nucleico que comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se administran a un mamífero para la expresión recombinante de IL-15 e IL-15Ra in vivo para mejorar la transducción de señales mediada por IL-15 y para mejorar una función inmune asociada con la señalización de IL-15 in vivo. En otros aspectos, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se administran en combinación con una composición de vacuna para mejorar la respuesta inmune provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto.

Los constructos de ácido nucleico que comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se pueden usar para generar células que expresan IL-15 e IL-15Ra para mejorar una función inmune en un sujeto. En particular, tales células pueden transpresentar el complejo IL-15/IL-15Ra en la superficie celular a células adyacentes que expresan el complejo del receptor $\beta\gamma$, induciendo así la transducción de señal de IL-15. En algunas formas de realización, las células son células primarias (por ejemplo, células tumorales aisladas de un paciente). En otras formas de realización, las células son líneas celulares de mamífero.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se pueden usar para generar células de mamíferos

que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades para el aislamiento y purificación de IL-15 e IL-15Ra, preferentemente IL-15 e IL-15Ra están asociados como complejos. En una forma de realización, altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados por células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o más de 20 veces más que las cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (por ejemplo, células que no han sido diseñadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). En una forma de realización específica, el IL-15Ra es la forma soluble de IL-15Ra. En una forma de realización específica, el IL-15Ra es la forma soluble de IL-15Ra asociada con IL-15 en un heterodímero estable, que aumenta los rendimientos y simplifica la producción y purificación del heterodímero bioactivo de IL-15/citoquina de IL-15Ra soluble. La IL-15 recombinante y el IL-15Ra se pueden purificar usando métodos de producción de proteínas recombinantes y la purificación es bien conocida en la técnica, por ejemplo, ver la publicación internacional número WO 07/070488.

Brevemente, el polipéptido puede producirse en forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. El lisado celular o sobrenadante que comprende el polipéptido se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad. También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™ (sustancia de filtración en gel; Pharmacia Inc., Piscataway, New Jersey), cromatografía en un anión o también se dispone de resina de intercambio catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio,

En algunas formas de realización, IL-15 e IL-15Ra se sintetizan o se expresan de forma recombinante por diferentes células y posteriormente se aíslan y combinan para formar un complejo de IL-15/IL-15Ra, in vitro, antes de la administración a un sujeto. En otras formas de realización, la IL-15 y el IL-15Ra se sintetizan o se expresan en forma recombinante por diferentes células y posteriormente se aísla y se administra simultáneamente a un sujeto un complejo de IL-15/IL-15Ra in situ o in vivo. En otras formas de realización más, IL-15 e IL-15Ra se sintetizan o se expresan juntas por la misma célula, y se aísla el complejo IL-15/IL-15Ra formado.

5.1.3 Anticuerpos

En el presente documento, se describen anticuerpos que se unen específicamente a los complejos de IL-15/IL-15Ra, anticuerpos que se unen específicamente al complejo formado cuando IL-15 e IL-15Ra se unen entre sí o anticuerpos que se unen específicamente al complejo formado entre IL-15 e IL-15Ra y evitan o reducen la transducción de señales mediada por IL-15. Dichos anticuerpos pueden bloquear (estérica o no estéricamente) la unión del complejo de IL-15 e IL-15Ra con el complejo del receptor $\beta\gamma$ (o CD122/CD132) del receptor de IL-15. En una forma de realización específica, el anticuerpo reduce la unión del complejo de IL-15/IL-15Ra al complejo $\beta\gamma$ al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces con respecto a un control negativo (por ejemplo, afinidad de unión del complejo de IL-15/IL-15Ra al complejo del receptor $\beta\gamma$ en ausencia del anticuerpo) según lo determinado por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, ensayos a base de células que incluyen citometría de flujo, ensayo KinEx A y ensayo de resonancia de superficie plasmónica (por ejemplo, ensayo BIAcore).

Los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de IL-15/IL-15Ra pueden producirse por cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes U. S. Nros. 5.807.715, 6.331.415 y 6.818.216; las publicaciones de solicitud de patente U. S. Nros. US 2002/0098189, US 2004/0028685, US 2005/0019330 y US 2007/0086943; publicación internacional N.º WO 02/46237; y Harlow et al., *Antibodies. A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981).

Los anticuerpos que se unen específicamente a los complejos de IL-15/IL-15Ra se pueden administrar a un sujeto para evitar que los complejos de IL-15/IL-15Ra se unan al complejo del receptor $\beta\gamma$ que induzcan la transducción de señales mediada por IL-15. Por lo tanto, tales anticuerpos pueden suprimir una función inmune que está asociada con la transducción de señales de IL-15. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para detectar la presencia de complejos de IL-15/IL-15Ra.

5.1.4. Células

Las células pueden diseñarse para expresar las proteínas codificadas por los constructos de ácido nucleico descritos en la Sección 5.1.2, supra, en altas cantidades. En una forma de realización, altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresadas por células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces más que las cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (por ejemplo, células que no han sido modificadas genéticamente para expresar en forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). Además, las células pueden manipularse para expresar los anticuerpos descritos en la Sección 5.1.3, supra, utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica; ver, por ejemplo, las patentes U. S. Nros. 5.807.715, 6.331.415 y 6.818.216; publicaciones de solicitud de patente U. S. Nros. US 2002/0098189, US 2004/0028685, US 2005/0019330 y US 2007/0086943; publicación internacional N.º WO 02/46237; y Harlow et al, *Antibodies. A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Las células huésped elegidas para la expresión de ácidos nucleicos dependerán del uso previsto de las células. Se pueden considerar factores como si una célula se glicosilara de manera similar a células que expresan endógenamente, por ejemplo, IL-15 y/o IL-15Ra, al seleccionar las células huésped.

En una forma de realización, la invención también proporciona un método para aumentar el rendimiento y la bioactividad de IL-15 mediante la construcción de líneas celulares que expresan tanto IL-15 como IL-15Ra soluble, y la purificación del heterodímero estable, que se puede usar in vitro o in vivo, por ejemplo, se puede administrar a un ser humano. En una forma de realización, la estabilidad de IL-15 aumenta cuando se produce a partir de líneas celulares que expresan de manera recombinante tanto IL-15 como IL-15Ra.

Los ejemplos no limitativos de células huésped que se pueden usar para expresar la proteína o las proteínas codificadas por los constructos de ácido nucleico descritos en la Sección 5.1.2, supra, o los anticuerpos descritos en la Sección 5.1.3, supra, incluyen células de mamíferos, células bacterianas, células de levadura, células primarias, células inmortalizadas y células de insectos. En una forma de realización específica, las células huésped son una línea celular de mamífero. Los ejemplos de líneas celulares de mamíferos incluyen, pero sin limitación, células COS, CHO, HeLa, NIH3T3, HepG2, MCF7, HEK, 293T, RD, PC12, hibridomas, células pre-B, 293,293H, K562, SkBr3, BT474, A204, M07Sb, TF β 1, Raji, Jurkat, MOLT-4, CTLL-2, MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SY5Y, C127, NO y BE(2)-C. Otras líneas

5 celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC). En otra forma de realización, las células huésped son líneas celulares inmortalizadas derivadas de un sujeto. En otra forma de realización, las células huésped son células primarias o secundarias de un sujeto. En una forma de realización, las células huésped son células cancerosas. En otra forma de realización, las células huésped son células epiteliales o células endoteliales. En otra forma de realización, las células huésped son células fetales/embrionarias. En algunas formas de realización, las células huésped son células progenitoras. En algunas formas de realización, las células huésped son linfocitos (por ejemplo, células T y células B). En otra forma de realización, las células huésped son células madre. En otra forma de realización, las células huésped diseñadas para expresar los constructos de ácido nucleico de la Sección 5.1.2, supra, son de un adulto.

10 En algunas formas de realización, las células aisladas se utilizan en este documento. En una forma de realización específica, las células aisladas están al menos en un 80%, 90%, 95% o 98% libres de un tipo de célula diferente como se mide mediante una técnica conocida por un experto en la técnica, tal como citometría de flujo. En otras palabras, al menos el 80%, 90%, 95% o 98% de las células aisladas son del mismo tipo de célula.

15 En una forma de realización específica, los constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 o IL-15Ra pueden cotransfectarse conjuntamente o transfectarse en las mismas células huésped o diferentes células huésped. Opcionalmente, un constructo de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican un gen marcador seleccionable también puede transfectarse en las mismas células para seleccionar células transfectadas. Si los constructos de ácido nucleico que comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra se transfectan en diferentes células, IL-15 e IL-15Ra expresados por las diferentes células pueden aislarse y ponerse en contacto entre sí en condiciones adecuadas para formar complejos de IL-15/IL-15Ra descritos en la Sección 5.1.1, supra. Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica se puede usar para transfectar o transducir células huésped con ácidos nucleicos que incluyen, por ejemplo, transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa e infección con virus, incluyendo, pero sin limitación, adenovirus, lentivirus y retrovirus.

20 Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de polipéptidos de IL-15 e IL-15Ra recombinantes, se pueden generar líneas celulares estables. Por ejemplo, las líneas celulares pueden transformarse utilizando los constructos de ácido nucleico de la Sección 5.1.2 que pueden contener un gen marcador seleccionable en el mismo constructo de ácido nucleico o en un constructo de ácido nucleico separado. El gen marcador seleccionable puede introducirse en la misma célula mediante cotransfección. Luego de la introducción del vector, las células pueden crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar a medios selectivos para permitir el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito los ácidos nucleicos introducidos. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos bien conocidas en el arte que son apropiadas para el tipo de célula. En una forma de realización particular, la línea celular se ha adaptado para crecer en medio sin suero. En una forma de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en medio sin suero en matraces de agitación. En una forma de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en matraces de agitación o giratorios. En determinadas formas de realización, la línea celular se cultiva en suspensión. En formas de realización particulares, la línea celular no es adherente o se ha adaptado para crecer como células no adherentes. En determinadas formas de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en condiciones de bajo calcio. En algunas formas de realización, la línea celular se cultiva o se adapta para crecer en medio de bajo suero.

En una forma de realización específica, la célula huésped expresa de manera recombinante IL-15 humana y la forma soluble de IL-15Ra humano. En algunas formas de realización, la célula huésped que expresa de forma recombinante IL-15 y/o IL-15Ra (de longitud completa o forma soluble) también expresa de forma recombinante otro polipéptido (por ejemplo, una citoquina o un fragmento de la misma).

5

En una forma de realización específica, un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante es mediante el uso de la amplificación de dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente crecientes de metotrexato como se describe en la patente U. S.N.° 4.889.803. El polipéptido obtenido de tales células puede estar en forma glicosilada.

10

En una forma de realización específica, los constructos de ácido nucleico son adecuados para la introducción y expresión en células primarias aisladas de un sujeto. Las células primarias están diseñadas para expresar IL-15 e IL-15Ra. En una forma de realización particular, el IL-15Ra contiene una mutación que eliminó el sitio de escisión del dominio extracelular o que reemplaza el sitio de escisión del dominio extracelular nativo con un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo. Cuando se administran a un sujeto, tales células pueden transpresentar el complejo de IL-15/IL-15Ra a células adyacentes in vivo, mediando así la transducción de señales de IL-15 y mejorando la función del sistema inmune mediada por la señalización de IL-15. En otra forma de realización específica, las células primarias expresan IL-15 y la forma soluble de IL-15Ra.

15

20

En el presente documento se describen células primarias que son células de cáncer: (i) aisladas de un sujeto (diagnosticado con cáncer); (ii) diseñadas para expresar de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra (de longitud completa o forma soluble) o ambos; y (iii) irradiadas antes de la administración a un paciente con cáncer para mejorar una respuesta inmune en el sujeto a antígenos de las células cancerosas. En una forma de realización específica, las células primarias aisladas de un sujeto están diseñadas para expresar de forma recombinante otro polipéptido terapéutico, por ejemplo, una citoquina (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, TNF- α , GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ), un factor de crecimiento o un fragmento o derivado del mismo. En una forma de realización específica, las células primarias aisladas de un sujeto se diseñan adicionalmente para expresar de forma recombinante un antígeno de un cáncer. En una forma de realización, las células irradiadas se pueden administrar al mismo sujeto o a un sujeto diferente del que se obtuvieron las células. En una forma de realización particular, las células primarias se aíslan de un tumor del sujeto. En una forma de realización, las células de una línea de células cancerosas pueden manipularse para que expresen de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra o ambos, en donde las células se irradian antes de la administración a un sujeto.

25

30

35

40

En este documento, se describen métodos para fabricar células descritas en el presente documento. Aquí se describe un método para producir células cancerosas irradiadas que expresan conjuntamente IL-15 e IL-15Ra y comprenden las etapas de: (i) aislar células cancerosas de un sujeto (diagnosticado con cáncer); (ii) diseñar dichas células cancerosas para que expresen de forma recombinante IL-15, o IL-15Ra (de longitud completa o forma soluble), o ambos; y (iii) irradiar dichas células cancerosas. En este documento se describe un método para producir células cancerosas irradiadas que expresan conjuntamente IL-15 e IL-15Ra, que comprenden las etapas de: (i) aislar células cancerosas de un sujeto (diagnosticado con cáncer); (ii) introducir uno o más constructos de ácido nucleico que codifican la IL-15 recombinante o un derivado del mismo y el IL-15Ra humano o un derivado del mismo; y (iii) irradiar dichas células cancerosas. En formas de realización particulares, las células cancerosas irradiadas se administran al sujeto a partir del cual las células cancerosas se aislaron (u obtuvieron).

5 En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para fabricar células huésped capaces de crecer en medio sin suero que comprende las etapas de: (i) diseñar células huésped para expresar de forma recombinante IL-15 y/o IL-15Ra (forma soluble), (ii) cultivar las células huésped en un medio que comprende una proporción 1:1 de medio viejo (que comprende 10% de suero) a medio nuevo; y (iii) repetir la etapa (ii) hasta que las células huésped crezcan a una tasa de crecimiento deseada, en donde el nuevo medio está libre de suero, y donde la tasa de crecimiento deseada es la tasa de crecimiento en que las células huésped crecen cuando se cultivan en medio que comprende 10% de suero.

10 En algunas formas de realización, la presente invención abarca una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma y un IL-15Ra humano o un derivado del mismo, en donde la célula expresa al menos 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, o 2 µg de IL-15 humana o un derivado de la misma. En determinadas formas de realización, la célula expresa al menos 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, o 2 µg de IL-15 humana o un derivado de la misma. En algunas formas de realización, la célula expresa aproximadamente 0,1 µg a 0,6 µg, 0,5 µg a 1 µg, 0,5 µg a 2 µg, o 0,1 µg a 2 µg de IL-15 humana o un derivado de la misma. En formas de realización particulares, la célula expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma que es más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto la IL-15 humana como el IL-15Ra. En formas de realización específicas, la estabilidad de la proteína de la IL-15 humana recombinante producida por dicha célula es de al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto la IL-15 humana como IL-15Ra, medida por una técnica conocida por un experto en el arte, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC). En algunas formas de realización, la IL-15 humana o su derivado es estable a 32 °C o 37 °C durante 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días, 14 días, 1 mes, 2 meses o más. En formas de realización particulares, la célula expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma que se degrada a una velocidad más lenta que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto la IL-15 humana como IL-15Ra. En formas de realización específicas, la tasa de degradación de la proteína de la IL-15 humana recombinante (in vitro o in vivo) producida por dicha célula es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces más pequeña que la tasa de degradación de proteínas de la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto la IL-15 humana como el IL-15Ra según se mide por una técnica conocida por un experto en el arte, por ejemplo, ELISA, western blot o HPSEC.

30 En algunas formas de realización, la presente invención abarca una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma y un IL-15Ra humano o un derivado del mismo, en donde la célula crece en medios libres de suero. En determinadas formas de realización, la célula expresa al menos 0,6 pg de IL-15 humana o un derivado de la misma. En determinadas formas de realización, la célula expresa al menos 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg o 2 µg de IL-15 humana o un derivado de la misma. En algunas formas de realización, la célula expresa aproximadamente 0,1 µg a 0,6 µg, 0,5 µg a 1 µg, 0,5 µg a 2 µg, o 0,1 µg a 2 µg de IL-15 humana o un derivado del mismo.

40 En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a una población de células que expresan de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma y un IL-15Ra humano o un derivado del mismo, en donde la población de células expresa al menos 600 ng/millón de células de la IL-15 humana o un derivado de la misma. En formas de realización específicas, la población de células expresa al menos 150 ng/millón de células por día de células de IL-15 humana o un derivado de la misma. En algunas formas de realización, la población de células expresa al menos 50 ng/millón de células por día, 100 ng/millón de células por día, 200 ng/millón de células por día, 250 ng/millón de células por día, o 300 ng/millón de células por día de IL-15 humana o un derivado de la misma. En formas de realización particulares, la población de células expresa aproximadamente 50 ng/millón de células por día a 200 ng/millón de células por día, 100

5 ng/millón de células por día a 250 ng/millón de células por día, o 50 ng/millón de células por día a 300 ng/millón de células por día células de IL-15 humana o un derivado de la misma. En determinadas formas de realización, la población de células expresa aproximadamente 100 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, 500 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, 500 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células, o 100 ng/de millones de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 humana o un derivado de la misma.

10 En formas de realización particulares, la población de células expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma que es más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto IL-15 humana como IL-15Ra. En formas de realización específicas, la estabilidad de la proteína de la IL-15 humana recombinante producida por tal población de células es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces más estable que la IL-15 endógena producida por una población de células que no expresan de forma recombinante tanto la IL-15 humana como IL-15Ra, según lo determinado por una técnica conocida por un experto en el arte, por ejemplo, cromatografía por exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). En algunas formas de realización, la IL-15 humana o su derivado es estable a 32 °C o 37 °C durante 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días, 14 días, 1 mes, 2 meses o más. En formas de realización particulares, la población de células expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma que se degrada a una velocidad más lenta que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante tanto la IL-15 humana como IL-15Ra. En formas de realización específicas, la tasa de degradación de proteínas de la IL-15 humana recombinante (in vitro o in vivo) producida por dicha población de células es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces más pequeño que la tasa de degradación de proteínas de la IL-15 endógena producida por una población de células que no expresan de forma recombinante tanto IL-15 humana como IL-15Ra según lo medido por una técnica conocida por un experto en el arte, por ejemplo, ELISA, western blot o HPSEC.

25 En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a una población de células que expresa de forma recombinante una IL-15 humana o un derivado de la misma y un IL-15Ra humano o un derivado del mismo, en donde la población de células crece en medios sin suero. En formas de realización particulares, la población de células expresa al menos 600 ng/millón de células de la IL-15 humana o un derivado de la misma. En formas de realización específicas, la población de células expresa al menos 150 ng/millón de células por día de células de IL-15 humana o un derivado de la misma. En algunas formas de realización, la población de células expresa al menos 50 ng/millón de células por día, 100 ng/millón de células por día, 200 ng/millón de células por día, 250 ng/millón de células por día, o 300 ng/millón de células por día de IL-15 humana o un derivado de la misma. En formas de realización particulares, la población de células expresa aproximadamente 50 ng/millón de células por día a 200 ng/millón de células por día, 100 ng/millón de células por día a 250 ng/millón de células por día, o 50 ng/millón de células por día a 300 ng/millón de células por día de células de IL-15 humana o un derivado de la misma. En determinadas formas de realización, la población de células expresa aproximadamente 100 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, 500 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, 500 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células, o 100 ng/millones de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 humana o un derivado de la misma.

40 5.2. Polímeros

En el presente documento se describe cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la Sección 5.1 para ser formulados con cualquier polímero natural adecuado para uso biomédico, incluyendo poli-β-1→4-N-acetilglucosamina ("p-GlcNAc"). p-GlcNAc se puede encontrar en quitina y quitosano derivados de fuentes de mariscos, hongos o

microalgas. Como se describe en este documento, la p-GlcNAc se purifica como se describe en las publicaciones de solicitud de patente U. S. Nos. US 2004/0220140 y US 2001/0055807 y las patentes U. S. Nros. 5.622.834, 5.623.064, 5.624.679, 5.686.115, 5.858.350, 6.599.720, 6.686.342 y 7.115.588, en una forma de realización específica, el polímero está en forma de fibras. Sin embargo, pueden usarse otras formas, tales como polvo.

5

Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polímeros a base de celulosa, xantano, poliaramidas, poliamidas, poliimidazoles, poliamidas/imidas, poliamidahidrazidas, polihidrazidas, poliimidazoles, polibenzoxazoles, poliésteres/amidas, poliéster/imidas, policarbonato/amidas, policarbonato/imidas, polisulfona/amidas, polisulfona/imidas, y similares, copolímeros y mezclas de los mismos. Otras clases adecuadas de polímeros que pueden usarse incluyen fluoruros de polivinilideno y poliacrilonitrilos. Los ejemplos de estos polímeros incluyen los descritos en las patentes U. S. Nros. 4.705.540, 4.717.393, 4.717.394, 4.912.197, 4.838.900, 4.935.490, 4.851.505, 4.880.442, 4.863.496 y 4.961.539; y la solicitud de patente europea N.º 0 219 878. Los polímeros pueden incluir al menos uno de cualquiera de los polímeros a base de celulosa, poliamidas, poliamidas, poliamidas/imidas o poliimidazoles. En determinadas formas de realización, los polímeros incluyen poliaramidas, poliéster, uretano y politetrafluoroetileno.

10

15

En algunas formas de realización, se usa N-acetilglucosamina polimerizada o derivados de la misma. En una forma de realización preferida, el polímero es poli-N-acetilglucosamina o un derivado de la misma. En determinadas formas de realización, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración β 1 \rightarrow 4. En otras formas de realización, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración α 1 \rightarrow 4.

20

En formas de realización específicas, el polímero es quitina, quitosano, celulosa, nylon o PET (tereftalato de polietileno).

En otras formas de realización específicas, el polímero es biocompatible y/o biodegradable. La biocompatibilidad se puede determinar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos tales como la prueba de elución, la implantación intramuscular o la inyección intracutánea o sistémica en animales. Dichas pruebas se describen en la patente U. S. N.º 6.686.342, o pruebas equivalentes según lo establecido en las guías ISO-10993. Los polímeros biodegradables se degradan con preferencia en aproximadamente 1 día, 2 días, 5 días, 8 días, 12 días, 17 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días o 100 días después la administración o la implantación en un paciente.

25

30

En ciertos aspectos de la divulgación, el polímero es inmunoneutro.

En una forma de realización, los agentes terapéuticos o las composiciones de los mismos se formulan con polímeros purificados, que pueden ser aproximadamente el 100%, 99,9%, 99,8%, 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% o 20% de pureza. En una forma de realización específica, los polímeros utilizados para formular los agentes terapéuticos o composiciones de los mismos son 90-100% puros.

35

En determinadas formas de realización, el polímero que se usa para formular el agente terapéutico no es uno o más de los siguientes: un hidrogel iónico sintético tal como, entre otros, poli(ácido AAn-acrílico) reticulado y poli(AAm-metacrilato de dimetilaminoetil), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), poli(N-vinilpirrolidona), poli(metoxi-metacrilato de PEG). En determinadas formas de realización, el polímero no es uno o más de: un poli-L-aminoácido, tal como poli-L-lisina, poli-L-arginina, poli-ácido L-glutámico, poli-L-histidina, poli-ácido D-glutámico o una mezcla de los mismos. En determinadas formas de realización, el polímero no es uno o más de: un polímero de alginato, tal como alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de estroncio, alginato de bario, alginato de magnesio o cualquier otro

40

alginato o una mezcla de los mismos. En determinadas formas de realización, el polímero no se deriva de uno o más de: un marisco, un crustáceo, insecto, hongos y/o levaduras. En determinadas formas de realización, los polímeros no comprenden fibras de colágeno. En determinadas formas de realización, los polímeros no comprenden fibras de elastina. En determinadas formas de realización, los polímeros no comprenden el polímero de bloque de poloxámero 407. En determinadas formas de realización, los polímeros no comprenden matrices poliméricas no degradables. En determinadas formas de realización, los polímeros no comprenden matrices poliméricas degradables. En otras formas de realización, cualquiera de los polímeros mencionados anteriormente se incluye en los agentes terapéuticos o composiciones de los mismos. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el polímero que se usa para formular un agente terapéutico es uno o más de los siguientes: un hidrogel iónico sintético como, por ejemplo, poli(AAn-ácido acrílico) reticulado y poli(AAm-metacrilato de dimetilaminoetilo), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(N-vinilpirrolidona), poli(metoxi-metacrilato de PEG). En determinadas formas de realización, el polímero no es uno o más de: un poli-L-aminoácido, tal como poli-L-lisina, poli-L-arginina, poli-ácido L-glutámico, poli-L-histidina, poli-ácido D-glutámico o una mezcla de los mismos. En determinadas formas de realización, el polímero es uno o más de: un polímero de alginato, tal como alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de estroncio, alginato de bario, alginato de magnesio o cualquier otro alginato o una mezcla de los mismos. En determinadas formas de realización, el polímero se deriva de uno o más de: un marisco, un crustáceo, insecto, hongos y/o levaduras. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden fibras de colágeno. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden fibras de elastina. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden el polímero de bloque de poloxámero 407. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden matrices poliméricas no degradables. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden matrices poliméricas degradables.

Los polímeros pueden estar en forma de fibras. Las fibras pueden tener un grosor y/o diámetro de aproximadamente 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,54, 0,50, 0,55, 0,60 o 0,65 micrones, según lo determinado por microscopia electrónica. En formas de realización preferidas, las fibras tienen un ancho de aproximadamente 0,50 micrones y una longitud de un rango de aproximadamente 20 a 100 micrones, según se determina mediante microscopia electrónica, en particular, microscopia electrónica de barrido. En otras formas de realización preferidas, las fibras tienen un ancho de aproximadamente 0,50 micrones y un intervalo de longitud de aproximadamente 50 a 100 micrones, según se determina mediante microscopia electrónica, en particular, microscopia electrónica de barrido. En aún otras formas de realización preferidas, las fibras tienen un ancho de aproximadamente 0,50 micrones y un intervalo de longitud de aproximadamente 75 a 100 micrones según se determina mediante microscopia electrónica, particularmente, microscopia electrónica de barrido.

En determinadas formas de realización, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de un agente terapéutico está formulado con uno o más de los polímeros enumerados anteriormente.

En una forma de realización, los agentes terapéuticos comprenden más de un tipo de polímero (por ejemplo, poli-β-1→4-N-acetilglucosamina y celulosa).

5.2.1 Poli-β-1→4-N-Acetilglucosamina

Un polímero preferido para uso en combinación con un agente terapéutico es poli-N-acetilglucosamina o un derivado de la misma.

Como se usa en la presente, la poli-N-acetilglucosamina incluye cualquier polímero de N-acetilglucosamina y/o glucosamina unidos covalentemente en una β-1→4 o una conformación α-1→4 y en cualquier grado o forma de

5 cristalinidad. En formas de realización específicas, la poli-N-acetilglucosamina es (1) una forma semicristalina de poli-N-acetilglucosamina; (2) una poli-N-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons; (3) una poli- β -1 \rightarrow 4-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 50000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons; (4) una poli- β -1 \rightarrow 4-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 10000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons; (5) una poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 4000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10000 daltons a aproximadamente 800000 daltons; y (6) contrapartidas desacetiladas de (1)-(5) anteriores en las que el grado de desacetilación varía del 1% al 99%. En formas de realización específicas, el grado de desacetilación es de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90%.

20 Los derivados, tales como derivados químicos, de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina también se pueden usar para formular los agentes terapéuticos. Por ejemplo, se pueden usar derivados de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina sulfatados, poli- β -1 \rightarrow 4 N-derivados de acetilglucosamina nitrados o poli- β -1 \rightarrow 4 N-derivados de acetilglucosamina nitrados. Además, una o más de las unidades de monosacáridos de la poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina pueden contener uno o más grupos sulfonilo, uno o más grupos O-acilo. Además, uno o más de los monosacáridos de la poli- β -1 \rightarrow 4-acetilglucosamina desacetilada pueden contener un grupo N-acilo. Uno o más de los monosacáridos de la poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina o de su derivado desacetilado, pueden contener un grupo O-alquilo. Una o más de las unidades de monosacáridos de la poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina pueden ser un derivado alcalino. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina pueden contener un grupo N-alquilo. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina pueden contener al menos un derivado desoxihalógeno. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina puede formar una sal. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina puede formar un quelato metálico. Preferentemente, el metal es zinc. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli- β -1 \rightarrow 4 N-acetilglucosamina pueden contener una N-alquilideno o un grupo N-arilideno. Los métodos para elaborar dichos derivados se describen en la patente U. S. N.º 5.623.064.

35 En formas de realización específicas, la poli-N-acetilglucosamina se obtiene mediante un proceso que comprende a) tratar una microalga que comprende un cuerpo celular y una fibra de poli-N-acetilglucosamina con un agente biológico (como el ácido hidrofúrico) capaz de separar la fibra de N-acetilglucosamina del cuerpo celular durante un tiempo suficiente para que la fibra de poli-N-acetilglucosamina se libere del cuerpo celular; b) segregar la fibra de poli-N-acetilglucosamina del cuerpo celular; y c) eliminar los contaminantes de la fibra de poli-N-acetilglucosamina segregada. Las descripciones detalladas de la preparación de poli-N-acetilglucosamina de acuerdo con dichos métodos se describen en las publicaciones de solicitud de patente U. S. Nros. 2004/0220140 y US 2001/055807, y las patentes U. S. Nros. 5.622.834, 5.623.064, 5.624.679, 5.686.115, 5.858.350, 6.599.720, 6.686.342 y 7.115.588.

Como fuente alternativa de p-GlcNAc de microalgas, se puede usar p-GlcNAc purificada a partir de quitina o quitosano de crustáceo o fúngico para formular un agente terapéutico.

Opcionalmente, la p-GlcNAc se usa en forma de fibra, por ejemplo, como se describe anteriormente.

5.3. Composiciones

5

En el presente documento se describen composiciones que comprenden los agentes terapéuticos, que incluyen agentes terapéuticos agonistas y agentes terapéuticos antagonistas. Las composiciones incluyen composiciones de medicamentos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que se pueden usar en la preparación de las formas de dosificación unitarias. Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos y un portador farmacéuticamente aceptable. En formas de realización específicas, las composiciones comprenden una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición comprende además un agente terapéutico adicional, por ejemplo, agente anticáncer, agente antiviral, agente antiinflamatorio, adyuvante. Los ejemplos no limitativos de tales terapias se proporcionan en la Sección 5.4.5, infra.

10

15

20

25

30

En una forma de realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto) o, más preferentemente, adyuvante MF59C.1 disponible en Chiron, Emeryville, CA), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En una forma de realización, el agua es un portador cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

5.3.1 Formulaciones con polímeros

35

En el presente documento, se describen composiciones (y composiciones farmacéuticas) que comprenden un agente terapéutico que se formulan con un polímero, tal como se describe en la Sección 5.2, supra. En el presente documento se describen diversas formulaciones que comprenden un agente terapéutico y un polímero.

40

Los polímeros pueden formularse en forma de gel, sólido, líquido, esponja, espuma, spray, emulsión, suspensión, solución, esterilla, cuerda, gasa, sutura, perla, microesfera o microfibrilla.

En formas de realización específicas, los polímeros se formulan como barreras, membranas o películas. Alternativamente, los polímeros se agregan a las barreras, membranas o películas. Se puede suministrar una barrera, membrana o película en una variedad de tamaños estándar, que pueden cortarse y dimensionarse aún más para el área que se está tratando.

Alternativamente, el polímero puede formularse como una barrera, membrana o película hecha de cuerdas, microperlas, microesferas o microfibrillas, o la composición puede formularse como una estera de formación de barrera. Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes terapéuticos y polímeros pueden incluir un portador farmacéuticamente aceptable, un líquido neutro, un gel neutro o un sólido neutro.

5

Además, al variar la proporción de los componentes en dichas matrices biodegradables, las propiedades de manejo quirúrgico de la matriz celular pueden ajustarse en un rango desde una matriz dimensionalmente estable, a una consistencia similar a una masilla moldeable a un gel flexible o suspensión, en polvo o en un fluido inyectable.

10

En formas de realización específicas, el polímero se formula como un gel. El gel puede ser de viscosidad variable. Para diversas formas de realización, se desea un gel con una baja viscosidad. Para los geles inyectables, puede desearse una mayor viscosidad si se pretende que los agentes terapéuticos o las composiciones de los mismos permanezcan en una ubicación del cuerpo en lugar de disiparse rápidamente. La viscosidad es la cantidad que describe la resistencia de un fluido al flujo medida en centipoise (cP), mientras que el rango de viscosidad es un continuo. Por ejemplo, como marco de referencia, no como una limitación del significado de viscosidad, los valores de viscosidad de alrededor de 1–4 cP generalmente están tipificados por composiciones fluidas. Los valores de viscosidad de alrededor de 5 a 14 cP generalmente están tipificados por composiciones similares a geles, mientras que los valores de viscosidad de 15 a 20 cP son composiciones relativamente duras como los plásticos. La viscosidad del citoplasma celular es de aproximadamente 11 cP. La viscosidad se puede medir con, por ejemplo, un Saybolt International B.V. (Vlaardingen, Países Bajos). Un experto en la técnica también puede usar otras técnicas de medición y dispositivos comunes en la técnica.

15

20

En otras formas de realización, el polímero se formula como una esponja. Cuando el polímero es una esponja, puede transferirse una cantidad predeterminada de una suspensión celular sobre una matriz de esponja, y la suspensión celular puede ser absorbida. Los agentes terapéuticos que comprenden células que expresan IL–15 e IL–15Ra en altas cantidades pueden formularse con polímeros que normalmente comprenden una matriz de fibra polimérica con células asociadas en toda la matriz. Esto permite que un mayor número de células interactúe con las fibras y la matriz puede absorber grandes cantidades de células. En una forma de realización, altas cantidades de complejos de IL–15/IL–15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL–15/IL–15Ra expresadas por células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces más que las cantidades de complejos de IL–15/IL–15Ra expresados de forma endógena por células de control (por ejemplo, células que no han sido modificadas genéticamente para expresar recombinantemente IL–15, IL–15Ra, o tanto IL–15 como IL–15Ra, o células que comprenden un vector vacío).

25

30

En determinadas formas de realización, el polímero se formula como una membrana. Las membranas pueden ser porosas o relativamente continuas. En algunas formas de realización, las membranas están hechas de fibras poliméricas tejidas que se han combinado con agentes terapéuticos que comprenden células que expresan IL–15 e IL–15Ra. En formas de realización específicas, dichas membranas son particularmente útiles para el suministro sobre la superficie de la piel, la superficie de los órganos internos o la superficie del revestimiento de las cavidades corporales.

35

40

En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos que comprenden células que expresan IL–15 de forma recombinante y otro agente terapéutico (por ejemplo, una citoquina, por ejemplo, IL–12 o IL–15, o un receptor soluble, por ejemplo, IL–15Ra soluble) son formulados con un polímero, por ejemplo, un polímero descrito en la Sección 5.2, supra. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos que comprenden células que expresan IL–15Ra de manera recombinante y otro agente terapéutico (por ejemplo, una citoquina, por ejemplo, IL–12 o IL–15) se formulan con un

5 polímero, por ejemplo, un polímero descrito en la Sección 5.2, supra. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden células que expresan de manera recombinante (i) IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra, y (ii) otro polipéptido terapéutico (por ejemplo, una citoquina, por ejemplo, IL-12, IL-6, o GM-CSF), están formulados con un polímero, por ejemplo, un polímero descrito en la Sección 5.2, supra. En una forma de realización particular, las células se irradian. En una forma de realización específica, las células son células cancerosas irradiadas diseñadas para expresar de forma recombinante IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra.

10 En determinadas formas de realización, el número de células es al menos aproximadamente 100,200,300,400, 500, 700,1000, 5000, 10000,25000, 50000 o 100000 células. En formas de realización específicas, el número de células es de al menos aproximadamente 100, 200, 300,400 o 500 células. En otras formas de realización, el número de células es al menos aproximadamente 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900,1000,2000, 3000, 4000 o 5000 células. En otras formas de realización específicas, el número de células es de al menos aproximadamente 700,1000, 5000, 10000,15000 o 20000 células. En algunas formas de realización, el número de células es de al menos aproximadamente 5000,10000,25000, 50000,75000 o 100000 células. En otra forma de realización más, el número de células es al menos aproximadamente 50000,100000,200000,300000, 400000 o 500000 células. En otras formas de realización, el número de células es de al menos aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por mg de fibra de polímero. En otras formas de realización, el número de células es de al menos aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 o 1×10^7 o más células por mg de fibra de polímero. En algunas formas de realización, el número de células es al menos 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o más células por mg de fibra de polímero. En otras formas de realización, el número de células es al menos 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por mg de fibra de polímero. En algunas formas de realización, el número de células es menor que 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , o 5×10^8 .

5.3.2. Formulaciones sin polímeros

25 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse de cualquier manera convencional usando uno o más optadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 En general, los componentes de las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes terapéuticos se suministran por separado o se mezclan en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o sachet que indica la cantidad de agente activo. Cuando el agente terapéutico se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril (por ejemplo, PBS). Cuando el agente terapéutico se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

35 En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos pueden formularse para su administración por cualquier método conocido por un experto en la técnica, que incluye, entre otros, administración por inhalación, insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz), oral, intradérmica, transdérmica, intraparenteral, intratumoral y en mucosa (como bucal, vaginal, rectal, sublingual).

40 En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos se formulan para administración parenteral local o sistémica. En una forma de realización, los agentes terapéuticos se formulan en una solución farmacéuticamente compatible.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes terapéuticos que son polipéptidos o ácidos nucleicos pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona) o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno–fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil– o propil–p–hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según corresponda. Las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para dar una liberación controlada del agente terapéutico o composiciones del mismo. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los agentes terapéuticos se administran convenientemente en forma de una presentación de spray en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

Los agentes terapéuticos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los agentes terapéuticos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los agentes terapéuticos también pueden formularse para la implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

En una forma de realización específica, la formulación y administración de diversos agentes quimioterapéuticos, biológicos / inmunoterapéuticos y hormonales para usar en combinación con agentes terapéuticos se conocen en la técnica y se describen en *Physician's Desk Reference*, 61ª ed. (2007). En algunas formas de realización, los agentes

5 terapéuticos se formulan con otras terapias, como las que se describen en la Sección 5.4 a continuación. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos que comprenden células cancerosas irradiadas que expresan de forma recombinante IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos que comprenden células que expresan recombinantemente (i) IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) otro polipéptido terapéutico (por ejemplo, una citoquina, por ejemplo, IL-12, IL-6 o GM-CSF), se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos comprenden células cancerosas irradiadas que expresan de manera recombinante (i) IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) otro polipéptido terapéutico (por ejemplo, una citoquina, por ejemplo, IL-12, IL-6 o GM-CSF), se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, una combinación de (!) agentes terapéuticos que son células que expresan IL-15, o IL-15Ra o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más terapias, por ejemplo, una citoquina (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF); se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, una combinación de (i) agentes terapéuticos que son células cancerosas irradiadas que expresan IL-15, o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más terapias, por ejemplo, una citoquina (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF); se formulan como composiciones farmacéuticas.

5.4. Métodos profilácticos/terapéuticos

20 5.4.1. Mejora de la función inmune

En el presente documento, se describen métodos para mejorar la función inmune mediada por IL-15 en un sujeto, que comprenden administrar un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto que lo necesite. En una forma de realización específica, en el presente documento se describen métodos para prevenir, tratar y/o manejar enfermedades en las que es deseable mejorar la función inmune, que comprenden administrar un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista para un sujeto que lo necesite. En formas de realización específicas, los agentes terapéuticos agonistas están formulados con polímeros descritos en la Sección 5.2, supra. En otras formas de realización específicas, el método comprende una terapia de combinación, en donde el agente terapéutico agonista se administra a un sujeto en combinación con otra terapia, como las que se describen a continuación, para mejorar la función inmune mediada por IL-15. En una forma de realización particular, el agente terapéutico agonista se administra en combinación con una composición de vacuna para inducir o mejorar la respuesta inmune provocada por la composición de vacuna. Los ejemplos no limitativos de enfermedades que pueden prevenirse o tratarse mediante una mejora de la función inmune incluyen, pero sin limitación, el cáncer y las enfermedades infecciosas. A continuación se describen varios tipos de cáncer y enfermedades infecciosas. En una forma de realización específica, un agente terapéutico agonista descrito en el presente documento se puede usar para tratar o manejar una afección asociada con el cáncer o una afección resultante de la administración de una terapia contra el cáncer (como, por ejemplo, quimioterapia o radiación). En otra forma de realización, se administra un agente terapéutico agonista a un paciente diagnosticado con cáncer para aumentar la proliferación y/o la función efectora de una o más poblaciones de células inmunes en el paciente.

40 En una forma de realización específica, un agente terapéutico agonista mejora o induce la función inmune en un sujeto al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% en relación con la función inmune en un sujeto que no se

administró el agente terapéutico agonista usando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISPOT, ELISA y ensayos de proliferación celular. En una forma de realización específica, la función inmune es la liberación de citoquinas (por ejemplo, interferón- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-12 o factor de crecimiento transformante (TGF)- β). En una forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la proliferación de células NK, que puede analizarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (por ejemplo, CD56). En otra forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la producción de anticuerpos, que se puede evaluar, por ejemplo, mediante ELISA. En algunas formas de realización, la función inmune mediada por IL-15 es una función efectora, que se puede evaluar, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad u otros ensayos bien conocidos en la técnica.

En formas de realización específicas, los ejemplos no limitativos de la función inmune mejorada por el agente terapéutico agonista son la proliferación/expansión de linfocitos (por ejemplo, aumento en el número de linfocitos), inhibición de la apoptosis de linfocitos, activación de células dendríticas (o células que presentan antígeno), y presentación de antígenos. En formas de realización particulares, una función inmune mejorada por el agente terapéutico agonista es la proliferación/expansión en el número o activación de células T CD4+ (por ejemplo, células T helper Th1 y Th2), células T CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T natural killer (células NKT), células T residentes en tumores, células T CD122+ o células natural killer (células NK). En una forma de realización, el agente terapéutico agonista potencia la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista aumenta el número de células T CD4+ (por ejemplo, células T helper Th1 y Th2), células T CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T natural killer (células NKT), células T residentes en tumores, células T CD122+ o células natural killer (células NK) por aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o más en relación al control negativo (por ejemplo, número de células respectivas no tratadas, cultivadas o en contacto con un agente terapéutico agonista).

5.4.1.1 Cáncer

En este documento se describe un método para prevenir, tratar y/o manejar el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto que lo necesite. En formas de realización específicas, los agentes terapéuticos agonistas están formulados con polímeros descritos en la Sección 5.2, supra.

El efecto de un agente terapéutico agonista sobre la proliferación de células cancerosas se puede detectar mediante ensayos de rutina, como los que miden la captación de timidina radiomarcada. Alternativamente, la viabilidad celular se puede medir mediante ensayos que miden la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular o por la liberación de [^{51}Cr] tras la lisis celular. En una forma de realización, la necrosis se mide por la capacidad o incapacidad de una célula para captar un colorante como el rojo neutro, el azul tripano o el azul ALAMARTM (Page et al., 1993, *Int. J. of Oncology* 3: 473 476). En tal ensayo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente.

En otra forma de realización, el colorante es la sulforodamina B (SRB), cuya unión a proteínas se puede usar como una medida de la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:110712). En otra forma de realización más, una sal de tetrazolio, como el MTT, se usa en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamíferos al detectar células vivas, pero no muertas (ver, por ejemplo, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

En otras formas de realización, las células apoptóticas se miden en los compartimentos tanto unidos como "flotantes" de los cultivos. Ambos compartimentos se recogen mediante la eliminación del sobrenadante, la tripsinización de las células unidas y la combinación de ambas preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (10 minutos, 2000 rpm). El protocolo para tratar cultivos de células tumorales con sulindac y compuestos relacionados para obtener una cantidad significativa de apoptosis se ha descrito en la literatura (ver, por ejemplo, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16). Las características de este método incluyen la recolección de células tanto flotantes como unidas, la identificación de los tiempos óptimos de tratamiento y el rango de dosis para observar la apoptosis, y la identificación de las condiciones óptimas de cultivo celular.

En otra forma de realización, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación del ADN. Se dispone de métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa in vitro de la fragmentación del ADN. Ejemplos de tales ensayos, incluidos TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

En otra forma de realización más, la apoptosis se puede observar morfológicamente.

Las líneas celulares de cáncer en las que se pueden realizar tales ensayos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ensayos de apoptosis, necrosis y proliferación también se pueden realizar en células primarias, por ejemplo, un explante de tejido.

En una forma de realización específica, la proliferación o viabilidad de las células cancerosas en contacto con un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista se inhibe o reduce al menos 2 veces, preferentemente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces en relación con la proliferación de las células cancerosas cuando se ponen en contacto con un control negativo como se mide utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación celular utilizando CSFE, BrdU incorporación de ³H-timidina. En otra forma de realización, la proliferación de células cancerosas en contacto con un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista se inhibe o reduce en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% en relación con las células cancerosas se pusieron en contacto con un control negativo según se mide usando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación celular que utilizan CSFE, BrdU e incorporación de ³H-timidina, o los ensayos descritos anteriormente. En un aspecto, la composición que comprende un agente terapéutico agonista comprende además células (por ejemplo, células NK o células T citotóxicas) que responden a la señalización de IL-15 y que pueden dirigir y ejercer efectos citotóxicos en las células cancerosas.

En una forma de realización específica, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, un modelo animal para cáncer) inhibe o reduce el crecimiento de un tumor al menos 2 veces, preferentemente al menos 2,5 veces, al menos

3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces con respecto al crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, en el mismo modelo animal para el cáncer) se administró un control negativo según se midió usando ensayos bien conocidos en la técnica. En otra forma de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, un modelo animal para el cáncer) inhibe o reduce el crecimiento de un tumor en al menos un 25%, en al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% en relación con el crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, en el mismo modelo animal para el cáncer) se administró un control negativo según lo medido usando ensayos bien conocidos en la técnica.

En una forma de realización específica, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, un modelo animal para cáncer) reduce el tamaño de un tumor al menos 2 veces, preferentemente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces o al menos 10 veces en relación con el crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, el mismo modelo animal para el cáncer) administrado con un control negativo como se midió usando ensayos bien conocidos en la técnica. En otra forma de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto con (en algunas formas de realización, un modelo animal para cáncer) reduce el tamaño de un tumor en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% en relación con el crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, el mismo modelo animal para el cáncer) administrado con un control negativo según lo medido mediante ensayos bien conocidos en la técnica. En una forma de realización específica, el cáncer es melanoma, cáncer renal, cáncer de colon o cáncer de próstata.

Además, un agente terapéutico agonista que es útil en el tratamiento o manejo del cáncer es una línea de células tumorales (o cáncer) irradiadas o células tumorales (o cáncer) irradiadas que expresan de forma recombinante los complejos de IL-15/IL-15Ra. Dichos agentes terapéuticos agonistas pueden prepararse mediante un método que comprende transducir o transfectar células tumorales primarias o líneas de células tumorales con constructos de expresión para IL-15 e IL-15Ra, y luego de la expresión de las proteínas IL-15 e IL-15Ra, irradiando las células tumorales. En una forma de realización, la forma de irradiación es radiación γ . IL-15 e IL-15Ra pueden expresarse a partir del mismo constructo o constructos diferentes, y bajo el control del mismo promotor o diferentes promotores. Los constructos de expresión de IL-15 e IL-15Ra pueden introducirse en células tumorales (o cancerosas) por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, como el uso de un vector viral o un vector de expresión de mamíferos. Alternativamente, la IL-15 nativa y el IL-15Ra nativo de las células tumorales (o cancerosas) pueden activarse usando métodos de activación de genes. Posteriormente, las células tumorales (o cancerosas) irradiadas que expresan de manera recombinante los complejos de IL-15/IL-15Ra se administran a un paciente con cáncer para inducir y/o mejorar una respuesta inmune a las células cancerosas o a los antígenos cancerosos de las células cancerosas. En una forma de realización específica, la respuesta inmune aumentada o inducida es un aumento de la producción de anticuerpos contra las células cancerosas o contra los antígenos cancerosos de las células cancerosas en el paciente con cáncer. En otra forma de realización, la respuesta inmune inducida o mejorada es un aumento en la función de las células efectoras, por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células cancerosas en el paciente. En algunas formas de realización, la respuesta inmune inducida o aumentada es un aumento en el número de linfocitos, la

proliferación de linfocitos y/o la actividad de linfocitos.

Un agente terapéutico agonista puede administrarse en combinación con una o más terapias diferentes, por ejemplo, agentes anticancerígenos, citoquinas o agentes antihormonales, para tratar y/o manejar el cáncer. Los ejemplos no limitativos de los agentes contra el cáncer se describen en la Sección 5.4.5.1 a continuación. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona un efecto terapéutico aditivo en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico agonista solo o la otra o más terapias solas. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona más que un efecto terapéutico aditivo en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico agonista solo o la otra o más terapias solas. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona un efecto terapéutico sinérgico en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico agonista solo o la otra o más terapias solas.

En una forma de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, citoquinas/factores de crecimiento, por ejemplo, interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, 11-15, TNF- α , TNF- β , TGF- β , GM-CSF e interferón- γ . En una forma de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, receptores, anticuerpos u otros agentes de unión que se unen a citoquinas/factores de crecimiento, por ejemplo, interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, TNF- α , TNF- β , TGF- β , GM-CSF, interferón- α , interferón- β e interferón- γ . En algunas formas de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (o polipéptidos), por ejemplo, una citoquina, un factor de crecimiento, una quimioquina, o un fragmento o derivado de la misma. En una forma de realización particular, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, células que expresan de forma recombinante IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α . En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan IL-12 de forma recombinante. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan IL-6 de forma recombinante. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante GM-CSF. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante TNF- α . En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas. En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas irradiadas. En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas irradiadas obtenidas de un paciente. En una forma de realización, las células expresan de forma recombinante una o más proteínas terapéuticas (polipéptidos). En una forma de realización, es posible una combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias, en donde el agente terapéutico agonista comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en el que la o más terapias comprenden una o más citoquinas exógenas (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α). En una forma de realización, en el presente documento se describe una combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias diferentes, en la que el agente terapéutico agonista comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en la que la otra o más terapias comprenden (i) polipéptido de IL-15 exógeno o polipéptido de IL-15Ra exógeno, y (ii) una o más citoquinas exógenas (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α). En una forma de realización, un agente terapéutico agonista comprende células diseñadas para expresar de manera recombinante (i) IL-15, IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más citoquinas/factores de crecimiento.

Un agente terapéutico agonista también puede administrarse en combinación con radioterapia que comprende, por ejemplo, el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En formas de

realización específicas, el tratamiento de radiación se administra como radiación de haz externo o teleterapia en la que la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras formas de realización, el tratamiento de radiación se administra como terapia interna o braquiterapia en la que se coloca una fuente radiactiva dentro del cuerpo cerca de células cancerosas o una masa tumoral. En un aspecto, el agente terapéutico agonista puede mejorar la función inmune del paciente con cáncer con un sistema inmune comprometido debido a la terapia contra el cáncer. Un agente terapéutico agonista también se puede administrar en combinación con quimioterapia. En una forma de realización, se puede usar un agente terapéutico agonista antes, durante o después de la radioterapia o la quimioterapia. En una forma de realización, un agente terapéutico agonista se puede usar antes, durante o después de la cirugía. En una forma de realización, la presente invención proporciona una combinación de trasplante y un agente terapéutico agonista.

Los ejemplos no limitativos de agentes antihormonales son agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como los antiestrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, venazol AROMASIN®, formestanie, fadrozol, RIVISOR®, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX®D anastrozol; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELX® rmRH; Vinorelbina y esperamicinas (ver patente U. S. N.º 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden prevenirse, tratarse o manejarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los siguientes: leucemias que incluyen, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero sin limitación, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas como, entre otros, la enfermedad de Hodgkin y la enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo, como sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma del hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcoma de tejido blando, sarcoma de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de tejido suave, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales que incluyen, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, que incluye, pero sin limitación,

feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero sin limitación, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, que incluye, pero sin limitación, insulino-
 5 ma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor que secreta la somatostatina y tumor de células carcinoideas o islotes; cánceres hipofisarios que incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares que incluyen, pero sin limitación, melanoma ocular, como melanoma del iris, melanoma corioideo y melanoma del cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales, que incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, que incluye, entre otros, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cérvix incluyendo, entre otros, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos
 10 que incluyen, pero sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario que incluyen, pero sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos que incluyen, pero sin limitación, cánceres escamosos, adenocarcinoma, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoscamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago que incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma, hongos (polipoides), ulcerantes, diseminación superficial, propagación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado que incluyen, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar que incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen, pero sin limitación, papilares, nodulares y difusos; cánceres de pulmón que incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células
 15 escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares que incluyen, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor en la yema del saco); cánceres de próstata que incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales que incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales que incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide cístico; cánceres de faringe que incluyen, pero sin limitación, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel que incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, y melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno de lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen, pero sin limitación, cáncer de células renales, cáncer de
 20 riñón, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma y cáncer de células de transición (pelvis renal y/o útero); tumor de Wilms; cánceres de vejiga que incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma y carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma linfático, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una reseña, ver Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy *et al.*, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

En una forma de realización, el cáncer es benigno, por ejemplo, pólipos y lesiones benignas. En otras formas de
 40 realización, el cáncer es metastásico. Los agentes terapéuticos agonistas se pueden usar en el tratamiento de enfermedades premalignas y malignas. Las afecciones premalignas incluyen hiperplasia, metaplasia y displasia. El tratamiento de enfermedades malignas incluye el tratamiento de tumores primarios y metastásicos. En una forma de realización específica, el cáncer es melanoma, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a un sujeto que padece o al que se le diagnostica cáncer.

En otras formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación se administran a un sujeto predispuesto o susceptible de desarrollar cáncer.

5 En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias combinadas se administran a un sujeto que vive en una región donde hay una alta tasa de aparición de cáncer. En una forma de realización específica, el cáncer se caracteriza por un tumor premaligno o un tumor maligno.

10 En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un mamífero que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 años a 10 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años edad, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años.

15 En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un humano con riesgo de desarrollar cáncer. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un humano con cáncer.

20 En determinadas formas de realización, el paciente es un ser humano de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 a 10 años, de 5 a 12 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años de 13 a 19 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 20 a 65 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 60 años, de 95 años o de 95 a 100 años.

25 En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un bebé humano o un bebé prematuro humano. En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un niño humano.

30 En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un adulto humano. En otras formas de realización más, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un humano anciano.

35 En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a una mascota, por ejemplo, un perro o un gato. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un animal de granja o ganado, por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, pollos, etc.

40 En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un primate, preferentemente un humano u otro mamífero, como un cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunodeprimido o inmunodeprimido o en riesgo de ser inmunocomprometido o inmunodeprimido. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que recibe o se recupera de una terapia inmunosupresora.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista o una terapia de combinación se administra a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer sida, una infección viral o una infección bacteriana. En determinadas formas de realización, un sujeto que es, será o ha sido sometido a cirugía,

quimioterapia y/o radioterapia. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que vive en un hogar de ancianos, un hogar grupal (es decir, un hogar para 10 o más sujetos) o una prisión.

5 En algunas formas de realización, a un paciente se le administra un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación es antes de que se desarrolle cualquier efecto adverso o intolerancia a terapias distintas a los agentes terapéuticos agonistas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a pacientes refractarios. En una determinada forma de realización, el paciente refractario es
10 un paciente refractario a una terapia anticancerosa estándar. En determinadas formas de realización, un paciente con cáncer es refractario a una terapia cuando el cáncer no se ha erradicado significativamente y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede hacer in vivo o in vitro por cualquier método conocido en la técnica para evaluar la efectividad de un tratamiento, utilizando los significados aceptados en la técnica de "refractario" en ese contexto. En diversas formas de realización, un paciente con cáncer es refractario cuando
15 un tumor canceroso no ha disminuido o ha aumentado.

En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, las composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o las terapias de combinación se administran a un paciente para prevenir la aparición o recurrencia del cáncer en un paciente con riesgo de desarrollar dicho cáncer. En algunas formas de realización, los agentes
20 terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a un paciente que es susceptible a reacciones adversas a las terapias convencionales.

En algunas formas de realización, uno o más agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación se administran a un paciente que ha demostrado ser refractario a otras
25 terapias distintas de los agentes terapéuticos agonistas, pero ya no están en estas terapias. En determinadas formas de realización, los pacientes que se tratan o tratan de acuerdo con los métodos descritos en este documento son pacientes que ya están siendo tratados con antibióticos, agentes anticancerosos u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes se encuentran pacientes refractarios, pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales y pacientes con infecciones virales recurrentes a pesar del control o tratamiento con terapias existentes.

30 En algunas formas de realización, al sujeto que se le administran uno o más agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación no ha recibido una terapia antes de la administración de agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación. En otras formas de realización, se administran uno o más agentes terapéuticos
35 agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación. En algunas formas de realización, el sujeto administró un agente terapéutico agonista o una composición que comprendía un agente terapéutico agonista fue refractario a una terapia anterior o experimentó efectos secundarios adversos a la terapia anterior o la terapia anterior se
40 suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad para el sujeto.

5.4.1.2. Enfermedades infecciosas

En el presente documento, se describe un método para tratar, prevenir y/o manejar una enfermedad infecciosa en un

sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto que lo necesite.

5 En una forma de realización particular, los agentes terapéuticos agonistas son células infectadas con un patógeno, en donde las células están diseñadas para expresar IL-15 e IL-15Ra como se describe en la Sección 5.1.1, se irradian y se administran a un paciente para inducir y/o mejorar una respuesta inmune a las células infectadas o a antígenos del patógeno. En una forma de realización, el patógeno es un patógeno intracelular, por ejemplo, bacterias o virus intracelulares. En una forma de realización específica, la respuesta inmune aumentada o inducida es un aumento de la producción en el paciente de anticuerpos contra las células infectadas o contra los antígenos del patógeno. En una forma de realización, la forma de irradiación es radiación γ . IL-15 e IL-15Ra pueden expresarse a partir del mismo constructo o constructos diferentes, y bajo el control del mismo promotor o diferentes promotores. Los constructos de expresión de IL-15 e IL-15Ra pueden introducirse en células infectadas con un patógeno por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, como el uso de un vector viral o un vector de expresión en mamíferos. Alternativamente, la IL-15 nativa y el IL-15Ra nativo de las células infectadas con un patógeno pueden activarse usando métodos de activación de genes. Posteriormente, las células irradiadas infectadas con un patógeno que expresan de manera recombinante los complejos de IL-15/IL-15Ra se administran a un sujeto para inducir y/o potenciar una respuesta inmune al patógeno oa antígenos del patógeno. En una forma de realización específica, la respuesta inmune inducida o mejorada es un aumento en la producción de anticuerpos contra el patógeno. En otra forma de realización, la respuesta inmune inducida o mejorada es un aumento en la función de las células efectoras, por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra el patógeno y/o las células infectadas con un patógeno en el paciente. En algunas formas de realización, la respuesta inmune inducida o aumentada es un aumento en el número de linfocitos, la proliferación de linfocitos y/o la actividad de linfocitos. En otra forma de realización, la respuesta inmune inducida o mejorada es un aumento en la función de las células efectoras, por ejemplo, células citotóxicas o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células infectadas en el paciente.

25 En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista puede administrarse en combinación con una o más terapias diferentes. En las secciones 5.4.5.2 y 5.4.5.3 se describen ejemplos no limitativos de otras terapias que pueden usarse en combinación con agentes terapéuticos agonistas. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona un efecto terapéutico aditivo en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico agonista solo o la otra o más terapias solas. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona más que un efecto terapéutico aditivo en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico agonista solo o la otra o más terapias solas. En una forma de realización, la combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias adicionales proporciona un efecto terapéutico sinérgico en relación con los efectos terapéuticos del agente terapéutico Agonista solo o la otra o más terapias solas.

30 En una forma de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, citoquinas/factores de crecimiento, por ejemplo, interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF- α , TNF- β , TGF- β , GM-CSF e interferón- γ . En una forma de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, receptores, anticuerpos u otros agentes de unión que se unen a citoquinas/factores de crecimiento, por ejemplo, interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, TNF- α , TNF- β , TGF- β , GM-CSF, interferón- α , interferón- β e interferón- γ . En algunas formas de realización, la una o más terapias incluyen, pero sin limitación, células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (o polipéptidos), por ejemplo, una citoquina, un factor de crecimiento, una quimioquina, o un fragmento o derivado de la misma. En una forma de realización particular, la una o más terapias

incluyen, pero sin limitación, células que expresan de forma recombinante IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α . En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan IL-12 de forma recombinante. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan IL-6 de forma recombinante. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante GM-CSF. En una forma de realización, la una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante TNF- α . En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células infectadas con un agente patógeno o infeccioso. En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células irradiadas infectadas con un patógeno o agente infeccioso. En una forma de realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) someten a células irradiadas a la infección con un agente patógeno o infeccioso obtenido de un paciente. En una forma de realización, las células expresan de forma recombinante una o más proteínas terapéuticas (polipéptidos). En una forma de realización, es posible una combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias diferentes, en donde el agente terapéutico agonista comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en la que la otra o más terapias comprenden una o más terapias exógenas citoquinas (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α). En una forma de realización, es posible una combinación de un agente terapéutico agonista y una o más terapias diferentes, en donde el agente terapéutico agonista comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y donde la otra o más terapias comprenden (i) polipéptido de IL-15 exógeno o polipéptido de IL-15Ra exógeno, y (ii) una o más citoquinas exógenas (por ejemplo, IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- α , interferón- β , interferón- γ o TNF- α). En una forma de realización, un agente terapéutico agonista comprende células diseñadas para expresar de manera recombinante (i) IL-15, IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más citoquinas/factores de crecimiento.

Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas, prevenidas y/o manejadas por agonistas, los agentes terapéuticos son causados por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitación, bacterias, hongos, protozos y virus.

Las enfermedades virales que pueden prevenirse, tratarse y/o manejarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincicial respiratorio, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, virus del equinovirus, arbovirus, virus del coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, viruela pequeña, virus de Epstein-Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de inmunodeficiencia humana del tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades virales como la meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas causadas por bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecialis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*) que se pueden prevenir, tratar y/o manejar de forma adecuada. Los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, micobacterias rickettsia, micoplasma, neisseria, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (ántrax), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, pertissus, cholera, clamidia, *S. aureus* y legionella.

Las enfermedades por protozoos causadas por protozoos que pueden prevenirse, tratarse y/o manejarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

Las enfermedades parasitarias causadas por parásitos que pueden prevenirse, tratarse y/o manejarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, clamidia y rickettsia.

5 En determinadas formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% con respecto a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en el presente documento u otros conocidos por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o 2 a 5 veces, 2 a 10 veces, 5 a 10 veces, o 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en el presente documento u otros conocidos por un experto en la técnica. En otras formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso en 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más en relación con un control negativo según lo determinado utilizando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por los expertos en la técnica.

En determinadas formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% relativo a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en el presente documento u otros conocidos por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o 2 a 5 veces, 2 a 10 veces, 5 a 10 veces, o 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determine utilizando un ensayo descrito en el presente documento u otros conocidos por un experto en la técnica. En otras formas de realización, la administración de un agente terapéutico agonista o una composición que comprende un agente terapéutico agonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso en 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más en relación con un control negativo según se determine utilizando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por los expertos en la técnica.

40 En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a un sujeto que padece una enfermedad infecciosa causada por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitación, bacterias, hongos, protozoos y virus. En otras formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a un sujeto predispuesto o susceptible a una enfermedad infecciosa. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, las composiciones que comprenden agentes terapéuticos

agonistas o las terapias combinadas se administran a un sujeto que vive en una región donde ha habido o podría haber un brote de infecciones por agentes infecciosos. En algunas formas de realización, la infección es una infección latente. En otras formas de realización, la infección por el agente infeccioso es una infección activa. En otras formas de realización más, la infección por el agente infeccioso es una infección viral crónica. En una forma de realización específica, la infección es una infección viral. En una forma de realización específica, el virus infecta a los humanos.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un mamífero que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 a 5 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un humano en riesgo de una infección por virus. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un ser humano con una infección viral. En determinadas formas de realización, el paciente es un humano de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 a 10 años, de 5 a 12 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 13 a 19 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 20 a 65 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un lactante humano o prematuro humano. En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un niño humano. En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un adulto humano. En otras formas de realización más, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un humano anciano.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a una mascota, por ejemplo, un perro o un gato. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un animal de granja o ganado, por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, pollos, etc. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista o una terapia de combinación se administra a un ave, por ejemplo, patos o pollos.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un primate, preferentemente un humano u otro mamífero, como un cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunodeprimido o inmunodeprimido o en riesgo de ser inmunocomprometido o inmunodeprimido. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que recibe o se recupera de una terapia inmunosupresora. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista o una terapia de combinación se administra a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer cáncer, sida, otra infección o una infección bacteriana. En determinadas formas de realización, un sujeto que es, será o ha sido sometido a cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición

que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que tiene fibrosis quística, fibrosis pulmonar u otra enfermedad que hace al sujeto susceptible a una infección. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que tiene, tendrá o tuvo un trasplante de tejido. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que vive en un hogar de ancianos, un hogar grupal (es decir, un hogar para 10 o más sujetos) o una prisión. En algunas formas de realización, se administra un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación a un sujeto que asiste a la escuela (por ejemplo, escuela primaria, escuela intermedia, escuela secundaria, escuela secundaria o universidad) o guardería. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que trabaja en el área de atención médica, como un médico o una enfermera, o en un hospital. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico agonista, composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación se administra a una persona que está embarazada o se quedará embarazada.

En algunas formas de realización, a un paciente se le administra un agente terapéutico agonista, una composición que comprende un agente terapéutico agonista, o una terapia de combinación antes de que se desarrolle cualquier efecto adverso o intolerancia a terapias distintas a los agentes terapéuticos agonistas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a pacientes refractarios. En una determinada forma de realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia estándar. En determinadas formas de realización, un paciente con una infección es refractario a una terapia cuando la infección no se ha erradicado significativamente y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede realizar in vivo o in vitro mediante cualquier método conocido en la técnica para evaluar la efectividad de un tratamiento de infecciones, utilizando los significados aceptados en la técnica de "refractario" en ese contexto, En las formas de realización, un paciente con una infección es refractario cuando la replicación del agente infeccioso no ha disminuido o ha aumentado.

En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias combinadas se administran a un paciente para prevenir la aparición o reincidencia de infecciones (por ejemplo, infecciones virales) en un paciente con riesgo de desarrollar tales infecciones. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias de combinación se administran a un paciente que es susceptible a reacciones adversas a las terapias convencionales.

En algunas formas de realización, uno o más agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación se administran a un paciente que ha demostrado ser refractario a otras terapias distintas de los agentes terapéuticos agonistas, pero ya no están en estas terapias. En determinadas formas de realización, los pacientes que se manejan o tratan de acuerdo con los métodos descritos en este documento son pacientes que ya están siendo tratados con antibióticos, antivirales, antifúngicos u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes se encuentran pacientes refractarios, pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales y pacientes con infecciones virales recurrentes a pesar del tratamiento o tratamiento con terapias existentes.

En algunas formas de realización, al sujeto que se le administra uno o más agentes terapéuticos agonistas,

composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias de combinación no ha recibido una terapia antes de la administración de los agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas, o terapias combinadas. En otras formas de realización, uno o más agentes terapéuticos agonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos agonistas o terapias combinadas se administran a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más agentes terapéuticos agonistas o composiciones que comprenden uno o más agentes terapéuticos agonistas, o terapias combinadas. En algunas formas de realización, el sujeto administró un agente terapéutico agonista o una composición que comprendía un agente terapéutico agonista refractario a una terapia anterior o experimentó efectos secundarios adversos a la terapia anterior o la terapia anterior se suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad para el sujeto.

5.4.2 Supresión de la función inmune

En el presente documento, se describen métodos para suprimir la función inmune mediada por IL-15 en un sujeto, que comprenden administrar un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto que lo necesite. En una forma de realización específica, se describen métodos para prevenir, tratar y/o manejar enfermedades en las que es deseable suprimir la función inmune, que comprenden administrar un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto que lo necesite. En formas de realización específicas, los agentes terapéuticos antagonistas están formulados con polímeros descritos en la Sección 5.2, supra. En otras formas de realización, un agente terapéutico antagonista puede administrarse en combinación con una o más terapias para suprimir una función inmune mediada por IL-15. Los ejemplos no limitativos de enfermedades que pueden prevenirse, tratarse o manejarse mediante la supresión de la función inmune incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios, enfermedad de injerto versus huésped y rechazo de trasplantes.

En una forma de realización específica, un agente terapéutico antagonista suprime o reduce la función inmune mediada por IL-15, por ejemplo, la proliferación de células NK y la producción de citoquinas.

En una forma de realización específica, un agente terapéutico antagonista suprime la función inmune mediada por IL-15 en un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% en relación con la función inmune en un sujeto que no se le administró el agente terapéutico usando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISPOT, ELISA y ensayos de proliferación celular. En una forma de realización específica, la función inmune es la liberación o producción de citoquinas (por ejemplo, interferón-gamma). En una forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la proliferación de células NK, que puede analizarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (por ejemplo, CD56). En una forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la proliferación y/o activación de células T (células CD4+ y/o células CD8+).

En formas de realización específicas, un agente terapéutico antagonista puede inhibir o reducir la proliferación/expansión de linfocitos (por ejemplo, número de linfocitos), inducir o aumentar la apoptosis de linfocitos, inhibir la activación de células dendríticas (o células presentadoras de antígenos) y presentación de antígenos. En formas de realización particulares, una función inmune suprimida por un agente terapéutico antagonista es la proliferación/expansión/activación de células T CD4+ (por ejemplo, células T helper Th1 y Th2), células T CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células

T alfa/beta) y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos o células natural killer. En una forma de realización, un agente terapéutico antagonista disminuye/reduce la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos.

5

En una forma de realización específica, un agente terapéutico antagonista suprime la función inmune mediada por IL-15 en un ensayo basado en células (por ejemplo, ensayando la proliferación de una línea celular sensible a IL-15- como CTLL-2 o TFB1) al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20% o al menos el 10% con respecto a un control negativo según se determine usando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación celular con CSFE, BrdU e incorporación de ³H-timidina. En una forma de realización específica, la función inmune es la liberación de citoquinas (por ejemplo, interferón-gamma). En formas de realización particulares, la actividad de un agente terapéutico antagonista en ensayos basados en células y en experimentos con modelos animales se correlaciona con la función in vivo del agente terapéutico antagonista para suprimir la función inmune mediada por IL-15.

10

15

A continuación se enumeran diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias que pueden prevenirse, tratarse y/o manejarse.

20

5.4.2.1. Trastornos autoinmunes e inflamatorios

En el presente documento se describe un método para tratar, prevenir y/o manejar un trastorno autoinmune o un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describe un método para reducir la inflamación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto que lo necesite. Los ejemplos no limitativos de trastornos autoinmunes y trastornos inflamatorios incluyen rechazo de trasplante y enfermedad de injerto versus huésped (GVHD). La GVHD ocurre cuando las células inmunes de un donante (por ejemplo, las células T del donante) atacan a las células en el cuerpo del sujeto receptor. El rechazo del trasplante se produce cuando el organismo del receptor del trasplante no acepta un órgano o tejido trasplantado. En general, el rechazo del trasplante se debe a que el sistema inmune del receptor (por ejemplo, las células T del receptor) ataca el órgano o tejido trasplantado.

25

30

En una forma de realización específica, la administración de un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) reduce la inflamación en un sujeto al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% con respecto a la inflamación en un sujeto que no se le administró el agente terapéutico antagonista utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reducción de la inflamación se puede medir mediante la reducción de la secreción de citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma). En una forma de realización específica, la administración de un agente terapéutico antagonista o una composición que comprende un agente terapéutico antagonista a un sujeto (en algunas formas de realización, un modelo animal) reduce la inflamación en un sujeto al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de

35

40

5 a 20 veces en relación con la inflamación en un sujeto no administrado con el agente terapéutico antagonista utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reducción de la inflamación puede medirse mediante la reducción de la secreción de citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma).

- 5 En otras formas de realización, se puede administrar un agente terapéutico antagonista en combinación con una o más terapias para suprimir la función inmune mediada por IL-15 en un sujeto. Se pueden usar diversos agentes antiinflamatorios conocidos en la técnica en combinación con agentes terapéuticos antagonistas.

- 10 Los ejemplos de trastornos autoinmunes que se pueden prevenir, tratar y/o manejar de acuerdo con los métodos descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, celiacos (enfermedad celíaca), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolipídico, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, dermatitis-espúrra celíaca, síndrome de disfunción inmune con fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de
- 15 Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I o inmunomediada, miasthenia gravis, pemphigus vulgaris, anemia
- 20 perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiformis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los
- 25 ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, shock séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria y crónica, inflamación resultante de infecciones virales crónicas o bacterianas. Algunos trastornos autoinmunes están asociados con una condición inflamatoria. Por lo tanto, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno
- 30 inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o manejarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, shock séptico, pulmonar fibrosis, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica causada
- 35 por infecciones virales crónicas o bacterianas.

- En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación se administran a un sujeto que padece una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio. En otras formas de realización, los agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que
- 40 comprenden agentes terapéuticos antagonistas o terapias de combinación se administran a un sujeto predispuesto o susceptible de desarrollar una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un mamífero que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12

meses, de 1 a 5 años, de 5 años a 10 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un humano en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un ser humano con una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio. En determinadas formas de realización, el paciente es un humano de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 a 10 años, de 5 a 12 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 13 a 19 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 20 a 65 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años. En algunas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un bebé humano o un bebé prematuro humano. En otras formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un niño humano. En otras formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un adulto humano. En otras formas de realización más, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un humano anciano.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a una mascota, por ejemplo, un perro o un gato. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un animal de granja o ganado, por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, pollos, etc.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un primate, preferentemente un humano u otro mamífero, como un cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunocomprometido o un estado inmunosuprimido o en riesgo de ser inmunocomprometido o inmunodeprimido. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que recibe o se recupera de una terapia inmunosupresora. En determinadas formas de realización, un agente terapéutico antagonista, composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación se administra a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer sida, una infección viral o una infección bacteriana. En determinadas formas de realización, un sujeto que es, será o ha sido sometido a cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.

En algunas formas de realización, a un paciente se le administra un agente terapéutico antagonista, una composición que comprende un agente terapéutico antagonista, o una terapia de combinación antes de que se desarrollen efectos adversos o intolerancia a terapias distintas de los agentes terapéuticos antagonistas. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación se administran a pacientes refractarios. En una determinada forma de realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia estándar. En determinadas formas de realización, un paciente con una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio es refractario a una terapia cuando la enfermedad autoinmune o el trastorno

inflamatorio, respectivamente, no se ha erradicado de modo significativo y/o los síntomas no se han aliviado de modo significativo. La determinación de si un paciente es refractario se puede hacer in vivo o in vitro por cualquier método conocido en la técnica para evaluar la efectividad de un tratamiento, utilizando los significados aceptados en la técnica de “refractario” en ese contexto. En diversas formas de realización, un paciente con un trastorno inflamatorio es refractario cuando la inflamación no ha disminuido o ha aumentado.

En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación se administran a un paciente que es susceptible a reacciones adversas a las terapias convencionales.

En algunas formas de realización, uno o más agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación se administran a un paciente que ha demostrado ser refractario a otras terapias distintas de los agentes terapéuticos antagonistas, pero ya no están en estas terapias. En determinadas formas de realización, los pacientes tratados o tratados de acuerdo con los métodos descritos en este documento son pacientes que ya están siendo tratados con antibióticos, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes se encuentran pacientes refractarios, pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales.

En algunas formas de realización, al sujeto que se le administran uno o más agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación no ha recibido una terapia antes de la administración de agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas, o terapias de combinación. En otras formas de realización, uno o más agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas o terapias de combinación se administran a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más agentes terapéuticos antagonistas, composiciones que comprenden agentes terapéuticos antagonistas o terapias de combinación. En algunas formas de realización, el sujeto administró un agente terapéutico antagonista o una composición que comprendía un agente terapéutico antagonista era refractario a una terapia anterior o experimentaba efectos secundarios adversos a la terapia anterior o la terapia anterior se suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad para el sujeto.

5.4.3 Modo de Administración

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía conocida en la técnica. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos formulados con polímeros son especialmente adecuados para el suministro local, pero dichas formulaciones también pueden ser para administración sistémica.

Los agentes terapéuticos o las composiciones de los mismos pueden administrarse por vía oral, o por cualquier otra vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal) y pueden administrarse junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, y se pueden usar para administrar los agentes terapéuticos o composiciones de los mismos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, parenteral, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmico, rectal,

por inhalación, intratumoral o tópico, particularmente en las orejas, nariz, ojos o piel. El modo de administración se deja a discreción del profesional. En algunas formas de realización, la administración dará como resultado la liberación de un agente terapéutico en el torrente sanguíneo.

5 En formas de realización específicas, puede ser deseable administrar localmente un agente terapéutico. Esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por ejemplo, en combinación con un apósito para heridas, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas o fibras.

10 En determinadas formas de realización, puede ser deseable introducir un agente terapéutico en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular, intratecal y epidural. La inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, conectado a un reservorio, como un reservorio Ommaya.

15 La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización, o mediante perfusión en un fluorocarbono o tensioactivo pulmonar sintético.

En determinadas formas de realización, un agente terapéutico se formula como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos.

20 Para infecciones virales o melanoma con manifestaciones cutáneas, el agente terapéutico puede administrarse por vía tópica.

25 En otra forma de realización, se administra un agente terapéutico en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial Infection*, López-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327).

30 En otra forma de realización, un agente terapéutico se administra en un sistema de liberación controlada (ver, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Ejemplos de sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533. En una forma de realización, se puede usar una bomba (ver Langer, supra, Sefton, 1987, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; ver también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En una forma de realización específica, un sistema de liberación controlada que comprende un agente terapéutico se coloca muy cerca del tejido afectado por la enfermedad para prevenir, tratar y/o manejar. De acuerdo con esta forma de realización, la proximidad del sistema de liberación controlada al tejido afectado puede resultar en solo una fracción de la dosis del agente terapéutico requerido si se administra de forma sistémica.

40

En una forma de realización específica, el agente terapéutico formulado con un polímero se administra localmente en el área o tejido de un paciente para aumentar o reducir la función de IL-15. En algunas formas de realización, un agente terapéutico agonista formulado con polímeros se puede administrar localmente a un tumor en un paciente con cáncer para

mejorar o inducir la función de IL-15 y la respuesta inmune al tumor. En otras formas de realización, un agente terapéutico agonista formulado con polímeros puede administrarse localmente a un tejido infectado con un patógeno en un sujeto para potenciar o inducir la función de IL-15 y una respuesta inmune al patógeno. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico agonista incluye el complejo de IL-15/IL-15Ra o los ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra.

5 En otras formas de realización, el agente terapéutico agonista incluye células que expresan IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades y polímeros. En una forma de realización, altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresadas por células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces más que las cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por células de control (por ejemplo, células que no han sido
10 modificadas genéticamente para expresar en forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío).

En algunas formas de realización, un agente terapéutico antagonista formulado con polímeros se administra localmente a un sitio de inflamación en un sujeto que padece un trastorno autoinmune o inflamatorio para suprimir o reducir la función
15 de IL-15 y la respuesta inmune provocada en el sitio de la inflamación. En otras formas de realización, un agente terapéutico antagonista formulado con polímeros se administra localmente en un sitio de un tejido/órgano trasplantado en un sujeto para suprimir o reducir la función de IL-15 y la respuesta inmune al tejido trasplantado.

5.4.4 Dosis y frecuencia de administración

20 La cantidad de un agente terapéutico, o la cantidad de una composición que comprende un agente terapéutico, que será efectiva en la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad que se ve afectada por la función de IL-15 puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Los ensayos in vitro o in vivo pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear también dependerá, por ejemplo, de la vía
25 de administración, el tipo de síntomas y la gravedad de los síntomas, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente o sujeto.

En algunas formas de realización, la dosis de un agente terapéutico o sus composiciones se determina extrapolando el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL), según lo determinado en estudios con animales. Esta dosis extrapolada es útil para determinar la dosis inicial máxima recomendada para ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, los NOAEL pueden extrapolarse para determinar dosis equivalentes en humanos (HED). Normalmente, el HED se extrapola de una dosis de un animal no humano en función de las dosis que se normalizan al área de la superficie corporal (es decir, mg/m^2). En formas de realización específicas, los NOAEL se determinan en ratones, hámsteres, ratas, hurones, cobayos, conejos, perros, primates (monos, títies, monos ardilla, babuinos), micropigs o minipigs. Para un análisis sobre el uso de
30 NOAEL y su extrapolación para determinar las dosis equivalentes en humanos, ver Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, julio de 2005. En una forma de realización, un agente terapéutico o una composición del mismo se administra a una dosis que es menor que la dosis equivalente humana (HED) del NOAEL durante un período de
35 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 40 3 años, 4 años o más.

En determinadas formas de realización, un régimen de dosificación para un sujeto humano puede extrapolarse a partir de estudios con modelos animales utilizando la dosis a la que muere el 10% de los animales (LD10). En general, la dosis

inicial de un ensayo clínico de fase I se basa en pruebas preclínicas. Una medida estándar de la toxicidad de un medicamento en las pruebas preclínicas es el porcentaje de animales que mueren debido al tratamiento. Está bien dentro de la experiencia de la técnica correlacionar el LD10 en un estudio en animales con la dosis máxima tolerada (MTD) en humanos, ajustada por área de superficie corporal, como base para extrapolar una dosis humana inicial. En algunas formas de realización, la interrelación de las dosis para un modelo animal se puede convertir para su uso en otro animal, incluyendo a los seres humanos, utilizando factores de conversión (basados en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) como se describe, por ejemplo, en Freireich *et al.*, Cancer Chemother. Rep., 1966, 50:219–244. El área de la superficie del cuerpo se puede determinar aproximadamente a partir de la altura y el peso del paciente. Ver, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, NY, 1970, 537. En determinadas formas de realización, el ajuste para el área de superficie corporal incluye factores del huésped tales como, por ejemplo, área de superficie, peso, metabolismo, distribución tisular, tasa de absorción, y tasa de excreción. Además, la ruta de administración, el uso de excipientes y la enfermedad o el virus específicos para atacar también son factores a considerar. En una forma de realización, la dosis inicial conservadora estándar es aproximadamente 1/10 de la LD10 murina, aunque puede ser incluso menor si otras especies (es decir, los perros) son más sensibles al agente terapéutico. En otras formas de realización, la dosis inicial conservadora estándar es aproximadamente 1/100, 1/95, 1/90, 1/85, 1/80, 1/75, 1/70, 1/65, 1/60, 1/55, 1/50, 1/45, 1/40, 1/35, 1/30, 1/25, 1/20, 1/15, 2/10, 3/10, 4/10 o 5/10 de la LD10 murina. En otras formas de realización, una cantidad de dosis inicial de un agente terapéutico en un ser humano es inferior a la dosis extrapolada de estudios de modelos animales. En otra forma de realización, una cantidad de dosis inicial de un agente terapéutico en un ser humano es mayor que la dosis extrapolada de estudios de modelos animales. Está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis de la composición activa a niveles relativamente bajos, y aumentar o disminuir la dosis según sea necesario para lograr el efecto deseado con una toxicidad mínima.

Las dosis ejemplares de agentes terapéuticos que comprenden polipéptidos o anticuerpos o composiciones de los mismos incluyen miligramos o microgramos por kilogramo de peso del sujeto o muestra (por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 5 microgramos por kilogramo a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo). En formas de realización específicas, una dosis diaria es de al menos 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, o al menos 1 g.

En una forma de realización, la dosis es una concentración de 0,01 a 5000 mM, 1 a 300 mM, 10 a 100 mM y 10 mM a 1 M. En otra forma de realización, la dosificación es una concentración de al menos 5 μ M, en al menos 10 μ M, al menos 50 μ M, al menos 100 μ M, al menos 500 μ M, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM o al menos 500 mM.

En una forma de realización, la dosis es una concentración de 0,01 a 5000 mM, 1 a 300 mM, 10 a 100 mM y 10 mM a 1 M. En otra forma de realización, la dosificación es una concentración de al menos 5 μ M, en al menos 10 μ M, al menos 50 μ M, al menos 100 μ M, al menos 500 μ M, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM o al menos 500 mM. En una forma de realización específica, la dosis es de 0,25 μ g/kg o más, preferentemente 0,5 μ g/kg o más, 1 μ g/kg o más, 2 μ g/kg o más, 3 μ g/kg o más, 4 μ g/kg o más, 5 μ g/kg o más, 6 μ g/kg o más, 7 μ g/kg o más, 8 μ g/kg o más, 9 μ g/kg o más, o 10 μ g/kg o más, 25 μ g/kg o más, preferentemente 50 μ g/kg o más, 100 μ g/kg o más, 250 μ g/kg o más, 500 μ g/kg o más, 1 mg/kg o más, 5 mg/kg o más, 6 mg/kg o más, 7 mg/kg o más, 8 mg/kg o más, 9 mg/kg o más, o 10 mg/kg o más del peso corporal de un paciente.

En otra forma de realización, la dosis es una dosis unitaria de 5 mg, preferentemente 10 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200

5 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg o más. En otra forma de realización, la dosis es una dosis unitaria que varía de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 µg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 400 mg, 250 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 500 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, o aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1000 mg.

10 Las dosis ejemplares de agentes terapéuticos que comprenden ácidos nucleicos o composiciones de los mismos incluyen 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg o 60 µg de ácidos nucleicos por dosis. En una forma de realización específica, la dosis está en el rango de 10 ng a 100 mg, o de 50 ng a 100 mg, o de 100 ng a 100 mg de ácidos nucleicos por dosis. En algunas formas de realización específicas, la dosis está en el rango de 10 µg a 100 mg, o de 50 µg a 100 mg, o de 100 µg a 100 mg, o de 100 µg a 100 ng de ácidos nucleicos por dosis.

15 En determinadas formas de realización, los intervalos de dosificación adecuados para la administración oral son de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 500 miligramos de un agente terapéutico, por kilogramo de peso corporal por día. En formas de realización específicas, la dosis oral es de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 75 miligramos por kilogramo de peso corporal por día o de aproximadamente 0,5 miligramos a 5
20 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Las cantidades de dosificación descritas en este documento se refieren a las cantidades totales administradas; es decir, si se administra más de un agente terapéutico, entonces, en algunas formas de realización, las dosis corresponden a la cantidad total administrada. En una forma de realización específica, las composiciones orales contienen aproximadamente el 10% a aproximadamente el 95% de un agente terapéutico en peso.

25 Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa (iv) son de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 35 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, y de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 10 miligramos por kilogramos de peso corporal por día. En algunas formas de realización, los intervalos
30 de dosificación adecuados para la administración intranasal son de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal por día a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día. Los supositorios en general contienen aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 50 miligramos de un agente terapéutico por kilogramo de peso corporal por día y comprenden un ingrediente activo en el rango de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% en peso.

35 Las dosis recomendadas para administración por inhalación intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, epidural, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmica o por inhalación están en el rango de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Las dosis adecuadas para la administración tópica incluyen dosis que están en el intervalo de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 50 miligramos, dependiendo del área de administración.

40 En otra forma de realización, a un sujeto se le administran una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o una composición del mismo, en la que la cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva no es la misma para cada dosis. En otra forma de realización, a un sujeto se le administran una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o una composición del mismo, en donde la

- dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz administrada a dicho sujeto aumenta, por ejemplo, 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg o 50 µg/kg, a medida que avanza el tratamiento. En otra forma de realización, a un sujeto se le administran una o más
- 5 dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o una composición del mismo, en donde la dosis se reduce, por ejemplo, 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, o 50 µg/kg, a medida que avanza el tratamiento.
- 10 Para agentes terapéuticos que comprenden células que expresan IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades, el intervalo de dosificación adecuado para la administración por cualquier vía de administración puede ser al menos 100,200,300,400, 500,700, 1000, 5000, 10000,25000,50000 o 100000 células. En formas de realización específicas, el número de células es de al menos 100, 200, 300,400, 500 células. En otras formas de realización, el número de células es al menos
- 15 300,400,500,700,1000 células. En otras formas de realización específicas, el número de células es de al menos 700,1000, 5000,10000 células. En algunas formas de realización, el número de células es de al menos 5000, 10000,25000, 50000 o 100000 células. En otra forma de realización más, el número de células es al menos 50000, o 100000 células. En otras formas de realización, el número de células es al menos 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células. En otras formas de realización, el número de células es al menos 1×10^6 , 5×10^6 o 1×10^7 o más células. En algunas formas de realización, el número de células es al menos 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o más células. En otras formas de realización, el
- 20 número de células es al menos 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células. En formas de realización específicas, el número de células está entre 1×10^4 a 1×10^6 , 5×10^4 a 5×10^6 , 1×10^5 a 1×10^7 , 1×10^5 a 5×10^8 , 1×10^6 a 1×10^8 , o 1×10^6 a 1×10^7 , o 1×10^4 a 1×10^5 .
- En determinadas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico o una composición del mismo
- 25 en una cantidad efectiva para inhibir o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%. al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% con respecto a un control negativo según lo determinado usando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por el experto en la técnica. En determinadas formas de realización de
- 30 tratamiento, a un sujeto se le administra un agente terapéutico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces. 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según lo determinado utilizando un ensayo descrito en la presente u otro conocido por un experto en la técnica.
- 35 En determinadas formas de realización para tratar o manejar una enfermedad infecciosa, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al
- 40 menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% en relación con un control negativo según lo determinado utilizando un ensayo descrito en el presente documento u otros conocidos por un experto en la técnica. En determinadas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o 2 a 5 veces, 2 a 10 veces,

5 a 10 veces, o 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un ensayo descrito en la presente u otro conocido por un experto en la técnica. En otras formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso en al menos 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más en relación con un control negativo según se determina utilizando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por los expertos en la técnica.

En determinadas formas de realización para prevenir, tratar y/o manejar el cáncer, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir el crecimiento del tumor o la proliferación de células cancerosas en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% en relación con un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir el crecimiento tumoral o la proliferación de células cancerosas al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según lo determinado usando un ensayo descrito aquí u otros conocidos por un experto en la técnica.

En determinadas formas de realización para tratar o manejar enfermedades autoinmunes o inflamatorias, a un sujeto se le administra un agente terapéutico antagonista o una composición del mismo en una cantidad eficaz para suprimir o reducir ciertos aspectos de la función inmune en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% en relación con un control negativo según se determina utilizando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico antagonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para suprimir o reducir ciertos aspectos de la función inmune al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito aquí u otros conocidos por un experto en la técnica.

En determinadas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inducir o mejorar una respuesta inmune en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% con respecto a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos a un experto en la materia. En algunas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para inducir o mejorar una respuesta inmune al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por un experto en el arte.

En determinadas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para aumentar o potenciar el número de linfocitos (en algunas formas de realización, en

5 un compartimento específico del cuerpo objetivo) en al menos 20% a 25%, preferentemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos el 85% en relación con un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en la presente u otros conocidos por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, a un sujeto se le administra un agente terapéutico agonista o una composición del mismo en una cantidad efectiva para aumentar o potenciar el número de linfocitos (en algunas formas de realización, en un compartimento específico del cuerpo objetivo) al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces; o aproximadamente de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina usando un ensayo descrito en la presente u otro conocido por un experto en la técnica. En algunas formas de realización, el compartimento específico del cuerpo objetivo donde el número de linfocitos aumenta o se potencia mediante un agente terapéutico agonista es el pulmón, el estómago, el corazón, el riñón, el hígado, el intestino delgado, el intestino grueso, la mama, la próstata o la vejiga. En formas de realización particulares, el compartimento específico del cuerpo objetivo en el que aumenta o se potencia el número de linfocitos es el compartimento corporal afectado por una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa). En algunas formas de realización, el compartimento específico del cuerpo objetivo donde el número de linfocitos aumenta o se potencia es el ganglio linfático, el bazo o la sangre periférica.

20 En determinadas formas de realización, se administra una dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo a un sujeto todos los días, cada dos días, cada tercer día, una vez a la semana, dos veces por semana, tres veces por semana o una vez cada dos semanas. En otras formas de realización, se administran dos, tres o cuatro dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo a un sujeto todos los días, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana o una vez cada dos semanas. En algunas formas de realización, una dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo se administra durante 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días o 21 días. En determinadas formas de realización, una dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo se administra durante 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 2,5 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más.

30 Las dosis de agentes profilácticos o terapéuticos que se han utilizado o se usan actualmente para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de una enfermedad o trastorno afectado por la función/señalización de IL-15, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, autoinmune e inflamatoria, y el rechazo del trasplante, pueden determinarse utilizando las referencias disponibles para un médico como, por ejemplo, Physician's Desk Reference (61^a ed. 2007). Preferentemente, dosis más bajas que las que se han usado o se están usando actualmente para prevenir, tratar y/o manejar la enfermedad o trastorno se utilizan en combinación con uno o más agentes terapéuticos o composiciones de los mismos.

35 Para agentes que han sido aprobados para usos distintos a la prevención, tratamiento o manejo de enfermedades o trastornos afectados por la activación/señalización de IL-15, por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes e inflamatorias y rechazo de trasplantes, se pueden determinar fácilmente rangos de dosis seguros utilizando las referencias disponibles para los médicos, como por ejemplo, Physician's Desk Reference (61^a.ed. 2007).

40 Los programas de administración descritos anteriormente se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben considerarse limitativos.

5.4.5 Terapia adicional/combinada

Otras terapias que pueden usarse en combinación con agentes terapéuticos (es decir, agentes terapéuticos agonistas y agentes terapéuticos antagonistas) para la prevención, tratamiento y/o manejo de una enfermedad que se ve afectada por la función/señalización de IL-15, por ejemplo, el cáncer, las enfermedades infecciosas, las enfermedades autoinmunes e inflamatorias y el rechazo del trasplante incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos (incluidos los péptidos cíclicos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN, entre otros) pero sin limitación, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, ARNi y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos, anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Los ejemplos específicos de tales terapias incluyen, pero sin limitación, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interferón), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, adrenocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenac e inhibidores de la COX-2), analgésicos, antagonistas de la leucotreína (por ejemplo, montelukast, metilxantinas, zafirlukast y zileutona), agonistas beta2 (por ejemplo, albuterol, biterol, fenoterol, isoetaria, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina formoterol, salmeterol y salbutamol, por ejemplo, salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (por ejemplo, ipratropio), agentes antipalúdicos (por ejemplo, hidroxiclороquina), agentes antivirales (por ejemplo, análogos de nucleósidos (por ejemplo, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, y ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, y AZT) y antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina y antramicina (AMC)).

Cualquier terapia que se sepa que es útil, o que se ha utilizado o se está utilizando actualmente para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de una enfermedad que está afectada por la función/señalización de IL-15 se puede usar en combinación con agentes terapéuticos. Ver, por ejemplo, Gilman *et al.*, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. *et al.* (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996, and Physicians' Desk Reference (61^a ed. 2007) para obtener información sobre terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se han utilizado o se están utilizando actualmente para prevenir, tratar y/o manejar una enfermedad o trastorno afectados por la función/señalización de IL-15, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune e inflamatoria, enfermedad de injerto versus huésped y rechazo del trasplante.

5.4.5.1 Agentes anticáncer

Los ejemplos no limitativos de una o más terapias diferentes que se pueden usar en combinación con un agente terapéutico incluyen agentes inmunomoduladores, tales como, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos y agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos incluyen metotrexato, ciclosporina A, leflunomida, cisplatino, ifosfamida, taxanos como taxol y paclitaxol, inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecano, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, citocalasina B, gramicidina D, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, antracina, dihidroxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y homólogos de puomicina, y citoxano. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-receptor de células T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412

(Boeinger), IDEC-CE9.1® (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Orthoclone y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson) o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado unido a ricina anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales del ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex), anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, MEDI-507 (MedImmune, Inc., publicaciones internacionales números WO 02/098370 y WO 02/069904), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114) (IDEC)); anticuerpos contra el receptor de citoquinas (por ejemplo, anticuerpos contra el receptor de IFN, anticuerpos contra el receptor IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs), anticuerpos anti-receptor de IL-4, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-receptor de IL-10 y anticuerpos anti-receptor de IL-12), anticuerpos anti-citoquinas (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti-TNF- α , anticuerpos anti-IL-1 β , anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, ABX-IL-8 (Abgenix)), anticuerpos anti-IL-12 y anticuerpos anti-IL-23)); CTLA4-inmunoglobulina; LFA-3TIP (Biogen, publicación internacional N.º WO 93/08656 y patente U. S. N.º 6.162.432); receptores de citoquinas solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un TNF-un receptor o un fragmento del mismo, el dominio extracelular de un receptor de IL-1 β o un fragmento del mismo, y el dominio extracelular de un receptor de IL-6 o un fragmento del mismo); citoquinas o sus fragmentos (por ejemplo, interleuquina (IL) -2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-23, TNF- α , TNF- β , interferón (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , y GM-CSF); y anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-2, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-10, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-TNF- α , y anticuerpos anti-IFN- γ , y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos asociados a tumores (por ejemplo, Herceptin®). En determinadas formas de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de un agente quimioterapéutico. En otras formas de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de una citoquina o hematopoyético como IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, TNF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , M-CSF, G-CSF, IL-3 o eritropoyetina. En otras formas de realización más, un agente inmunomodulador es un agente distinto de un agente quimioterapéutico y un factor de citoquina o hematopoyético.

Los ejemplos no limitativos de agentes anticáncer que se pueden usar como terapias en combinación con agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; ametantrona acetato; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; bisnafide dimesilato; bizelesina; bleomicina sulfato; brequinar sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; dezaguanina mesilato; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; droloxifeno citrato; dromostanolona propionato; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epiropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorrubicina; estramustina; estramustinafosfato sódico; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabinafosfato; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecinasodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleuquina II (incluyendo interleuquina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iroplatino; clorhidrato de irinotecano; lanreotide acetato; letrozol; leuprolida acetato; clorhidrato de liarozol; lometrexol sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; megestrol acetato; melengestrol acetato; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexatosodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido microfenólico;

nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina
 sulfato; perfosfamida; pipobromano; piosulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimerosodio;
 porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina;
 rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazen; esparfosatosodio; esparsomicina; clorhidrato de
 5 espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalanosodio;
 tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa;
 tiazofurina; tirapazamina; toremifeno citrato; trestolona acetato; triciribinafosfato; trimetrexato; trimetrexato glucuronato;
 triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotide; verteporfina; vinblastina sulfato; vincristina
 sulfato; vindesina; vindesina sulfato; vinepidina sulfato; vinglicinato sulfato; vinleurosina sulfato; vinorelbina tartrato;
 10 vinrosidina sulfato; vinzolidina sulfato; vorozol; zeniplatino; zinostatino; clorhidrato de zorrubicina. Otros fármacos
 anticáncer incluyen, pero sin limitación: 20–epi–1,25 dihidroxivitamina D3; 5–etiniluracilo; abiraterona; aclanibicina;
 acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL–TK; altretamina; ambamustina; amidox;
 amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la
 angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; roteína morfogenética anti–dorsalizante–1; antiandrógeno,
 15 carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores
 del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara–CDP–DL–PTBA; arginina desaminasa;
 asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina;
 derivados de bacatina III; balanol batimastat; antagonistas de BCR / ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados
 de betalactámicos; beta–aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno;
 20 bisaziridinilsperrina; bisnafide; bistrateno A; bizelesina; breflato bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina;
 calciprotiol; calfofina C; derivados de la camptotecina; canarypox IL–2; capecitabina; carboxamida–amino–triazol;
 carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de la caseína
 quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; cloros; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis–porfirina;
 cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; collismicina A; collismicina B; combretastatina A4; análogo de
 25 combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curación A;
 ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; citarabina ocfosfato; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina;
 deshiodidemnina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemina B;
 didox; dietilnorspermina; dihidro–5–azacitidina; dihidrotaxol, 9–; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol;
 dolasetrón; doxilfluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen ecomustina edelfosina; edrecolomab;
 30 eflomitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristeride; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas
 de estrógenos; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida
 flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina;
 fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; inhibidores de ganirelix de la gelatinasa; gemcitabina;
 inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina;
 35 idoxifeno idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del
 receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguane;
 yododoxorrubicina; ipomeanol, 4–; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrona; jasplakinolida;
 kahalalide F; lamelarina–N triacetato; lanreotide; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor
 inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolide + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol;
 40 liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipófilos de platino; lissoclinamida 7;
 lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; Inhibidor de la HMG–CoA reductasa (como, por ejemplo,
 Lovastatin, Pravastatin, Fluvastatina, Statina, Simvastatina, y Atorvastatina); loxoribina; lurtotecan; lutecio texafirina;
 lisofilina; péptidos líticos; maitansina manostatina A; marimastato; masoprocol; inhibidores de maspina de la matrilisina;
 inhibidores de la metaloproteínasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; Inhibidor

de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario no coincidente; mitoguazona; mitolactol; análogos de la mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + myobacterium celular de la pared sk; mopidamol; inhibidor de genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en supresor de tumores múltiples 1; agente anticancerígeno de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona N-acetildinalina; benzamidas N-sustituídas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante del nitrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina inductora de citoquinas orales; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentozol; perflubrona; perfosfamida; alcohol perilífico; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; plactina A; plactina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed ramosetrona, inhibidores de la proteína famesil transferasa; inhibidores de ras; inhibidor ras de GAP; retelliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohituquina; romurtide roquinimex; rubiginona BI; ruboxilo; safigol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; inhibidor derivado de la senescencia de semustina 1; oligonucleótidos con sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena simple; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina ácido esparfósico; spicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; tallimustina; metoyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilo; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; etil etiopurpurina estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor totipotente de células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; Inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdines; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; Vitaxin®; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina stimalámero. Otros medicamentos contra el cáncer son 5-fluorouracilo y leucovorina. Estos dos agentes son útiles cuando se usan métodos que emplean talidomida y un inhibidor de topoisomerasa. Los fármacos anticáncer adicionales son 5-fluorouracilo y leucovorina. Estos dos agentes son particularmente útiles cuando se usan en métodos que emplean talidomida y un inhibidor de topoisomerasa. En formas de realización específicas, un agente anticáncer no es un agente quimioterapéutico.

En otras formas de realización específicas, un agente terapéutico puede administrarse en combinación con la administración de una o más terapias tales como, pero sin limitación, agentes anticáncer tales como los descritos en la Tabla 1 con dosis estándar. Cuando se usa en una terapia de combinación, las dosis y/o la frecuencia de administración

enumeradas en la Tabla 1 pueden disminuir.

TABLA 1

Agenteterapéutico	Dosis/Administración/Formulación		
doxorubicinaclorhidrato (Adriamicina)	Intravenosa	60–75 mg/m ² en el día 1	Intervalos de 21 días
RDF® y AdriamicinaPFS®			
epirubicinaclorhidrato (Ellence™)	Intravenosa	100–120 mg/m ² en el día 1 de cada ciclo o divididos en partes iguales y administrados en los días 1–8 del ciclo.	Ciclos de 3–4 semanas
flourousacilo	Intravenosa	Cómo se suministra: viales de 5 ml y 10 ml (que contienen 250 y 500 mg de flourouracilo respectivamente)	
docetaxel(Taxotere®)	Intravenosa	60–100 mg/m ² durante 1 hora	Una vez cada 3 semanas
paclitaxel(Taxol®)	Intravenosa	175 mg/m ² durante 3 horas	Cada 3 semanas durante 4 ciclos (administrados secuencialmente a la quimioterapia de combinación que contiene doxorubicina)
tamoxifeno citrato (Nolvadex®)	Oral(comprimido)	20–40 mg Las dosis superiores a 20 mg deben administrarse en dosis divididas (mañana y tarde)	Diario
leucovorina calcio para inyección	inyección intravenosa o intramuscular	Cómo se suministra: vial de 350 mg.	La dosis no está clara a partir del texto. PDR 3610
luprolidaacetato Lupron®)	inyección subcutánea única	1 mg (0,2 ml o marca de 20 unidades)	Una vez al día
flutamida(Eulexin®)	Oral(cápsula)	50 mg(cápsulas contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces por día a intervalos de 8 horas (dosis diaria total 750 mg)
nilutamida(Nilandron®)	Oral(comprimido)	300 mg o 150 mg (los comprimidos contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada una)	300 mg una vez por día durante 30 días seguido por 150 mg una vez por día

ES 2 716 476 T3

Agenteterapéutico	Dosis/Administración/Formulación		
bicalutamida(Casodex®)	Oral(comprimido)	50 mg(los comprimidos contienen 50 mg de bicalutamida cada uno)	Una vez al día
Progesterona	Inyección	USP en aceite de sésamo 50 mg/mL	
Ketoconazol (Nizoral®)	Crema	2% de crema aplicada una o dos veces al día según los síntomas	
Prednisona	Oral(comprimido)	La dosis inicial puede variar de 5 mg a 60 mg por día, dependiendo de la entidad específica de la enfermedad que se esté tratando.	
estramustinafosfatosodio(Emcyt®)	Oral (capsule)	14 mg/kg de peso corporal (es decir, una cápsula de 140 mg por cada 10 kg o 22 libras de peso corporal)	Diariamente administrada en 3 o 4 dosis divididas.
etopósido oVP-16	Intravenosa	5 ml de 20 mg/ml de solución (100 mg)	
dacarbazina(DTIC-Dome®)	Intravenosa	2-4,5 mg/kg	Una vez al día durante 10 días. Puede repetirse a intervalos de 4 semanas
polifeprosano 20 con implante de carmustina (BCNU) (nitrosourea) (Gliadel®)	oblea colocada en la cavidad de resección	8 obleas, cada una con 7,7 mg de carmustina, para un total de 61,6 mg, si el tamaño y la forma de la cavidad de resección lo permiten	
Cisplatino	Inyección	[n/a en PDR 861] Forma de suministro: solución de 1 mg/ml en viales de dosis múltiples de 50 ml y 100 ml.	
mitomicina	Inyección	Se suministran en viales de 5 mg y 20 mg (que contienen 5 mg y 20 mg de mitomicina)	

Agenteterapéutico	Dosis/Administración/Formulación		
gemcitabina HCl (Gemzar®)	Intravenosa	Se han investigado los esquemas de NSCLC-2 y no se ha determinado el cronograma óptimo. Programa de 4 semanas: administración intravenosa a 1000 mg/m ² durante 30 minutos. Programa de 3 semanas. Gemzar se administra por vía intravenosa a 1250 mg/m ² durante 30 minutos.	Horario de 4 semanas: días 1,8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Cisplatino por vía intravenosa a 100 mg/m ² en el día 1 después de la infusión de Gemzar. Programa de 3 semanas: días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. Cisplatino a dosis de 100 mg/m ² administrados por vía intravenosa después de la administración de Gemzar el día 1.
carboplatino (Paraplatin®)	Intravenosa	Terapia de un solo agente: 360 mg/m ² i.v. en el día 1 (infusión que dura 15 minutos o más) Otros cálculos de dosis: terapia de combinación con ciclofosfamida, recomendaciones de ajuste de dosis, dosis de fórmula, etc.	Cada 4 semanas
ifosamida(Ifex®)	Intravenosa	1,2 g/m ² diarios	5 días consecutivos Repetir cada 3 semanas o después de la recuperación de la toxicidad hematológica
topotecanoclorhidrato (Hycamtin®)	Intravenosa	1.5 mg/m ² por infusión intravenosa durante 30 minutos diarios.	5 días consecutivos, comenzando el día 1 del curso de 21 días
BisfosfonatosPamidronato AlendronatoRisedronato	Tomar por vía intravenosa u oral con 6–8 onzas de agua.	60 mg o 90 mg de perfusión única durante 4 a 24 horas para corregir la hipercalcemia en pacientes con cáncer 5 mg/d al día durante 2 años y luego 10 mg/d durante 9 meses para prevenir o controlar la reabsorción ósea. 5,0 mg para prevenir o controlar la reabsorción ósea.	
Lovastatina(Mevacor™)	Oral	10–80 mg/día en una o dos dosis divididas.	

5.4.5.2. Agentes antivirales

5 Los agentes antivirales que se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa e inhibidores de la fusión. En una forma de realización, el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en amantadina, fosfato de oseltamivir, rimantadina y zanamivir. En otra forma de realización, el agente antiviral es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido seleccionado del grupo que consiste en delavirdina, efavirenz y nevirapina. En otra forma de realización, el agente antiviral es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido seleccionado del grupo que consiste en abacavir, didanosina, emtricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir DF, zalcitabina y zidovudina. En otra forma de realización, el agente antiviral es un inhibidor de proteasas seleccionado del grupo que consiste en amprenavir, atazanavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir. En otra forma de realización, el agente antiviral es un inhibidor de fusión tal como enfuvirtida.

10 Los ejemplos adicionales, no limitativos, de agentes antivirales para usar en combinación con agentes terapéuticos incluyen los siguientes: rifampicina, inhibidores de la nucleósido transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T), inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (por ejemplo, delavirdine efavirenz, nevirapine), inhibidores de la proteasa (por ejemplo, aprenavir, indinavir, ritonavir y saquinavir), idoxuridina, cidofovir, aciclovir, ganciclovir, zanamivir, amantadina y palivizumab. Otros ejemplos de agentes antivirales incluyen, entre otros, acemannan; aciclovir; aciclovir sodio; adefovir; alovudina; alvircept sudotox; clorhidrato de amantadina (SYMMETREL™); arantina; arildona mesilato de atevirdina; avridina; cidofovir; cipamilina; citarabina clorhidrato; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxaril; edoxudina; enviroxina; famciclovir; famotina clorhidrato; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; foscamet sodio; fosfonet sodio; ganciclovir; ganciclovir sodio; idoxuridina; ketoxal; lamivudina; lobucavir; memotina clorhidrato; metisazona; nevirapina; oseltamivir fosfato (TAMIFLU™); penciclovir; pirodavidir; ribavirina; clorhidrato de rimantadina (FLUMADINE™); mesilato de saquinavir; somantadina clorhidrato; sorivudina; estatolón estavudina; tilorona clorhidrato; trifluridina; valaciclovir clorhidrato; vidarabina; vidarabina fosfato; vidarabina sodio fosfato; viroxina; zalcitabina; zanamivir (RELENZA™); zidovudina; y zinviroxina.

30 5.4.5.3. Agentes antibacterianos

Los agentes antibacterianos, incluidos los antibióticos, que se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antibióticos aminoglucósidos, glicopéptidos, antibióticos de anfencol, antibióticos de ansamicina, cefalosporinas, cefamicinas oxazolidinonas, penicilinas, quinolonas, estreptogaminas, antibióticos y otros. En algunas formas de realización, los antibióticos se administran en combinación con un agente terapéutico para prevenir y/o tratar una infección bacteriana.

35 En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos se usan en combinación con otros inhibidores de la síntesis de proteínas, que incluyen, pero sin limitación, estreptomina, neomicina, eritromicina, carbomicina y espiramicina.

40 En una forma de realización, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en ampicilina, amoxicilina, ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, penicilina G, estreptomina, sulfanilamida y vancomicina. En otra forma de realización, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en azitromicina, cefonicida,

cefotetano, cefalotina, cefamicina, clortetraciclina, claritromicina, clindamicina, cicloserina, dalfopristina, doxiciclina, erytromicina, linezolid, mupirocina, oxitetraciclina, quinupristina, rifampina, espectinomicina y trimethoprim.

5 Los ejemplos adicionales, no limitativos, de agentes antibacterianos para usar en combinación con agentes terapéuticos incluyen los siguientes: antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomicina), antibióticos de anfenicol (*por ejemplo*, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos de ansamicina(*por ejemplo*, rifamiday rifampina), carbacefems(*por ejemplo*, loracarbef), carbapenems (*por ejemplo*,biapenem e imipenem), cefalosporinas (*por ejemplo*, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftiofano, cefpimizol, cefpiramiday cefpiroma), cefamicinas (*por ejemplo*,cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), análogos de ácido fólico(*por ejemplo*, trimetoprim), glicopéptidos(*por ejemplo*, vancomicina), lincosamidas (*por ejemplo*, clindamicina y lincomicina), macrólidos(*por ejemplo*, azitromicina, carbomicina, claritomicina, diritromicina, eritromicina y eritromicina acistrato), monobactams (*por ejemplo*, aztreonam, carumonam y tigemonam), nitrofuranos (*por ejemplo*, furaltadonay cloruro de furazolio), oxacefems (*por ejemplo*, flomoxef y moxalactama), oxazolidinonas (*por ejemplo*, linezolid), penicilinas (*por ejemplo*, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilinasodio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamccilina, yodhidrato de penetamato, penicilina o benetamina, penicilina 0, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina,penimepiciclinay fencihicilina potasio), quinolonas y sus análogos (*por ejemplo*,cinoxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, flumequina, grepagloxacina, levofloxacina y moxifloxacina), estreptograminas(*por ejemplo*, quinupristinay dalfopristina), sulfonamidas (*por ejemplo*, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidinay sulfacitina), sulfonas (*por ejemplo*, diatimosulfona, glucosulfona sodio ysolasulfona), y tetraciclinas(*por ejemplo*, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina ydemeclociclina). Los ejemplos adicionales incluyen cicloserina, mupirocina, tuberina anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina y 2,4–diaminopirimidinas (*por ejemplo*,brodimoprim).

25

5.5 Actividad biológica

5.5.1. Ensayos para probar la función del agente terapéutico

30 5.5.1.1. Ensayos a base de células

En este documento se describen métodos para identificar agentes que modulan la actividad de los complejos de IL–15/IL–15Ra. La actividad de un agente puede ensayarse con una línea celular sensible a IL–15, por ejemplo, células CTLL–2, una línea celular de linfoma T citotóxico de ratón (N.º de Acceso de ATCC, TIB–214) o células TF1–β. Ver, por ejemplo, la publicación internacional N.º WO 05/085282. Por ejemplo, para identificar los antagonistas de la función mediada por IL–15, la proliferación de células CTLL–2 o TF1–β cultivadas con un complejo de IL–15/IL–15Ra en presencia o ausencia de uno o más agentes terapéuticos antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) puede evaluarse mediante ensayos de incorporación de ³H–timidina bien conocidos en la técnica y descritos en la publicación internacional N.º WO 05/085282.

40

Para evaluar la actividad de los agentes terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos o ácidos nucleicos que codifican IL–15 y/o IL–15Ra y células que expresan esos polipéptidos) como agonistas, proliferación de células CTLL–2 o TF1–β cultivadas en presencia o la ausencia de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, el complejo IL–15/IL–15Ra) puede evaluarse mediante ensayos de incorporación de ³H–timidina bien conocidos en la técnica y descritos en la publicación internacional

N.° WO 05/085282.

5 Se pueden usar diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar si un agente terapéutico potencia o suprime la función inmune. En un aspecto, el agente terapéutico aumenta una respuesta inmune que puede ser, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una respuesta inmune celular, por ejemplo, la secreción de citoquinas (por ejemplo, interferón- γ), la actividad de células helper o la citotoxicidad celular. En una forma de realización, el aumento de la respuesta inmune es el aumento de la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T y/o la proliferación de células NK. Varios ensayos para medir tales actividades son bien conocidos en la técnica, y a continuación se proporcionan descripciones ejemplares de dichos ensayos.

10 Por ejemplo, los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Sección 2.1 de *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.), John Wiley and Sons, Inc. 1997. Se puede usar ELISA, por ejemplo, para analizar la cantidad o concentración de polipéptido de IL-15 o IL-15Ra.

15 En otro método, el ensayo de "tinción de tetrámeros" (Altman et al., 1996, *Science* 274: 94-96) se puede usar para identificar células T específicas de antígeno y para evaluar cómo modulan los agentes terapéuticos (por ejemplo, mejorar o suprimir) respuestas de células T específicas de antígeno. Por ejemplo, una molécula MHC que contiene un antígeno peptídico específico, tal como un antígeno específico de tumor, se multimeriza para hacer tetrámeros peptídicos solubles y se marca, por ejemplo, formando complejos con estreptavidina. El complejo de antígeno péptido MHC se mezcla luego
20 con una población de células T obtenida de un sujeto administrado con una composición inmunogénica sola o en combinación con un agente terapéutico. La biotina se usa para teñir las células T que expresan el antígeno específico de tumor de interés.

25 Además, utilizando el ensayo de cultivo objetivo de linfocitos mixtos, la citotoxicidad de las células T se puede probar en un ensayo de liberación de ^{51}Cr como se describe, por ejemplo, en Palladino et al., 1987, *Cancer Res.* 47: 5074-5079. Brevemente, el cultivo mixto de linfocitos se agrega a una suspensión de células objetivo para proporcionar diferentes relaciones efector:diana (E:T) (generalmente de 1:1 a 40:1). Las células objetivo se marcan previamente incubando 1×10^6 células objetivo en medio de cultivo que contiene 500 μCi de ^{51}Cr por ml durante una hora a 37 °C. Las células se lavan tres veces siguiendo el etiquetado. Cada punto de ensayo (relación E:T) se realiza por triplicado y los controles apropiados
30 se incorporan para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr (no se agregaron linfocitos al ensayo) y el 100% de liberación (las células se lisaron con detergente). Después de incubar las mezclas de células durante 4 horas, las células se sedimentan mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. La cantidad de ^{51}Cr liberada en el sobrenadante se mide mediante un contador gamma. El porcentaje de citotoxicidad se mide como cpm en la muestra de prueba menos cpm liberados espontáneamente dividido por el total de detergente liberado cpm menos cpm liberados espontáneamente.

35 En otra forma de realización, se puede usar un ensayo ELISPOT para medir la liberación de citoquinas in vitro por células T después de la administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico a un sujeto. La liberación de citoquinas es detectada por anticuerpos que son específicos para una citoquina particular, por ejemplo, interleuquina-2, factor de necrosis tumoral y o interferón- γ (ver, por ejemplo, Scheibenbogen et al., 1997, *Int. J. Cancer* 71: 932-936). El ensayo se
40 lleva a cabo en una placa de microtitulación que ha sido recubierta previamente con un anticuerpo específico para una citoquina de interés que captura la citoquina secretada por las células T. Después de la incubación de células T durante 24 a 48 horas en los pocillos recubiertos, las células T se extraen y se reemplazan con un segundo anticuerpo marcado que reconoce un epítipo diferente en la citoquina. Después de un lavado exhaustivo para eliminar el anticuerpo no unido, se agrega a la placa un sustrato de enzima que produce un producto de reacción coloreado. El número de células

productoras de citoquinas se cuenta bajo un microscopio. Este método tiene las ventajas del tiempo de ensayo corto y la sensibilidad sin la necesidad de un gran número de células T citotóxicas.

5 En algunos aspectos, la respuesta inmune inducida o mejorada por un agente terapéutico agonista se mejora o aumenta en al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, o 12 veces con respecto a una respuesta inmune provocada por un control negativo según lo determinado por cualquier ensayo conocido en la técnica. En determinadas formas de realización, la respuesta inmune inducida por el agente terapéutico agonista se potencia en al menos 0,5–2 veces, al menos 2–5 veces, al menos 5–10 veces, al menos 10–50 veces, al menos 50–100 veces, al menos 100–200 veces, al menos 200–300 veces, al menos 300–400 veces o al menos 400–500 veces en relación con la respuesta inmune inducida por un control negativo según lo probado por cualquier método conocido en la técnica. En formas de realización específicas, el ensayo utilizado para evaluar la respuesta inmune mide el nivel de producción de anticuerpos, la producción de citoquinas o la citotoxicidad celular, y dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el ensayo utilizado para medir la respuesta inmune es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que determina los niveles de anticuerpos o citoquinas, un ensayo ELISPOT 10 que determina la liberación de citoquinas o un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que determina la citotoxicidad celular. 15

En formas de realización específicas, el agente terapéutico agonista induce o mejora una respuesta inmune en un sujeto que se mide por el título de anticuerpos en el suero del sujeto, y el título de anticuerpos es al menos de 0,2 a 5 veces, de 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces más alto en comparación con el título de anticuerpos en el suero de un sujeto al que se le administró un control negativo. En formas de realización específicas, el título medio de anticuerpos séricos contra el antígeno en el sujeto administrado con el agente terapéutico agonista se incrementa en al menos 0,5–2 veces, al menos 2–5 veces, al menos 5–10 veces, al menos 10–50 veces, al menos 50–100 veces, al menos 100–200 veces, al menos 200–300 veces, al menos 300–400 veces o al menos 400–500 veces en relación con el título medio de anticuerpos séricos en el sujeto administrado un control negativo como se determina por métodos bien conocidos en la técnica. 20 25

En el presente documento se describen métodos para administrar agentes terapéuticos agonistas para inducir o aumentar el nivel de producción o secreción de citoquinas, por ejemplo, interferón- γ (que puede ser de 0,5 a 500 veces más alto) en comparación con el nivel de producción o secreción de citoquinas en una muestra de control negativo. En formas de realización específicas, el agente terapéutico agonista induce o mejora una respuesta inmune que se mide al aumentar la liberación de citoquinas, y la concentración de citoquinas es de al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces más en comparación con la concentración de citoquinas de un control negativo. En formas de realización específicas, la concentración sérica media de citoquinas de las muestras obtenidas de un sujeto al que se le administró el agente terapéutico agonista se incrementa al menos entre 0,5 y 2 veces, al menos entre 2 y 5 veces, al menos entre 5 y 10 veces, al menos entre 10 y 50 veces, al menos 50–100 veces, al menos 100–200 veces, al menos 200–300 veces, al menos 300–400 veces o al menos 400–500 veces en relación con la concentración sérica media de citoquinas de muestras obtenidas de un sujeto a quien se le administró un control negativo según lo determinado por métodos bien conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el control negativo pueden ser muestras del sujeto antes de la administración del agente terapéutico agonista. 30 35 40

En formas de realización específicas, el agente terapéutico agonista induce o mejora la proliferación de células NK en un sujeto que por al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces mayor en relación con la proliferación de células NK en un control negativo. En formas de realización específicas, el agente terapéutico induce o mejora la proliferación de células T en un sujeto que por lo menos

0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces mayor en relación con la proliferación de células T en un control negativo según lo determinado por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, tinción con CSFE, incorporación de ³H-timidina.

5 El aumento en el anticuerpo (humoral) o la respuesta inmune celular inducida por una cantidad efectiva del agente terapéutico se puede evaluar usando varios métodos bien conocidos en la técnica.

10 Para evaluar la actividad de un agente terapéutico antagonista que es un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al complejo de IL-15/IL-15Ra, se puede llevar a cabo un ensayo de cultivo celular para determinar la capacidad del anticuerpo para reducir la afinidad de unión del complejo de IL-15/IL-15Ra al complejo del receptor β expresado en la superficie de las células. Las células que expresan de manera endógena o recombinante el complejo del receptor β se pueden usar en este ensayo. Las células se ponen en contacto con el complejo de IL-15/IL-15Ra en presencia o ausencia del anticuerpo del agente terapéutico antagonista. El complejo de IL-15/IL-15Ra está marcado con un fluoróforo, radioisótopo u otros marcadores de detección, y el nivel de unión del complejo de IL-15/IL-15Ra marcado al complejo del receptor β expresado en la superficie celular de las células es ensayado en presencia y ausencia del anticuerpo usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, marcadores fluorescentes de citometría de flujo u otras máquinas compatibles para detectar el marcador de detección. En una forma de realización específica, el anticuerpo del agente terapéutico antagonista reduce la cantidad de complejos de IL-15/IL-15Ra marcados que se unen al complejo del receptor β en la superficie celular.

20 5.5.1.2 Ensayos *in vitro*

25 La identificación de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al complejo de IL-15/IL-15Ra se puede evaluar utilizando cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, ELISA, coinmunoprecipitación, ensayos Biacore y ensayos KinEx A.

30 Se pueden usar ensayos de unión para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a complejos de IL-15/IL-15Ra. Los ensayos de unión pueden realizarse como ensayos de unión directa o como ensayos de unión de la competencia. La unión puede detectarse mediante ELISA estándar o ensayos estándar de citometría de flujo. En un ensayo de unión directa, un anticuerpo candidato se analiza para determinar su unión al complejo de IL-15/IL-15Ra.

Los ensayos de unión de competición, por otro lado, evalúan la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo conocido u otro compuesto que se une a complejos de IL-15/IL-15Ra.

35 En un ensayo de unión directa, el complejo de IL-15/IL-15Ra se pone en contacto con un anticuerpo candidato en condiciones que permiten la unión del anticuerpo candidato a los complejos de IL-15/IL-15Ra. La unión puede tener lugar en solución o sobre una superficie sólida. Preferentemente, el anticuerpo candidato se marca previamente para detección. Cualquier compuesto detectable se puede usar para marcar, tal como, entre otros, un isótopo luminiscente, fluorescente o radioactivo o un grupo que contenga el mismo, o un marcador no isotópico, como una enzima o tinte. Después de un período de incubación suficiente para que se produzca la unión, la reacción se expone a condiciones y manipulaciones que eliminan el exceso o el anticuerpo no específicamente unido. Por lo general, se trata de lavar con un tampón adecuado. Finalmente, se detecta la presencia de un complejo de anticuerpos IL-15/IL-15Ra.

En un ensayo de unión de competición, un anticuerpo candidato se evalúa por su capacidad para inhibir o desplazar la

5 unión de un anticuerpo complejo conocido anti-IL-15/IL-15Ra (u otro compuesto) al complejo de IL-15/IL-15Ra. Un aglutinante conocido marcado de complejo de IL-15/IL-15Ra puede mezclarse con el anticuerpo candidato y colocarse en condiciones en las que normalmente se produciría la interacción entre ellos, con y sin la adición del anticuerpo candidato. La cantidad de aglomerante conocido marcado del complejo de IL-15/IL-15Ra que se une al complejo de IL-15/IL-15Ra puede compararse con la cantidad unida en presencia o ausencia del anticuerpo candidato.

10 En una forma de realización, el ensayo de unión se lleva a cabo con uno o más componentes inmovilizados sobre una superficie sólida para facilitar la formación y detección del complejo de antígeno de anticuerpo. En diversas formas de realización, el soporte sólido podría ser, pero sin limitación, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, vidrio, nitrocelulosa, dextrano, nylon, poliácridamida y agarosa. La configuración de soporte puede incluir perlas, membranas, micropartículas, la superficie interior de un recipiente de reacción, como una placa de microtitulación, un tubo de ensayo u otro recipiente de reacción. La inmovilización del complejo de IL-15/IL-15Ra, u otro componente, se puede lograr mediante uniones covalentes o no covalentes. En una forma de realización, la unión puede ser indirecta, es decir, a través de un anticuerpo unido. En otra forma de realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra y los controles negativos están marcados con un epítipo, como la glutatión S-transferasa (GST), de modo que la unión a la superficie sólida puede estar mediada por un anticuerpo disponible comercialmente como el anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

20 Por ejemplo, tal ensayo de unión por afinidad se puede realizar utilizando el complejo de IL-15/IL-15Ra que está inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, el componente no movilizado de la reacción de unión, en este caso el anticuerpo anti-complejo anti-IL-15/IL-15Ra, se marca para permitir la detección. Hay una variedad de métodos de marcado disponibles y se pueden usar, tales como isótopos luminiscentes, cromóforos, fluorescentes o radiactivos que contienen los mismos y marcadores no isotópicos, como enzimas o colorantes. En una forma de realización, el anticuerpo candidato está marcado con un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC, disponible en Sigma Chemicals, St. Louis). Dicho ensayo de unión por afinidad se puede realizar utilizando el antígeno del complejo de IL-15/IL-15Ra inmovilizado sobre una superficie sólida. Los anticuerpos se incuban con el antígeno y la unión específica de los anticuerpos se detecta mediante métodos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, los análisis BiaCore, ELISA, FMET y RIA.

30 Finalmente, la marca que permanece en la superficie sólida se puede detectar mediante cualquier método de detección conocido en la técnica. Por ejemplo, si el anticuerpo candidato está marcado con un fluoróforo, se puede usar un fluorímetro para detectar complejos.

35 En una forma de realización, el anticuerpo se agrega a los ensayos de unión en forma de células intactas que expresan el antígeno del complejo de IL-15/IL-15Ra, o membranas aisladas que contienen complejo de IL-15/IL-15Ra. Por lo tanto, la unión directa al antígeno del complejo de IL-15/IL-15Ra puede ensayarse en células intactas en cultivo o en modelos animales en presencia y ausencia del anticuerpo candidato. Un anticuerpo candidato marcado puede mezclarse con células que expresan el complejo de IL-15/IL-15Ra humano, o con extractos crudos obtenidos de dichas células, y puede agregarse el anticuerpo candidato. Se pueden usar membranas aisladas para identificar los anticuerpos candidatos que interactúan con el complejo de IL-15/IL-15Ra. Por ejemplo, en un experimento típico que usa membranas aisladas, las células pueden ser modificadas genéticamente para expresar el antígeno del complejo de IL-15/IL-15Ra. Las membranas pueden recogerse mediante técnicas estándar y utilizarse en un ensayo de unión in vitro. El anticuerpo candidato marcado (por ejemplo, un anticuerpo marcado fluorescente) se une a las membranas y se analiza para determinar la actividad específica; la unión específica se determina por comparación con los ensayos de unión realizados en presencia de un exceso de anticuerpo candidato (frío) no marcado. Alternativamente, el complejo de IL-15/IL-15Ra

soluble puede expresarse y utilizarse de forma recombinante en ensayos no basados en células para identificar anticuerpos que se unen al complejo de IL-15/IL-15Ra. Los polipéptidos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma recombinante se pueden usar en los ensayos de selección no basados en células.

5 Alternativamente, la reacción de unión se puede llevar a cabo en solución. En este ensayo, se permite que el componente marcado interactúe con sus parejas de unión en solución. Si las diferencias de tamaño entre el componente marcado y sus parejas de unión permiten tal separación, la separación puede lograrse pasando los productos de la reacción de unión a través de un ultrafiltro cuyos poros permiten el paso del componente marcado no unido pero no de su pareja de unión o de componente etiquetado unido a su pareja de unión. La separación también se puede lograr utilizando cualquier reactivo capaz de capturar una pareja de unión del componente marcado de la solución, como un anticuerpo contra la pareja de unión y así sucesivamente.

10 En otra forma de realización específica, el soporte sólido es una membrana que contiene el complejo de IL-15/IL-15Ra unido a una placa de microtitulación. Los anticuerpos candidatos, por ejemplo, pueden unir células que expresan anticuerpos de biblioteca cultivados en condiciones que permiten la expresión de los miembros de la biblioteca en la placa de microtitulación. Los miembros de la biblioteca que se unen al complejo de IL-15/IL-15Ra se recolectan. Tales métodos generalmente se describen a modo de ejemplo en Parmley y Smith, 1988, *Gene*, 73: 305-318; Fowlkes et al., 1992, *BioTechniques*, 13: 422-427; publicación PCT N.º WO94/18318; y en las referencias citadas anteriormente.

15 Varios métodos descritos anteriormente o conocidos en la técnica se pueden adaptar para analizar la afinidad de unión de los derivados de IL-15 a los derivados de IL-15Ra, IL-15Ra nativos a los derivados de IL-15, IL-15 nativos a los derivados de IL-15Ra, y los complejos de IL-15/IL-15Ra al complejo receptor $\beta\gamma$.

5.5.2 Modelos animales

25 Los agentes terapéuticos se ensayan preferentemente in vivo para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, en una forma de realización, se puede administrar un agente terapéutico al animal al mismo tiempo que la aparición de una enfermedad o trastorno en el animal. En otra forma de realización, se puede administrar un agente terapéutico al animal antes de la aparición de una enfermedad o trastorno en el animal. En otra forma de realización, se puede administrar un agente terapéutico al animal después de la aparición de una enfermedad o trastorno en el animal. En una forma de realización específica, el agente terapéutico se administra al animal más de una vez. En otra forma de realización específica, el agente terapéutico se administra en combinación con otra terapia.

30 El agente terapéutico puede probarse en sistemas de modelos animales que incluyen, pero sin limitación, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, cabras, ovejas, perros, conejos, cobayos, etc. En una forma de realización específica, los agentes terapéuticos se prueban en un sistema de modelo de ratón. Tales sistemas modelo son ampliamente utilizados y bien conocidos por los expertos en la técnica.

35 En determinadas formas de realización, a un animal, tal como ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad, se les administran ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra mediante inyección hidrodinámica y se evalúan los niveles plasmáticos de IL-15 y/o la bioactividad de IL-15. En resumen, a los animales (por ejemplo, a los ratones) se les inyecta el plásmido IL-15 solo o en combinación con el plásmido IL-15Ra en NaCl al 0,9% estéril a través de la vena de la cola en 7 segundos utilizando una aguja de calibre 27,5. Los ratones se sangran después de un cierto número de días (por

ejemplo, el día 1 y el día 3) después de la inyección y los niveles plasmáticos de IL-15 se miden utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo quimioluminiscente IL-15 (QuantiGlo, R&D systems). Después de un cierto número de días (por ejemplo, 3 días) después de la inyección, los ratones se sacrifican y se recogen y analizan el hígado, los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos para evaluar la bioactividad de la IL-15. Para hacer suspensiones de células individuales, los bazos se aprietan suavemente a través de un filtro de células de 100 µm (Thomas) y se lavan en RPMI (Gibco) para eliminar cualquier estroma de órgano restante. Las células se resuspenden en medio (por ejemplo, RPMI que contiene un 10% de suero de ternera fetal (FCS)) y se cuentan utilizando, por ejemplo, colorante de acridina naranja (Molecular Probes)/bromuro de etidio (Fisher). El pulmón y el hígado se trocean y se incuban con colagenasa (Sigma) y DNasa (Roche) durante un período de tiempo (por ejemplo, 1 hora) a 37 °C para obtener suspensiones de células individuales. Las células individuales se recolectan y se resuspenden en medios (por ejemplo, RPMI completo con 10% de FCS). La bioactividad de IL-15 in vivo puede medirse en hígado, pulmón y bazo utilizando citometría de flujo multicolor. Brevemente, las células se lavan en tampón FACS que contiene 0,2% de FCS y se tiñen con el siguiente panel de anticuerpos anti-ratón de rata conjugados: CD3-APCCy7, CD4-PerCP, CD8-PECy7, CD44-APC, CD49b-FITC y CD62L-PE (BD Pharmingen). Las muestras se obtienen utilizando FACSaria (BD) y los datos se analizan con el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

La actividad anticancerígena del agente terapéutico puede determinarse utilizando diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer bien conocido en la técnica como se describe en, por ejemplo, *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig and Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven and Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher).

Se pueden usar modelos animales para el cáncer para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico. Los ejemplos no limitativos de modelos animales para el cáncer de pulmón incluyen, pero sin limitación, los modelos animales de cáncer de pulmón descritos por Zhang & Roth (1994, *In vivo* 8 (5): 755-69) y un modelo de ratón transgénico con función p53 alterada (ver, por ejemplo, Morris et al, 1998, *J La State Med Soc* 150 (4): 179-85). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de mama incluye, pero sin limitación, un ratón transgénico que sobreexpresa la ciclina D1 (ver, por ejemplo, Hosokawa et al., 2001, *Transgenic Res* 10 (5): 471-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de colon incluye, pero sin limitación, un ratón knock-out TCR- β y p53 (ver, por ejemplo, Kado et al, 2001, *Cancer Res* 61 (6): 2395-8). Los ejemplos de modelos animales para el cáncer de páncreas incluyen, pero sin limitación, un modelo metastásico de adenocarcinoma pancreático murino Panc02 (ver, por ejemplo, Wang et al, 2001, *Int J Pancreatol* 29 (1): 37-46) y ratones nu- ν generados en tumores pancreáticos subcutáneos (ver, por ejemplo, Ghaneh et al., 2001, *Gene Ther* 8 (3): 199-208). Los ejemplos de modelos animales para el linfoma no Hodgkin incluyen, pero sin limitación, un ratón con inmunodeficiencia combinada grave ("SCID") (ver, por ejemplo, Bryant et al., 2000, *Lab Invest* 80 (4): 553-73) y un ratón transgénico IgH μ -HOX1 (ver, por ejemplo, Hough et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (23): 13853-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de esófago incluye, entre otros, un ratón transgénico para el oncogén E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (ver, por ejemplo, Herber et al., 1996, *J Virol* 70 (3): 1873-81). Los ejemplos de modelos animales para carcinomas colorrectales incluyen, pero sin limitación, modelos de ratón Ape (ver, por ejemplo, Fodde & Smits, 2001, *Trends Mol Med* 7 (8): 369-73) y Kuraguchi et al, 2000, *Oncogene* 19 (50): 5755-63).

En los modelos animales de enfermedades infecciosas, la efectividad de un agente terapéutico en relación con un control negativo puede evaluarse en animales infectados con virus. Las muestras obtenidas de estos animales (por ejemplo, muestra de suero, orina, esputo, semen, saliva, plasma o tejido) pueden analizarse para mejorar la función inmune, por

- ejemplo, potenciación de la liberación de citoquinas, potenciación en la producción de anticuerpos, proliferación de células T, proliferación de células NK, con métodos bien conocidos en la técnica y descritos en este documento. Las muestras obtenidas de estos animales (por ejemplo, muestra de suero, orina, esputo, semen, saliva, plasma o tejido) también pueden analizarse para determinar la reducción de la replicación viral mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos que miden la replicación viral alterada (según lo determinado, por ejemplo, por formación de placa) o la producción de proteínas virales (según lo determinado, por ejemplo, mediante Western blot, ELISA o análisis de citometría de flujo) o ácidos nucleicos virales (según lo determinado, por ejemplo, por RT-PCR, análisis de northern blots o southern blots). Para la cuantificación del virus en muestras de tejido, las muestras de tejido se homogeneizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y las diluciones de los homogeneizados clarificados se adsorben durante 1 hora a 37 °C en monocapas de células (por ejemplo, células Vero, CEF o MDCK). En otros ensayos, las evaluaciones histopatológicas se realizan después de la infección, preferentemente las evaluaciones del órgano del que se sabe que el virus se dirige a la infección. La inmunohistoquímica de virus se puede realizar con un anticuerpo monoclonal específico de virus. Los modelos animales no limitativos descritos a continuación se pueden adaptar para otros sistemas virales.
- 5
- 10
- 15 Se pueden emplear diversos modelos animales para enfermedades infecciosas que son bien conocidos en la técnica para evaluar la eficacia de los agentes terapéuticos en la prevención, tratamiento y/o manejo de enfermedades infecciosas, por ejemplo: modelos de ratón del virus del herpes simple (VHS) son descritos en Crute et al., *Nature Medicine*, 2002, 8: 386–391 y Bolger et al., *Antiviral Res.*, 1997, 35: 157–165; los modelos de cobayo de HSV se describen en Chen et al., *Viol. J.*, 2004, 23 de noviembre, 1:11; los modelos animales de citomegalovirus de ratón (MCMV) y citomegalovirus humano (HCMV) se describen en Kern et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48: 4745–4753; los modelos de cobayos de CMV se describen en Bourne et al., *Antiviral Res.*, 2000,47: 103–109, Bravo et al., *Antiviral Res.*, 2003, 60: 41–49 y Bravo et al., *J. Infectious Diseases*, 2006, 193: 591–597; los modelos animales del virus de la influenza se describen en Sidwell et al., *Antiviral Res.*, 2000, 48: 1–16; y McCauley et al., *Antiviral Res.*, 1995, 27: 179–186; los modelos de ratón del virus de la hepatitis B (VHB) se describen en Cavanaugh et al., *J. Virol.*, 1997,71: 3236–3243 y Guidotti et al., *J. Virol.*, 1995,69: 6158–6169; los modelos de ratón del virus de la hepatitis C (VHC) se describen en Zhu et al., *Antimicrobial Agents and Chemother.*, 2006, 50: 3260–3268, Bright et al., *Nature*, 2005,436: 973–978, Hsu et al., *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21: 519–525, Ilan et al., *J. Infect. Dis.* 2002,185: 153–161, Kneteman et al., *Hepatology*, 2006,43: 1346–1353, Mercer et al., *Nat. Med.*, 2001,7: 927–933, y Wu et al., *Gastroenterology*, 2005, 128: 1416–1423; modelos animales de VIH se describen en Ayash–Rashkovsky et al., *FASEB J.*, 2005, 19: 1149–1151, Mosier et al., *Semin. Immunol.*, 1996, 8: 255–262, Mosier et al., *Hosp. Pract. (Off Ed.)*, 1996, 31: 41–48, 53–55, 59–60, Bonyhadi et al., *Mol. Medicina. Hoy*, 1997, 3: 246–253, Jolicœur et al., *Leukemia*, 1999,13: S78–S80, Browning et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1997, 94: 14637–14641, y Sawada et al., *J. Exp. Med.*, 1998,187: 1439–1449, y Schito et al., *Curr. Res. VIH*, 2006,4: 379–386.
- 20
- 25
- 30
- 35 También se pueden usar otros modelos animales para infecciones virales para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico, por ejemplo, modelos animales para infecciones virales como enfermedades asociadas al EBV, gammaherpesvirus, mononucleosis infecciosa, virus de inmunodeficiencia de simios (“SIV”), infección por el virus de la enfermedad de Borna, hepatitis, infección por el virus de la varicela, neumonitis viral, patogénesis del virus de Epstein–Barr, virus de
- 40 inmunodeficiencia felina (“FIV”), infección por HTLV tipo 1, rotavirus humanos y se han desarrollado herpes genitales (ver, por ejemplo, Hayashi et al., 2002, *Histol Histopathol* 17 (4): 1293–310; Arico et al., 2002, *J Interferon Cytokine Res* 22 (11): 1081–8; Flano et al., 2002, *Immunol Res* 25 (3): 201–17; Sauermann, 2001, *Curr Mol Med* 1 (4): 515–22; Pletnikov et al., 2002, *Front Biosci* 7: d593–607; Engler et al., 2001, *Mol Immunol* 38 (6): 457–65; White et al., 2001, *Brain Pathol* 11 (4): 475–9; Davis & Matalon, 2 001, *Noticias Physiol Sci* 16: 185–90; Wang, 2001, *Curr Top Microbiol Immunol.* 258: 201–19;

Phillips et al., 2000, *J Psychopharmacol.* 14 (3): 244–50; Kazanji, 2000, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16 (16): 1741–6; Saif et al., 1996, *Arch Virol Suppl.* 12: 153–61; y Hsiung et al., 1984, *Rev Infect Dis.* 6 (1): 33–50).

5 Otros modelos animales para infecciones respiratorias virales incluyen, pero sin limitación, PIV (ver, por ejemplo, Shephard et al., 2003 *Res Vet Sci* 74 (2): 187–190; Ottolini et al., 2002 *J Infect Dis* 186 (12): 1713–1717), y RSV (ver, por ejemplo, Culley et al., 2002 *J Exp Med* 196 (10): 1381–1386; y Curtis et al., 2002 *Exp Biol Med* 227 (9): 799–802).

10 El agente terapéutico, la composición del mismo, o la terapia de combinación que comprende el agente terapéutico puede someterse a prueba para determinar su capacidad para disminuir el curso temporal de la infección viral.

15 Los modelos animales para infecciones bacterianas también pueden usarse para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico. Modelos animales para infecciones bacterianas como infección por *H. pylori*, micoplasmosis genital, colangitis esclerosante primaria, cólera, infección pulmonar crónica con *Pseudomonas aeruginosa*, enfermedad de los legionarios, enfermedad de úlcera gastroduodenal, meningitis bacteriana, infección por *Helicobacterias* gástricas, otitis media neumocócica, alergia experimental, neuritis, neuropatía leprosa, infección micobacteriana, endocarditis, enteritis asociada a *Aeromonas*, infección por *Bacteroides fragilis*, sífilis, endocarditis estreptocócica, osteomielitis hematógena aguda, tifus de sarampión humano, síndrome del shock tóxico, infecciones anaeróbicas, infecciones por *Escherichia Coli* y una variedad de productos (ver, por ejemplo, Sugiyama et al., 2002, *J Gastroenterol.* 37 Suppl 13:6–9; Brown et al., 2001, *Am J Reprod Immunol.* 46(3):232–41; Vierling, 2001, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 15(4):591–610; Klose, 2000, *Trends Microbiol.* 8(4): 189–91; Stotland et al., 2000, *Pediatr Pulmonol.* 30(5):413–24; Brieland et al., 2000, *Immunopharmacology* 48(3):249–52; Lee, 2000, *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 14(1):75–96; Koedel & Pfister, 1999, *Infect Dis Clin North Am.* 13(3):549–77; Nedrud, 1999, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 24(2):243–50; Prellner et al., 1999, *Microb Drug Resist.* 5(1):73–82; Vriesendorp, 1997, *J Infect Dis.* 176 Suppl 2:S164–8; Shetty & Antia, 1996, *Indian J Lepr.* 68(1):95–104; Balasubramanian et al., 1994, *Immunobiology* 191 (4–5):395–401; Carbon et al., 1994, *Int J Biomed Comput.* 36(1–2):59–67; Haberberger et al., 1991, *Experientia.* 47(5):426–9; Onderdonk et al., 1990, *Rev Infect Dis.* 12 Suppl 2:S 169–77; Wicher & Wicher, 1989, *Crit Rev Microbiol.* 16(3): 181–234; Scheld, 1987, *J Antimicrob Chemother.* 20 Suppl A:71–85; Emslie & Nade, 1986, *Rev Infect Dis.* 8(6):841–9; Ridgway et al., 1986, *Lab Anim Sci.* 36(5):481–5; Quimby & Nguyen, 1985, *Crit Rev Microbiol.* 12(1): 1–44; Onderdonk et al., 1979, *Rev Infect Dis.* 1(2):291–301; Smith, 1976, *Ciba Found Symp.* (42):45–72, and Taylor–Robinson, 1976, *Infection.* 4(1 Suppl):4–8).

35 El agente terapéutico, la composición del mismo, o la terapia de combinación que comprende el agente terapéutico puede probarse para determinar su capacidad para disminuir el curso temporal de la infección bacteriana, por ejemplo, una infección bacteriana respiratoria en al menos un 25%, al menos un 50%, al menos el 60%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95%, o al menos el 99% con respecto a un control negativo utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

40 La eficacia de los agentes terapéuticos, composiciones de los mismos, o terapias de combinación que comprenden agentes terapéuticos para la prevención, tratamiento y/o manejo de una infección fúngica puede evaluarse en modelos animales para tales infecciones. Se han desarrollado modelos animales para infecciones fúngicas, tales como infecciones por *Candida*, cigomicosis, *Candida mastitis*, trihosporonosis diseminada progresiva con tricosporonemia latente, candidiasis diseminada, paracoccidioidomicosis pulmonar, aspergilosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, meningitis criptocócica, meningoencefalitis coccidioidal y vasculitis cerebroespinal, infección por *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, micosis del seno paranasal, endocarditis por *Aspergillus fumigatus*, discondroplasia tibial, vaginitis por

Candida glabrata, candidiasis orofaríngea, enfermedad granulomatosa crónica ligada a X, tinea pedis, candidiasis cutánea, placentitis micótica, tricosporonosis diseminada, aspergilosis broncopulmonar alérgica, queratitis micótica, infección por *Cryptococcus neoformans*, peritonitis fúngica, infección por *Curvularia geniculata*, endoftalmitis estafilocócica, esporotricosis y dermatofitosis (ver, por ejemplo, Arendrup *et al.*, 2002, *Infection* 30(5):286–91; Kamei, 2001, *Mycopathologia* 152(1):5–13; Guhad *et al.*, 2000, *FEMS Microbiol Lett.* 192(1):27–31; Yamagata *et al.*, 2000, *J Clin Microbiol.* 38(9):32606; Andrutis *et al.*, 2000, *J Clin Microbiol.* 38(6):2317–23; Cock *et al.*, 2000, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42(2):59–66; Shibuya *et al.*, 1999, *Microb Pathog.* 27(3): 123–31; Beers *et al.*, 1999, *J LabClin Med.* 133(5):423–33; Najvar *et al.*, 1999, *Antimicrob Agents Chemother.* 43(2):413–4; Williams *et al.*, 1988, *J Infect Dis.* 178(4): 1217–21; Yoshida, 1988, *Kansenshogaku Zasshi.* 1998 Jun;72(6):621–30; Alexandrakis *et al.*, 1998, *Br J Ophthalmol.* 82(3):306–11; Chakrabarti *et al.*, 1997, *J Med Vet Mycol.* 35(4):295–7; Martin *et al.*, 1997, *Antimicrob Agents Chemother.* 41(1): 13–6; Chu *et al.*, 1996, *Avian Dis.* 40(3):715–9; Fidel *et al.*, 1996, *J Infect Dis.* 173(2):425–31; Cole *et al.*, 1995, *FEMS Microbiol Lett.* 15; 126(2): 177–80; Pollock *et al.*, 1995, *Nat Genet.* 9(2):202–9; Uchida *et al.*, 1994, *Jpn J Antibiot.* 47(10):1407–12; Maebashi *et al.*, 1994, *J Med Vet Mycol.* 32(5):349–59; Jensen & Schonheyder, 1993, *J Exp Anim Sci.* 35(4): 155–60; Gokaslan & Anaissie, 1992, *Infect Immun.* 60(8):3339–44; Kurup *et al.*, 1992, *J Immunol.* 148(12):3783–8; Singh *et al.*, 1990, *Mycopathologia.* 112(3):127–37; Salkowski & Balish, 1990, *Infect Immun.* 58(10):3300–6; Ahmad *et al.*, 1986, *Am J Kidney Dis.* 7(2): 153–6; Altire–Werber E, Edberg SC, 1985, *Mycopathologia.* 89(2):69–73; Kane *et al.*, 1981, *Antimicrob Agents Chemother.* 20(5):595–9; Barbee *et al.*, 1977, *Am J Pathol.* 86(1):281–4; and Maestrone *et al.*, 1973, *Am J Vet Res.* 34(6):833–6). Modelos animales para infecciones respiratorias fúngicas tales como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, aspergilosis pulmonar invasiva, *Pneumocystis carinii*, criptococcosis pulmonar, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cunninghamella bertholletia* (ver, por ejemplo, Aratani *et al.*, 2002 *Med Mycol* 40(6):557–563; Bozza *et al.*, 2002 *Microbes Infect* 4(13): 1281–1290; Kurup *et al.*, 2002 *Int Arch Allergy Immunol* 129(2):129–137; Hori *et al.*, 2002 *Eur J Immuno* 32(5): 1282–1291; Rivera *et al.*, 2002 *J Immuno* 168(7): 3419–3427; Vassallo *et al.*, 2001, *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(2): 203–211; Wilder *et al.*, 2002 *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(3): 304–314; Yonezawa *et al.*, 2000 *J Infect Chemother* 6(3): 155–161; Cacciapuoti *et al.*, 2000 *Antimicrob Agents Chemother* 44(8): 2017–2022; and Honda *et al.*, 1998 *Mycopathologia* 144(3): 141–146).

Los agentes terapéuticos, las composiciones de los mismos o las terapias combinadas que comprenden agentes terapéuticos pueden probarse para determinar su capacidad para disminuir el curso de la infección respiratoria por hongos en al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 75%, al menos 85%, al menos 95% o al menos 99%. Las técnicas conocidas por los expertos en la técnica pueden usarse para analizar la función de los agentes terapéuticos, las composiciones de los mismos o las terapias de combinación que comprenden agentes terapéuticos in vivo.

Los modelos animales para trastornos autoinmunes también pueden usarse para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, su composición, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunes como diabetes tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders *et al.*, 1999, *Autoimmunity* 29: 235–246; Krogh *et al.*, 1999, *Biochimie* 81: 511–515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19:12–24).

La eficacia en la prevención, tratamiento y/o manejo de un trastorno autoinmune puede demostrarse, por ejemplo, detectando la capacidad de un anticuerpo, una composición o una terapia de combinación descrita en el presente documento para reducir uno o más síntomas del trastorno autoinmune, para reducir el recuento linfocítico medio absoluto, disminuir la activación de células T, disminuir la proliferación de células T, reducir la producción de citoquinas o modular uno o más perfiles de citoquinas en particular. La eficacia en la prevención o el tratamiento de la psoriasis se puede

5 demostrar, por ejemplo, al detectar la capacidad de un agente terapéutico o de su composición para reducir uno o más síntomas de la psoriasis, para reducir el recuento linfocítico medio absoluto, para reducir la producción de citoquinas, para modular uno o más en particular perfiles de citoquinas, para disminuir la descamación, para disminuir el eritema, para disminuir la elevación de la placa, para disminuir la activación de las células T en la dermis o epidermis de un área afectada, para disminuir la infiltración de células T en la dermis o epidermis de un área afectada, para reducir PASI, para mejorar el puntaje de evaluación global del médico, o para mejorar la calidad de vida.

10 La actividad antiinflamatoria de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico se puede determinar utilizando varios modelos experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford LJ y Wilder RL. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También se pueden usar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes para evaluar la actividad antiinflamatoria de los agentes terapéuticos, composiciones de los mismos, o terapias combinadas que comprenden agentes terapéuticos.

15 La actividad antiinflamatoria de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenina en la rata, utilizando una modificación del método descrito en Winter CA et al., "Carrageenan Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* III, 544–547, (1962). Este ensayo se ha utilizado como una prueba primaria in vivo para detectar la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia humana. La actividad antiinflamatoria de las terapias de prueba (por ejemplo, los agentes terapéuticos, las composiciones de las mismas o las terapias combinadas que comprenden agentes terapéuticos) se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento en el peso de la pata trasera del grupo de prueba en relación con el grupo de control que recibió el vehículo.

20 En una forma de realización específica en la que el modelo animal experimental utilizado es el modelo de rata con artritis inducida por adyuvante, el peso corporal se puede medir en relación con un grupo de control para determinar la actividad antiinflamatoria de un agente terapéutico, una composición del mismo o una combinación terapia.

25 Se conocen en la técnica modelos animales para alergias y asma, tales como la inflamación de flujo constante con oclusión inspiratoria final descrita en Ewart et al., 1995 *J Appl Physiol* 79 (2): 560–566 y otros ensayos descritos en, por ejemplo, Komai et al., 2003 *Br J Pharmacol* 138 (5): 912–920; Kenyon et al., 2003 *Toxicol Appl Pharmacol* 186 (2): 90–100; Path et al., 2002 *Am J Resp & Critical Care Med* 166 (6): 818–826; Martins et al., 1990 *Crit Care Med* 19: 515–519; Nicolaidis et al., 1997 *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13175–13180; McLane et al., 1998 19: 713–720; y Temann et al., 1998 *J Exp Med* 188 (7): 1307–1320. Por ejemplo, el modelo de transferencia adoptiva murina es un modelo animal que se utiliza para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo o una terapia de combinación para la prevención, el tratamiento, el tratamiento y/o el asma. En el modelo murino de transferencia adoptiva, la provocación aeroalérgica de ratones receptores TH1 o TH2 produce una migración de células efectoras TH a las vías respiratorias y se asocia con una respuesta inflamatoria de la mucosa pulmonar neutrófila (TH1) y eosinófila (TH2) (Cohn et al., 1997), *J. Exp. Med.* 186:1737–1747). La hipersensibilidad de las vías respiratorias puede ser inducida en ratones por ovalbúmina (Tomkinson et al., 2001, *J. Immunol.* 166: 5792–5800) o por el antígeno del huevo *Schistosoma mansoni* (Tesciuba et al., 2001, *J. Immunol.* 167: 1996–2003).

La eficacia para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio puede demostrarse, por ejemplo, detectando la capacidad de un

agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico para reducir uno o más síntomas del trastorno inflamatorio, para disminuir la activación de las células T, disminuir la proliferación de células T, modular uno o más perfiles de citoquinas, reducir la producción de citoquinas, reducir la inflamación de una articulación, órgano o tejido o mejorar la calidad de vida.

5

Los cambios en la actividad de la enfermedad inflamatoria también pueden evaluarse a través de los recuentos de articulaciones inflamadas y sensibles, las puntuaciones globales del paciente y del médico para el dolor y la actividad de la enfermedad, y la ESR/CRP. La progresión del daño articular estructural se puede evaluar mediante la puntuación cuantitativa de los rayos X de las manos, las muñecas y los pies (método Sharp). Los cambios en el estado funcional en humanos con trastornos inflamatorios pueden evaluarse utilizando el Cuestionario de Evaluación de la Salud (HAQ), y los cambios en la calidad de vida se evalúan con el SF.

10

La eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo o una terapia de combinación que comprende un agente terapéutico para prevenir, tratar y/o manejar una reacción alérgica de tipo I puede evaluarse por su capacidad para inducir anticuerpos anti-IgE que inhiben la IgE de unirse al receptor en mastocitos o basófilos in vitro. Los niveles de IgE pueden analizarse mediante inmunoensayos, electroforesis en gel seguida de visualización, prueba de radioinmunoabsorción (RIST), prueba de radioalergosorbente (RAST) o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica.

15

5.5.3 Toxicidad

20

La toxicidad y/o eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren las terapias que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden usar terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

25

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso en seres humanos. La dosis de dichos agentes se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia utilizada en el método, por ejemplo, como se describe en el presente documento, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante en plasma que incluya la IC50 (es decir, la concentración del agente terapéutico que logra una inhibición de los síntomas de la mitad del máximo) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

30

35

40

En otra forma de realización más, las células apoptóticas se miden en los compartimentos tanto unidos como "flotantes" de los cultivos. Ambos compartimentos se recogen mediante la eliminación del sobrenadante, la tripsinización de las células unidas y la combinación de ambas preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (10 minutos, 2000

rpm).

5 En otra forma de realización más, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación del ADN. Se dispone de métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa in vitro de la fragmentación del ADN. Ejemplos de tales ensayos, incluidos TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

En otra forma de realización más, la apoptosis se puede observar morfológicamente.

10 Las líneas celulares en las que se pueden realizar dichos ensayos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ensayos de apoptosis, necrosis y proliferación también se pueden realizar en células primarias, por ejemplo, un explante de tejido.

6. Ejemplos

15 Las células 293 humanas se transfectaron con el constructo de expresión de ácido nucleico para IL-15 (ver, por ejemplo, la figura 5A-D) solo o en combinación con un constructo de expresión de ácido nucleico para IL-15sRa (ver, por ejemplo, la figura 7A-D) o IL-15Ra (ver, por ejemplo, las figuras 6A-D) junto con un plásmido que confiere resistencia a la higromicina. IL15tPA indica el constructo de expresión de ácido nucleico optimizado que tiene el péptido prepro tPA (es decir, péptido señal) que reemplaza la señal secretora de IL-15 natural. "Ra" y "sRa" indican los vectores de expresión optimizados utilizados para la expresión de IL-15Ra de longitud completa y la porción extracelular de IL-15Ra (forma soluble), respectivamente. Las células transfectadas se trataron con higromicina (250 µg/ml) y se aislaron y expandieron focos de células resistentes que crecían rápidamente. Se ensayaron los sobrenadantes de los diferentes clones para determinar la expresión de IL-15 después de 2 días en cultivo mediante ELISA (kit R&D Systems Quantikine human IL-15 Elisa kit). La producción de IL-15 es mayor en las células que reciben ambos genes (p = 0,0166). Se determinaron dos mediciones de IL-15 para la mayoría de los clones.

Tabla 2:

IL-15/millones de células (ng/ml)	clon#	genes
9.2	3.1	IL15tPA
14.0	3.1	IL15tPA
37.7	3.3	IL15tPA
74.0	3.3	IL15tPA
147.2	7.5	IL15tPA+sRA
136.8	6.4	IL15tPA+sRA
266.2	6.4	IL15tPA+sRA
135.9	6.5	IL15tPA+sRA
133.8	6.5	IL15tPA+sRA
184.1	6.8	IL15tPA+sRA
192.7	6.8	IL15tPA+sRA

37.5	6.9	IL15tPA+sRA
37.8	6.9	IL15tPA+sRA
101.3	7.2	IL15tPA+sRA
176.0	7.2	IL15tPA+sRA
294.5	7.21	IL15tPA+sRA
390.0	7.21	IL15tPA+sRA
81.2	4.2	IL15tPA+RA
194.2	4.2	IL15tPA+RA
54.0	4.4	IL15tPA+RA
100.8	4.4	IL15tPA+RA
18.3	5.6	IL15tPA+RA
46.2	5.6	IL15tPA+RA
31.2	5.2	IL15tPA+RA
22.5	5.2	IL15tPA+RA

5 El clon 7.21 se cultivó adicionalmente y se seleccionó por la capacidad de crecer en medio sin suero en matraces de agitación y se seleccionó para células con la capacidad de crecer en tales condiciones. Brevemente, los clones se cultivaron en una proporción media de 1:1 de edad (10% de suero de ternera fetal) a nuevos medios (sin suero) hasta que se observaron dos duplicaciones de la población. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvieron células que podían crecer bien en medio sin suero. El medio libre de suero utilizado fue una mezcla 1:1 de 2 medios comerciales: (i) HyClone HyQ SFM4HEK293 (N.º de cat. SH30521.02) e (ii) Invitrogen FreeStyle 293 (N.º de cat. 12338-026). El rendimiento típico de IL-15 recombinante producida por células adaptadas para crecer en medio sin suero en matraces de agitación del clon 7.21 es de aproximadamente 3 a 4 mg/L de medio y 0,6 µg/10⁶ células, según lo medido por ELISA (R&D Systems, kit Quantikine human IL-15 ELISA).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Admune Therapeutics LLC The United States Of America,As Represented By The Secretary, Department Of Health And Human Services, Office Of Technology Transfer National Institute Of Health

5

<120>COMPLEJOS DE IL-15 E IL-15RALFA Y SUS USOS

<130> 102385PCEPT2

10

<150> US20070937471

<151> 2007-06-27

<160> 18

15

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<220>

<221>SEÑAL

<222> (1)...(48)

25

<220>

<223>forma precursora/inmadura de IL-15 nativa humana

30

<400> 1

ES 2 716 476 T3

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

ES 2 716 476 T3

<210> 2
 <211> 489
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1) ... (145)
 10
 <220>
 <223>secuencia codificadora de forma precursora/inmadura de IL-15 nativa humana
 <400> 2

 atgagaattt cgaaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
 ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120
 gcagggcttc ctaaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180
 gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240
 cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300
 gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360
 agtttgtcct ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
 gaaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480
 15 acttcttga 489
 <210> 3
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221>SEÑAL
 <222> (1) ... (30)
 25
 <220>
 <223> forma inmadura de receptor alfa IL-15 humano de longitud completa nativo
 <400> 3

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
 20 25 30
 Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
 35 40 45
 Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 50 55 60
 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 65 70 75 80
 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
 85 90 95
 Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
 100 105 110
 Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
 115 120 125
 Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
 145 150 155 160
 Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
 165 170 175
 Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
 180 185 190
 Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile
 195 200 205
 Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
 210 215 220
 Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
 225 230 235 240
 Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg
 245 250 255
 Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu
 260 265

<210> 4
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>SEÑAL
 <222> (1) ... (30)

<220>
 <223> forma inmadura de receptor alfa IL-15 humano soluble nativo

<400> 4

```

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

```

5 <210> 5
 <211> 804
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1) ... (90)

<220>
 <223>secuencia codificadora deforma inmadura de receptor alfa IL-15 humano de longitud completa nativo

15 <400> 5

```

atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
ctgctgctcc ggccgcccgc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtggt gaacaaggcc 240

```

ES 2 716 476 T3

```

acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgcctgggt 300
caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360
agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gttcatctc ccagctcaaa caacacagcg 420
gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc accttccaca 480
ggaaccacag agataagcag tcatgagtcc tcccacggca cccctctca gacaacagcc 540
aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600
cacagcgaca ccaactgtggc tatctccacg tccactgtcc tgctgtgtgg gctgagcgct 660
gtgtctctcc tggcatgcta cctcaagtca aggcaaactc ccccgctggc cagcgttgaa 720
atggaagcca tggaggctct gccggtgact tgggggacca gcagcagaga tgaagacttg 780
gaaaactgct ctcaccacct atga 804

```

5 <210> 6
 <211> 615
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1) ... (90)

<220>
 <223>secuencia codificadora de forma inmadura de receptor alfa IL-15 humano soluble nativo

15 <400> 6

```

atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
ctgctgctcc ggccgcccgc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcggtgt gaacaaggcc 240
acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgcctgggt 300
caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360
agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gttcatctc ccagctcaaa caacacagcg 420
gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc accttccaca 480
ggaaccacag agataagcag tcatgagtcc tcccacggca cccctctca gacaacagcc 540
aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600
cacagcgaca ccaact 615

```

20 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

25 <220>
 <223>sitios de escisión de proteasas heterólogas reconocidos por furina proteasa

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2,3
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 7

Arg Xaa Xaa Arg
 1

35 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

ES 2 716 476 T3

<220>

<223>sitios de escisión de proteasas heterólogas reconocidos por trombina proteasa

5

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1,2

<223> Xaa = aminoácidos hidrofóbicos

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5,6

<223> Xaa = aminoácidos no ácidos

15

<400> 8

Xaa Xaa Pro Arg Xaa Xaa
1 5

20

<210> 9

<211> 1847

<212>ADN

<213>Secuencia Artificial

25

<220>

<223> AG32 huIL15opt - constructo de ácidos nucleicos que codifica la IL-15 humana optimizada

<400> 9

ES 2 716 476 T3

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatggtga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaagt gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttacatgggt gatgcggtt tggcagtaca 480
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgttt gacctcata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgct gacaagaaat gcggatctcg 780
aagccgcacc tgcggtcgat atcgatccag tgctacctgt gcctgctcct gaactcgcac 840
ttcctcacgg aggccggtat acacgtcttc atcctgggct gcttctcggc ggggctgccg 900
aagacggagg cgaactgggt gaacgtgatc tcggacctga agaagatcga ggacctcatc 960
cagtcgatgc acatcgacgc gacgctgtac acggagtcgg acgtccacc gtcgtgcaag 1020
gtcacggcga tgaagtgctt cctcctggag ctccaagtca tctcgctcga gtcgggggac 1080
gcgtcgatcc acgacacggg ggagaacctg atcatcctgg cgaacaactc gctgtcgtcg 1140
aacgggaacg tcacggagtc gggctgcaag gagtgcgagg agctggagga gaagaacatc 1200
aaggagttcc tgcagtcggt cgtgcacatc gtccagatgt tcatcaacac gtcgtgaggg 1260
cccggcgcgc cgaattcgcg gatatcgggt aacggatcca gatctgctgt gccttctagt 1320
tgccagccat ctgttggttg cccctcccc gtgccttct taccctgga aggtgccact 1380
cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat 1440
tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattgga agacaatagc 1500
agggatgctg gggatgcggt gggctctatg ggtaccagg tgctgaagaa ttgaccgggt 1560
tcctcctggg ccagaaagaa gcaggcacat ccccttctct gtgacacacc ctgtccacgc 1620
ccctggttct tagttccagc cccactcata ggacactcat agctcaggag ggctccgcct 1680
tcaatcccac ccgctaaagt acttgagcgc gtctctccct ccctcatcag cccaccaaac 1740
caaacctagc ctccaagagt ggaagaaat taaagcaaga taggctatta agtgcagagg 1800
gagagaaaat gcctccaaca tgtgaggaag taatgagaga aatcata 1847

```

<210> 10
 <211> 162
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223> AG32 huIL15opt –secuenci de amino ácidos de IL-15 humana optimizada

<400> 10

ES 2 716 476 T3

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

<210> 11
 <211> 1808
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> AG59 CMV huIL15tPA6 - constructo de ácidos nucleicos que codifica la IL-15 humana optimizada

10

<400> 11

ES 2 716 476 T3

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaagt gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggg gatgcggttt tggcagtaca 480
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaagt ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctcata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgct gacaagaaat ggatgcaatg 780
aagagagggc tctgctgtgt gctgctgctg tgtggagcag tcttcgttcc gccagccag 840
gaaatccatg cccgattcag aagaggagcc agaaactggg tgaacgtgat ctcgacctg 900
aagaagatcg aggacctcat ccagtcgatg cacatcgacg cgacgctgta cacggagtcg 960
gacgtccacc cgtcgtgcaa ggtcacggcg atgaagtgtt tcctcctgga gctccaagtc 1020
atctcgctcg agtcggggga cgcgtcgatc cacgacacgg tggagaacct gatcatcctg 1080
gogaacaact cgctgtcgtc gaacgggaac gtcacggagt cgggctgcaa ggagtgcgag 1140
gagctggagg agaagaacat caaggagttc ctgcagtcgt tcgtgcacat cgtccagatg 1200
ttcatcaaca cgtcgtgagg gcccggcgcg ccgaattcgc ggatatcggg taacggatcc 1260
agatctgctg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc 1320
ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaatgagga aattgcatcg 1380
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 1440

gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat gggtagccag 1500
gtgctgaaga attgaccggg ttctcctggt gccagaaaga agcaggcaca tccccttctc 1560
tgtgacacac cctgtccacg cccctgggtt ttagttccag cccactcat aggacactca 1620
tagctcagga gggctccgcc ttcaatccca cccgctaag tacttgagc ggtctctccc 1680
tccctcatca gccacccaaa ccaaactag cctccaagag tgggaagaaa ttaaagcaag 1740
ataggctatt aagtgcagag ggagagaaaa tgcctccaac atgtgaggaa gtaatgagag 1800
aatcata 1808

```

5 <210> 12
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> AG59 CMV huIL15tPA6 –secuencia de aminoácidos de IL-15 humana optimizada

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 2140
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

<220>
 <223> AG79 hull15Ra - constructo de ácidos nucleicos que codifica la IL-15Ra humana optimizada

<400> 13

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatggtga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaattggcc 180
cgcctggctg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaagt gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggtt tggcagtaca 480
tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaatc aacgggactt tccaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgtc gacgctagca agaaatggcc 780
ccgaggcggg cgcgaggctg ccggaccctc ggtctcccgg cgctgctact gctcctgctg 840
    
```

ES 2 716 476 T3

```

ctccggccgc cggcgacgcg gggcatcacg tgcccggccc ccatgtccgt ggagcacgca 900
gacatctggg tcaagagcta cagcttgtac tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt 960
ttcaagcggg aggccggcac gtccagcctg acggagtgcg tgttgaacaa ggccacgaat 1020
gtcgcccact ggacgacccc ctcgctcaag tgcattccgcg acccggccct ggttcaccag 1080
cggcccgcgc caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgagcc ggagagcctc 1140
tccccgtcgg gaaaggagcc cgccgcgtcg tcgcccagct cgaacaacac ggcggccaca 1200
actgcagcga tcgtcccggg ctcccagctg atgcccgtcg agtcgcccgtc cacgggaacc 1260
acggagatca gcagtcattg gtccctccac ggcaccccct cgcaaacgac ggccaagaac 1320
tgggaactca cggcgtccgc ctcccaccag ccgcccgggg tgatccgca aggccacagc 1380
gacaccacgg tggcgatctc cacgtccacg gtccctgctgt gtgggctgag cgcggtgtcg 1440
ctcctggcgt gctacctcaa gtcgaggcag actccccgcg tggccagcgt tgagatggag 1500
gccatggagg ctctgccggg gacgtggggg accagcagca gggatgagga cttggagaac 1560
tgctcgcacc acctataatg agaattcgat ccagatctgc tgtgccttct agttgccagc 1620
catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg 1680
tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gtagtaggtg cattctattc 1740
tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 1800
ctggggatgc ggtgggctct atgggtacc aggtgctgaa gaattgacc ggttcctcct 1860
gggcccagaa gaagcaggca catcccctt tctgtgacac accctgtcca cgcccctggt 1920
tcttagttcc agccccactc ataggacact catagctcag gagggctccg ccttcaatcc 1980
caccgctaa agtacttggg gcggtctctc cctccctcat cagcccacca aaccaaacct 2040
agcctccaag agtgggaaga aattaaagca agataggcta ttaagtgcag agggagagaa 2100
aatgcctcca acatgtgagg aagtaatgag agaaatcata 2140

```

<210> 14

<211> 267

5 <212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

10 <223> AG79 huIL15Ra - secuencia de aminoácidos de IL-15Ra humana optimizada

<400> 14

ES 2 716 476 T3

Met	Ala	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Gly	Cys	Arg	Thr	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15	
Leu	Arg	Pro	Pro	Ala	Thr	Arg	Gly	Ile	Thr						
			20					25					30		
Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser
		35					40					45			
Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys
	50					55					60				
Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala
65					70					75					80
Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Asp
				85					90					95	
Pro	Ala	Leu	Val	His	Gln	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Thr	Thr
			100					105					110		
Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Gln	Pro	Glu	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Glu
		115					120					125			
Pro	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala
		130				135					140				
Ala	Ile	Val	Pro	Gly	Ser	Gln	Leu	Met	Pro	Ser	Lys	Ser	Pro	Ser	Thr
145					150						155				160
Gly	Thr	Thr	Glu	Ile	Ser	Ser	His	Glu	Ser	Ser	His	Gly	Thr	Pro	Ser
				165							170				175
Gln	Thr	Thr	Ala	Lys	Asn	Trp	Glu	Leu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ser	His	Gln
			180					185					190		
Pro	Pro	Gly	Val	Tyr	Pro	Gln	Gly	His	Ser	Asp	Thr	Thr	Val	Ala	Ile
		195					200						205		
Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Leu	Leu	Cys	Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Ser	Leu	Leu
		210				215					220				
Ala	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Arg	Gln	Thr	Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Glu
225					230						235				240
Met	Glu	Ala	Met	Glu	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Trp	Gly	Thr	Ser	Ser	Arg

ES 2 716 476 T3

245
250
255
 Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu
260
265

5
 <210> 15
 <211> 1971
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> AG98 CMV hu sIL15Ra - constructo de ácidos nucleicos que codifica la IL-15Ra humana optimizada

<400> 15

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaatt gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggg gatgcgggtt tggcagtaca 480
tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgcccatt gacgcaaatt ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgtc gacgctagca agaaatggcc 780
ccgaggcggg cgcgaggctg ccggaccctc ggtctcccgg cgtctgtact gctcctgctg 840
ctccggccgc cggcgacgcg gggcatcacg tgcccgcccc ccatgtccgt ggagcacgca 900
gacatctggg tcaagagcta cagcttgtac tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt 960
ttcaagcggg aggccggcac gtccagcctg acggagtgcg tgttgaacaa ggccacgaat 1020
gtcgcgccact ggacgacccc ctcgctcaag tgcacccgcg acccggccct ggttcaccag 1080
cggcccgcgc caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgcagcc ggagagcctc 1140
tcccgcgctg gaaaggagcc cgcgcgctcg tcgcccagct cgaacaacac ggcggccaca 1200
actgcagcga tcgtcccggg ctcccagctg atgcccgcga agtcgcccgt cacgggaacc 1260
acggagatca gcagtcata gtccctccac ggcaccccct cgcaaacgac ggccaagaac 1320
tgggaactca cggcgtccgc ctcccaccag ccgcccgggg tgtatccgca aggccacagc 1380
gacaccacgt aatgagaatt cgcggatata ggttaacgga tccagatctg ctgtgccttc 1440
tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgctgct tccttgacc tggaggtgc 1500
cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagttagtg 1560
tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt ggaagacaa 1620
tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtacc caggtgctga agaattgacc 1680
cggttcctcc tgggccagaa agaagcaggc acatcccctt ctctgtgaca caccctgtcc 1740
acgcccctgg ttcttagttc cagccccact cataggacac tcatagctca ggagggtcc 1800
gccttcaatc ccaccgcta aagtacttgg agcggctctc ccctccctca tcagcccacc 1860
aaaccaaac tagcctcaa gagtgggaag aaattaaagc aagataggct attaagtgca 1920
gagggagaga aatgcctcc aacatgtgag gaagtaatga gagaaatcat a 1971
    
```

15
 <210> 16
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> AG98 CMV hu sIL15Ra - secuencia de aminoácidos de IL-15Ra humana optimizada

<400> 16

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

5

<210> 17
 <211> 1754
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> AG151 huIL-15 huGM-CSF - constructo de ácidos nucleicos que codifica la IL-15 humana optimizada con un péptido señal de GM-CSF humano

15

<400> 17

ES 2 716 476 T3

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatggtga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaagt gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttacatgggt gatgcggttt tggcagtaca 480
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgctc gacaagaaat gtggctccag 780
agcctgctac tcctggggac ggtggcctgc agcatctcga actgggtgaa cgtgatctcg 840
gacctgaaga agatcgagga cctcatccag tcgatgcaca tcgacgcgac gctgtacacg 900
gagtcggacg tccaccgctc gtgcaaggtc acggcgatga agtgcttcct cctggagctc 960
caagtcattc cgctcgagtc gggggacgcg tcgatccacg acacgggtgga gaacctgatc 1020
atcctggcga acaactcgct gtcgtcgaac gggaacgtca cggagtcggg ctgcaaggag 1080
tgcgaggagc tggaggagaa gaacatcaag gagttcctgc agtcgttcgt gcacatcgtc 1140
cagatgttca tcaacacgct gtgagggccc ggcgcgccga attcgcggat atcggttaac 1200
ggatccagat ctgctgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg 1260
ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 1320
gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc 1380
aagggggagg attgggaaga caatagcagc catgctgggg atgcggtggg ctctatgggt 1440
accaggtgc tgaagaattg acccggttcc tcctgggcca gaaagaagca ggcacatccc 1500
cttctctgtg acacaccctg tccacgcccc tgggtccttag ttccagcccc actcatagga 1560
cactcatagc tcaggagggc tccgccttca atcccaccg ctaaagtact tggagcggtc 1620
tctccctccc tcatcagccc accaaaccaa acctagcctc caagagtggg aagaaattaa 1680
agcaagatag gctattaagt gcagagggag agaaaatgcc tccaacatgt gaggaagtaa 1740

```

tgagagaaat cata 1754

- 5 <210> 18
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> AG151 huIL-15 huGM-CSF - secuencia de ácidos nucleicos de IL-15 humana optimizada con un péptido señal de GM-CSF humano
- <400> 18

REIVINDICACIONES

1. Una célula aislada que expresa de forma recombinante:

(i) una interleuquina 15 humana (IL-15) y

(ii) una forma soluble de un receptor alfa de la interleuquina 15 humana (IL-15Ra), o un polipéptido que comprende una forma soluble de un IL-15Ra humano y una molécula heteróloga, en donde la célula expresa al menos 150 ng/millón de células de IL-15 humana por día cuando se cultiva en medios sin suero, en donde la IL-15 humana:

(a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;

(b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 2;

(c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;

(d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 49 a 162 de la SEQ ID NO: 1;

(e) está codificada por la SEQ ID NO: 2;

(f) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 145 a 489 de la SEQ ID NO: 2;

(g) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1257 de la SEQ ID NO: 9;

(h) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1218 de la SEQ ID NO: 11, o

(i) está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 769 a 1164 de la SEQ ID NO: 17, y

en donde la forma soluble de IL-15Ra humano:

(a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;

(b) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 6;

(c) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 80% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6;

(d) tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO: 4;

(e) está codificada por la SEQ ID NO: 6; o

(f) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los residuos de ácido nucleico 91 a 615 de la SEQ ID NO: 6.

2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula heteróloga es el dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento de la misma.

3. La célula de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la célula es una célula cancerosa irradiada.

4. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula es una línea celular de mamífero.

5. La celda de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la celda es de la línea celular 293H o 293.

6. La celda de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la celda es de la línea celular 293T, COS, CHO, HeLa, NIH3T3, HepG2, MCF7, RD, PC12, K562, skBr3, BT274, A204, M07Sb, TF β 1, Raji, Jurkat, MOLTA, CTLL-2, MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SYS5Y, C127 o BE(2)-C.
- 5 7. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula expresa 150 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 humana por día.
8. Un método para producir de forma recombinante (i) IL-15 humana y (ii) una forma soluble de IL-15Ra humano o un polipéptido que comprende la forma soluble de IL-15Ra humano y una molécula heteróloga, que comprende:
- 10 (a) cultivar la célula de las reivindicaciones 1 a 7; y
(b) purificar la IL-15 humana y la forma soluble de IL-15Ra humano o el polipéptido que comprende la forma soluble de IL-15Ra humano y una molécula heteróloga.

IL-15 humana

ATGAGAAT TTCGAAACCA CATTGAGAA GTATTTCCAT CCAGTGCTAC
TTGTGTTTAC TTCTAACAG TCATTTTCTA ACTGAAGCTG GCATTCATGT
CTTCATTTTG GGCTGTTTCA GTGCAGGGCT TCCTAAAACA GAAGCCAAC
GGGTGAATGT AATAAGTGAT TTGAAAAAAA TTGAAGATCT TATTCATCT
ATGCATATTG ATGCTACTTT ATATACGGAA AGTGATGTTT ACCCCAGTTG
CAAAGTAACA GCAATGAAGT GCTTTCTCTT GGAGTTACAA GTTATTTTAC
TTGAGTCCGG AGATGCAAGT ATTCATGATA CAGTAGAAAA TCTGATCATC
CTAGCAAACA ACAGTTTGTC TTCTAATGGG AATGTAACAG AATCTGGATG
CAAAGAATGT GAGGAACTGG AGGAAAAAAA TATTAAAGAA TTTTGCAGA
GTTTTGTACA TATTGTCCAA ATGTTTATCA ACACTTCTTG A

Fig. 1A

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNV
ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Fig. 1B

IL-15Ra humano nativo

ATGGCCCC GCGGCGGGCG CGCGGCTGCC GGACCCTCGG TCTCCCGGCG
CTGCTACTGC TGCTGCTGCT CCGGCCGCGG GCGACGCGGG GCATCACGTG
 CCTCCCCC ATGTCCGTGG AACACGCAGA CATCTGGGTC AAGAGCTACA
 GCTTGTACTC CAGGGAGCGG TACATTTGTA ACTCTGGTTT CAAGCGTAAA
 GCCGGCACGT CCAGCCTGAC GGAGTGCGTG TTGAACAAGG CCACGAATGT
 CGCCCACTGG ACAACCCCCA GTCTCAAATG CATTAGAGAC CCTGCCCTGG
 TTCACCAAAG GCCAGCGCCA CCCTCCACAG TAACGACGGC AGGGGTGACC
 CCACAGCCAG AGAGCCTCTC CCCTTCTGGA AAAGAGCCCG CAGCTTCATC
 TCCCAGCTCA AACAAACACAG CGGCCACAAC AGCAGCTATT GTCCCGGGCT
 CCCAGCTGAT GCCTTCAAAA TCACCTTCCA CAGGAACCAC AGAGATAAGC
 AGTCATGAGT CCTCCCACGG CACCCCTCT CAGACAACAG CCAAGAACTG
 GGAACTCACA GCATCCGCCT CCCACCAGCC GCCAGGTGTG TATCCACAGG
 GCCACAGCGA CACCACTGTG GCTATCTCCA CGTCCACTGT CCTGCTGTGT
 GGGCTGAGCG CTGTGTCTCT CCTGGCATGC TACCTCAAGT CAAGGCAAAC
 TCCCCGCTG GCCAGCGTTG AAATGGAAGC CATGGAGGCT CTGCCGGTGA
 CTTGGGGGAC CAGCAGCAGA GATGAAGACT TGGAAAACCTG CTCTCACCAC
 CTATGA

Fig. 2A

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN
 SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPES
 LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWE
 LTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEA
 LPVTWGTSSRDEDELENCSHHL

Fig. 2B

IL-15Ra humano soluble nativo

ATGGCCCC GCGGCGGGCG CGCGGCTGCC GGACCCTCGG TCTCCCGGCG
CTGCTACTGC TGCTGCTGCT CCGGCCGCCG GCGACGCGGG GCATCACGTG
CCCTCCCCCC ATGTCCGTGG AACACGCAGA CATCTGGGTC AAGAGCTACA
GCTTGTACTC CAGGGAGCGG TACATTTGTA ACTCTGGTTT CAAGCGTAAA
GCCGGCACGT CCAGCCTGAC GGAGTGCGTG TTGAACAAGG CCACGAATGT
CGCCCCTGG ACAACCCCCA GTCTCAAATG CATTAGAGAC CCTGCCCTGG
TTCACCAAAG GCCAGCGCCA CCCTCCACAG TAACGACGGC AGGGGTGACC
CCACAGCCAG AGAGCCTCTC CCCTTCTGGA AAAGAGCCCG CAGCTTCATC
TCCAGCTCA AACAAACACAG CGGCCACAAC AGCAGCTATT GTCCCGGGCT
CCCAGCTGAT GCCTTCAAAA TCACCTTCCA CAGGAACCAC AGAGATAAGC
AGTCATGAGT CCTCCACGG CACCCCTCT CAGACAACAG CCAAGAACTG
GGAACTACA GCATCCGCCT CCCACCAGCC GCCAGGTGTG TATCCACAGG
GCCACAGCGA CACCACT

Fig. 3A

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN
SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPES
LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWE
LTASASHQPPGVYPQGHSDTT

Fig. 3B

AG32 huL15opt

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT
 GGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATG
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT
 CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACGGGACCGATCCAGCC
 TCCGCGGGGcgcgcgctcgacaagaa**ATGCGGATCTCGAAGCCGCACCTGCGGTTCGATATCGAT**
CCAGTGCTACCTGTGCCTGCTCCTGAACTCGCACTTCCTCACGGAGGCCGGTATACACGTCT
TCATCCTGGGCTGCTTCTCGGCGGGGCTGCCGAAGACGGAGGCGAACTGGGTGAACGTGATC
TCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCCAGTCGATGCACATCGACGCGACGCTGTACAC
GGAGTCGGACGTCCACCCGTCGTGCAAGGTCACGGCGATGAAGTGCTTCCTCCTGGAGCTCC
AAGTCATCTCGCTCGAGTCGGGGGACGCGTCGATCCACGACACGGTGGAGAACCCTGATCATC
CTGGCGAACAACCTCGCTGTCGTCGAACGGGAACGTCACGGAGTCGGGCTGCAAGGAGTGCGA
GGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTCGTGCACATCGTCCAGATGT
TCATCAACACGTCGTGAgggcccggcgcgcgccaattcgcggatatcggttaacggatccaGA
 TCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTGCCTTCCTTGAC
 CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC
 TGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAA
 TTGACCCGGTTTCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCTT
 GTCCACGCCCCCTGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCT
 CCGCCTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACC
 AAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGA
 GGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 4A

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGC
FSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE
SDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDTVEN
LII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSF
VHIVQMFINTS.

Fig. 4B

AG32 CMVhuIL15opt ORF
(1847 bp)

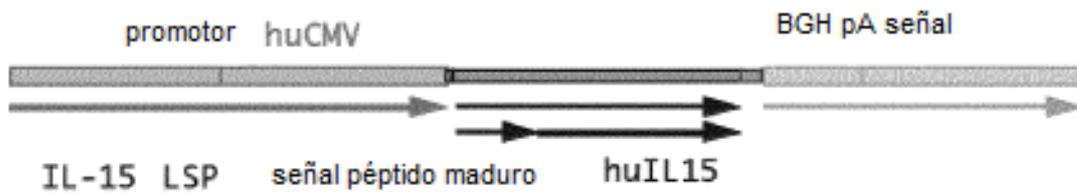


Fig. 4C

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCAT
 76 GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
 151 TCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAA
 226 TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG
 301 CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCG
 376 CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
 451 TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCAGTTTACTCACGGGGATTTCGAAGTC
 526 TCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAAC
 601 CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
 676 GTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG
 751 *GGcgcgcgtcgacaagaa* ATG CGG ATC TCG AAG CCG CAC CTG CGG TCG ATA TCG ATC CAG
 ▶ 1▶ M R I S K P H L R S I S I Q
 811 TGC TAC CTG TGC CTG CTC CTG AAC TCG CAC TTC CTC ACG GAG GCC GGT ATA CAC GTC
 15▶ C Y L C L L L N S H F L T E A G I H V
 868 TTC ATC CTG GGC TGC TTC TCG GCG GGG CTG CCG AAG ACG GAG GCG AAC TGG GTG AAC
 34▶ F I L G C F S A G L P K T E A N W V N
 925 GTG ATC TCG GAC CTG AAG AAG ATC GAG GAC CTC ATC CAG TCG ATG CAC ATC GAC GCG
 53▶ V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A
 982 ACG CTG TAC ACG GAG TCG GAC GTC CAC CCG TCG TGC AAG GTC ACG GCG ATG AAG TGC
 72▶ T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C
 1039 TTC CTC CTG GAG CTC CAA GTC ATC TCG CTC GAG TCG GGG GAC GCG TCG ATC CAC GAC
 91▶ F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D
 1096 ACG GTG GAG AAC CTG ATC ATC CTG GCG AAC AAC TCG CTG TCG TCG AAC GGG AAC GTC
 110▶ T V E N L I I L A N N S L S S N G N V
 1153 ACG GAG TCG GGC TGC AAG GAG TGC GAG GAG CTG GAG GAG AAG AAC ATC AAG GAG TTC
 129▶ T E S G C K E C E E L E E K N I K E F
 1210 CTG CAG TCG TTC GTG CAC ATC GTC CAG ATG TTC ATC AAC ACG TCG TGA *gggcccggcgc*
 148▶ L Q S F V H I V Q M F I N T S •
 1269 *gcccgaattcgcggatatacggttaacggatcca*GATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC
 1344 CTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC
 1419 GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
 1494 CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCCTCTG
 1569 GGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCTGGTTCTTAGTTCCAGCCCC
 1644 ACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCC
 1719 CTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGT
 1794 GCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA
 ▶

Fig. 4D

AG59 CMV huL15tPA6

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTAATTTGGCTCATGTCCA
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCC
 ATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAATTGAAGTCAATAATGAAGTATGTTGCCATAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAAGGTAAACTGCCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAAGTCAATGATGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTCATOGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
 GCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGAAGTCAATGGGAGTTTGTTTT
 GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATG
 GCGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGSTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGAT
 CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAAGTCCATAGAAGACACCGGGACCGGATCCAGCC
 TCCGCGGgogcgcgctogacaagaaATGGATGCAANTGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCT
 GCTGTGTGGAGCAGTCTTTCGTTTTGCCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTCCAGAAGAGGAG
 CCAGAAACTGGGTGAACGTGATCTCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCCAGTCCATG
 CACATCGACCGSACGCTGTACACGGAGTCCGACGTCCACCCGTCGTGCAAGSTCACGGCGAT
 GAAGTGCCTTCTCCTGGAGCTCCAAGTCACTCTCGCTCGAGTCCGGGGACCGSTCGATCCACG
 ACACGGTGGAGAACCCTGATCATCTGCGGCAACAACCTCGCTGTGTCGAAACGGGAACGTCACG
 GAGTCCGGCTCCAAAGGAGTCCGAGGAGCTCGAGGAGAGAAACATCAAGGAGTTCTCTCAGTC
 GFTCGTGCACATCGTCCAGATGTTCAATCAACACGCTCGTGAagggccccggcgcgccgaattcgc
 ggatatcggttaacgggatccsGATCTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTTGC
 CCTCCCCCGTGCCTTCTTTGACCTGGAAGSTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCCCTAATAAAA
 TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCATTTCTGGGGGTGGGGTGGGGC
 AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACA
 TCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGGCCCTGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAG
 GACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCCTTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTC
 TCTCCTCCCTCATCAGCCACCAACCAAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAG
 CAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAG
 AGAAATCATA

Fig. 5A

M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P S Q E I H A R F R R G A R N
W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A
M K C F L L E L O V I S L E S G D A S I H D T V E N L I L L A N N S L S S M
G N V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S .

Fig. 5B

AG59 CMV huIL15tPA6
(1808 bp)



Fig. 5C

```

1  CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA
101  TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAECTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
201  GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGATTACGGTAAACTG
301  CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC
401  CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
501  TTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAAC
601  CCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCC
701  ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCTCCGCGGgcgcgcgctcgacaagaa ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC
                                     1 M D A M K R G L
793  TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC CAG GAA ATC CAT GCC CGA TTC AGA AGA GGA
9>  C C V L L L C G A V F V S P S Q E I H A R F R R G
868  GCC AGA AAC TGG GTG AAC GTG ATC TCG GAC CTG AAG AAG ATC GAG GAC CTC ATC CAG TCG ATG CAC ATC GAC GCG
34>  A R
      N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A
943  ACG CTG TAC ACG GAG TCG GAC GTC CAC CCG TCG TGC AAG GTC ACG GCG ATG AAG TGC TTC CTC CTG GAG CTC CAA
24>  T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E L Q
1018  GTC ATC TCG CTC GAG TCG GGG GAC GCG TCG ATC CAC GAC ACG GTG GAG AAC CTG ATC ATC CTG GCG AAC AAC TCG
49>  V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S
1093  CTG TCG TCG AAC GGG AAC GTC ACG GAG TCG GGC TGC AAG GAG TGC GAG GAG CTG GAG GAG AAG AAC ATC AAG GAG
74>  L S S N G N V T E S G C K E C E E L E E K N I K E
1168  TTC CTG CAG TCG TTC GTG CAC ATC GTC CAG ATG TTC ATC AAC ACG TCG TGA gggccggcgcgccgaattcgcggatatcggt
99>  F L Q S F V H I V Q M F I N T S *
1251  taacggatccaGATCTGCTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGCTG6CCTTCCTTGACCCTGGAAAGGTGCCACTCCCCTGTC
1351  CTTTCTAATAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATGGG
1451  AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAGAAGCAGGCACA
1551  TCCCCCTCTCTGTGACACACCTGTCCACGCCCTGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAAGGCACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCAATCCCA
1651  CCGGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAACCAACCTAGCCCTCAAGAGTGGGAAGAATTAAGCAAGATAGGCTATT
1751  AAGTGCAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA
    
```

Fig. 5D

AG79 huLL15Ra

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATOCATATCATAATATGTACATTTATATTTGGCTCATGTCCA
 ACATTACCGOCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTC
 ATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGAOGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTATGOGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGGCTGGATA
 GCGGTTTTGACTCACGGGGATTTOCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTTTTT
 GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCGGCCCCATTGACGCAAAATG
 GCGGGTAGGGTGTACGGTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAAGT
 CGCCTGGAGAAGCCATCCACGCTGTTTTGAOCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC
 TCCGGGGGggeggeggtgagcgtagcaagaaATGGCCCCGAGGCGGGCGGAGGCTGCGCGGAC
 CCTCGGTTCTCCCGGCGCTGCTACTGCTCCTGCTGCTCCGGCCGCGCGGCGACGCGGGGCATCA
 CGTCCCCGCCCCCCATGTCCGTGGAGCACGACAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTAC
 TCCCGGGAGCGGTACATCTGCAACTCGGGTTTTCAAGCGGAAGGCGCGGCACGTCCAGCTGAC
 GGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTGCGCCACTGGACGACCCCCCTCGCTCAAGTGA
 TCCGCGACCCCGGCCCTGGTTTACCAGCGGCCCGCGCACCCCTCCACCGTAAACGACGGCGGGG
 GTGACCCCGCAGCCGGAGAGCCTCTCCCGTGGGAAAGGAGCCCGCCGCGTGGTGGCCAG
 CTCGAACAACACGGCGGCCACAACTGCAGOGATCGTCCCGGGCTCCAGCTGATGCCTCGA
 AGTCCCGTCCACGGGAACCAAGAGATCAGCAGTCAATGAGTCCCTCCACGGCACCCCTCG
 CAAACGACGGCCAGAAGTGGGAATCACGGGCTCCCGCTCCACCGCCCGGGGGTGT
 TCCGCAAGGOCACAGOGACACCACGGTGGOGATCTOCACGTCCACGGTCTCTGCTGTGTGGGC
 TGAGCGCGGTGTGCTCCTGGGTTGCTACCTCAAGTCCAGGCAGACTCCCCCGCTGGCCAGC
 GTTGAGATGGAGGCCATGGAGGCTCTGCCGTTGAOCTGGGGGACCAGCAGCAGGGATGAGGA
 CTTGGAGAATGCTCGCACCACTATAATGAgatttogatccaGATCTGCTGTGCTTCTAG
 TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGGTTGCTTCCCTTGACCCCTGGAAAGTGGCACTC
 CCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATGTCATGTCATTGTCTGAGTAGGTGTCACTCT
 ATTCTGGGGGTTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAAATAGCAGGCA
 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTAOCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGTTCTCTCT
 GGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTCTCTGTGACACACCCCTGTCCACGCCCCCTGGTTC
 TTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCCGCTTCAATCCACCC
 CGCTAAAGTACTTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACTTAGCCTC
 CAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAAGCTATTAAGTGCAGAGGGGAGAGAAATGCCTC
 CAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 6A

M A P R R A R G C R T L G L P A L L L L L L R P P A T R G I T C P P P M
 S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S S L T E
 C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R D P A L V H O R P A P P S T V T
 T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S S P S S N N T A A T T A A I V P
 G S O L M P S K S P S T G T T E I S S H E S S H G T P S O T T A K N W E L
 T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T V A I S T S T V L L C G L S A V S
 L L A C Y L K S R O T P P L A S V E M E A M E A L P V T W G T S S R D E D
 L E N G S H H L . .

Fig. 6B

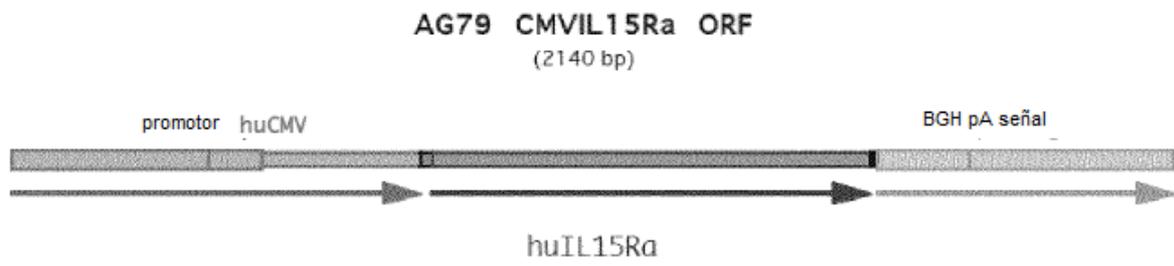


Fig. 6C

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGT
 78 TGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGG
 155 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT
 232 ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTG
 309 GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCCGCTGGCATT
 386 TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
 463 TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGAC
 540 GTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCA
 617 AATGGGCGGTAGGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGAC
 694 GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGgcgcgctcgagctagca
 771 agaa ATG GCC CCG AGG CGG GCG CGA GGC TGC CGG ACC CTC GGT CTC CCG GCG CTG CTA
 1 M A P R R A R G C R T L G L P A L L
 829 CTG CTC CTG CTG CTC CGG CCG CCG GCG ACG CGG GGC ATC ACG TGC CCG CCC CCC ATG
 19 L L L L L R P P A T R G I T C P P P M
 886 TCC GTG GAG CAC GCA GAC ATC TGG GTC AAG AGC TAC AGC TTG TAC TCC CGG GAG CGG
 38 S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R
 943 TAC ATC TGC AAC TCG GGT TTC AAG CGG AAG GCC GGC ACG TCC AGC CTG ACG GAG TGC
 57 Y I C N S G F K R K A G T S S L T E C
 1000 GTG TTG AAC AAG GCC ACG AAT GTC GCC CAC TGG ACG ACC CCC TCG CTC AAG TGC ATC
 76 V L N K A T N V A H W T T P S L K C I
 1057 CGC GAC CCG GCC CTG GTT CAC CAG CGG CCC GCG CCA CCC TCC ACC GTA ACG ACG GCG
 95 R D P A L V H Q R P A P P S T V T T A
 1114 GGG GTG ACC CCG CAG CCG GAG AGC CTC TCC CCG TCG GGA AAG GAG CCC GCC GCG TCG
 114 G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S
 1171 TCG CCC AGC TCG AAC AAC ACG GCG GCC ACA ACT GCA GCG ATC GTC CCG GGC TCC CAG
 133 S P S S N N T A A T T A A I V P G S Q
 1228 CTG ATG CCG TCG AAG TCG CCG TCC ACG TGA ACC ACG GAG ATC AGC AGT CAT GAG TCC
 152 L M P S K S P S T G T T E I S S H E S
 1285 TCC CAC GGC ACC CCC TCG CAA ACG ACG GCC AAG AAC TGG GAA CTC ACG GCG TCC GCC
 171 S H G T P S Q T T A K N W E L T A S A
 1342 TCC CAC CAG CCG CCG GGG GTG TAT CCG CAA GGC CAC AGC GAC ACC ACG GTG GCG ATC
 190 S H Q P P G V Y P Q G H S D T T V A I
 1399 TCC ACG TCC ACG GTC CTG CTG TGT GGG CTG AGC GCG GTG TCG CTC CTG GCG TGC TAC
 209 S T S T V L L C G L S A V S L L A C Y
 1456 CTC AAG TCG AGG CAG ACT CCC CCG CTG GCC AGC GTT GAG ATG GAG GCC ATG GAG GCT
 228 L K S R Q T P P L A S V E M E A M E A
 1513 CTG CCG GTG ACG TGG GGG ACC AGC AGC AGG GAT GAG GAC TTG GAG AAC TGC TCG CAC
 247 L P V T W G T S S R D E D L E N C S H
 1570 CAC CTA TAA TGA gaattcgatcca GAT CTG CTG TGC CTT CTA GTT GCC AGC CAT CTG TTG
 266 H L * *
 1630 TTT GCC CCT CCC CCG TGC CTT CCT TGA CCC TGG AAG GTG CCA CTC CCA CTG TCC TTT
 1687 CCT AAT AAA ATG AGG AAA TTG C ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG
 1756 GGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAG
 1833 GTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCTCCTGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCTGTCC
 1910 ACGCCCCTGGTTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCAATCCCACCCG
 1987 CTAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAAT
 2064 TAAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 6D

AG98 CMV hu sIL15Ra

CCTGGCCATTGCATACGTTGATOCATATCATAAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA
 ACATTACCGCATGTTGACATTGATTATGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGGGTTACATAACTTAACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGAAGTCAATAATGAAGTATGTTCCCAIAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCCATTGAAGTCAATGGGTGGAGTATTTAAGGTAAACTGCCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAAGTCAATGATGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTCATGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCACTACATCAATGGGCGTGGATA
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGAAGTCAATGGGAGTTTGT
 GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAATAATGTCTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATG
 GCGGTTAGGGGTGTACGGTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAAGT
 CGCCTGGAGAAGCCATCCACGCTGTTTTGAAGTCCATAGAAGACACCGGGGACCGATCCAGCC
 TCCGCGGgcgcgcgctcgagcgtagcaagaaATGGCCCCGAGGGGGGGGGGAGGGCTGCCGGAC
 CCTGGTCTCCCGGGCGTGTACTGCTCTGCTGCTCCGGCCCGCGGGGACCGGGGGCATCA
 CGTCCCCGCCCCCATGTCCGTGGAGCACCCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTAC
 TCCCGGGAGCGGTACATCTGCAACTCGGGTTTTCAAGCGGAAGGCGCGGCAAGTCCAGCTGAC
 GGAGTGGTGTGTAACAAGGCCACGAATGTGCGCCACTGGACGACCCCTCGCTCAAGTGA
 TCCCGGACCCCGCCCTGGTTCACCAGCGGGCCCGCCACCCCTCCACCGTAAACGACGGCGGGG
 GTGACCCCGCAGCCGGAGAGCCTCTCCCCGTCCGGGAAGGAGCCCGCCCGGTCTGTCGCCCCAG
 CTGGAACAACACGGCGGCCACAACCTGCAGCGATCGTCCCGGGCTCCAGCTGATGCCSTGGA
 AGTCCCGTCCACGGGAACCAAGAGATCAGCAGTCATGAGTCTCCACCGGCACCCOCTCG
 CAAACGACGGCCAAGAATGGGAATCACGGCGTCCCGCTCCACCCAGCCCGCGGGGGTGA
 TCCGCAAGGCCACAGCGACACCACGTAATGAgaatttegggatatacggttaacggatcccaGA
 TCTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTTGCCCTCCCGCGTGCCTTCCCTTGAC
 CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTC
 TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGTGGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAA
 TTGACCCGGTTCCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCOCTTCTCTGTGACACACCT
 GTCCAGCCOCTGGTTCTTAGTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCT
 CCGOCTTCAATCCACCCOCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTOCTCCCTCATGAGOOCACC
 AAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGA
 GGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 7A

M A P R R A R G C R T L G L P A L L L L L L R P P A T R G I T C P P P M
 S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S S L T E
 C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R D P A L V H Q R P A P P S T V T
 T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S S P S S N N T A A T T A A I V P
 G S Q L M P S K S P S T G T T E I S S H E S S H G T P S Q T T A K N W E L
 T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T . .

Fig. 7B

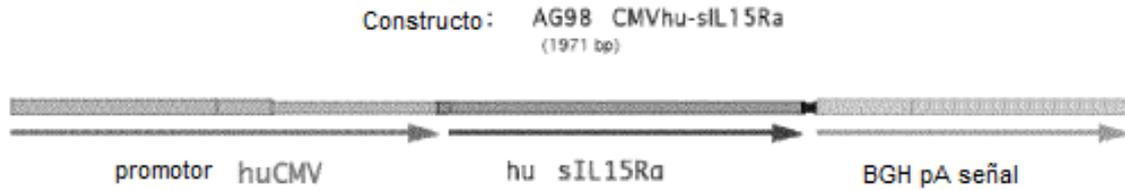


Fig. 7C

```

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA
101 TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
201 GACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTG
301 CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC
401 CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
501 TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAAC
601 CCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCC
701 ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGcgcgcgctgacgctagcaagaa ATG GCC CCG AGG CGG GCG
793 CGA GGC TGC CGG ACC CTC GGT CTC CCG GCG CTG CTA CTG CTC CTG CTG CTC CCG CCG GCG ACG CGG GGC ATC
795 1 M A P R R A
797 R G C R T L G L P A L L L L L L L R P P A T R G I
868 ACG TGC CCG CCC CCC ATG TCC GTG GAG CAC GCA GAC ATC TGG GTC AAG AGC TAC AGC TTG TAC TCC CGG GAG CGG
870 T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R
943 TAC ATC TGC AAC TCG GGT TTC AAG GCC GGC ACG TCC AGC CTG ACG TGC GTG TTG AAC AAG GCC ACG
945 Y I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T
1018 AAT GTC GCC CAC TGG ACG ACC CCC TCG CTC AAG TGC ATC CGC GAC CCG GCC CTG GTT CAC CAG CGG CCC GCG CCA
1020 N V A H W T T P S L K C I R D P A L V H Q R P A P
1093 CCC TCC ACC GTA ACG ACG GCG GGG GTG ACC CCG CAG CCG GAG AGC CTC TCC CCG TCG GGA AAG GAG CCC GCC GCG
1095 P S T V T T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A
1168 TCG TCG CCC AGC TCG AAC AAC ACG GCG GCC ACA ACT GCA GCG ATC GTC CCG GGC TCC CAG CTG ATG CCG TCG AAG
1170 S S P S S N N T A A T T A A I V P G S Q L M P S K
1243 TCG CCG TCC ACG GGA ACC ACG GAG ATC AGC AGT CAT GAG TCC TCC CAC GGC ACC CCC TCG CAA ACG ACG GCC AAG
1245 S P S T G T T E I S S H E S S H G T P S Q T T A K
1318 AAC TGG GAA CTC ACG GCG TCC GCC TCC CAC CAG CCG CCG GGG GTG TAT CCG CAA GGC CAC AGC GAC ACC ACG TAA
1320 N W E L T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T *
1393 TGA gaattcgcggatcgggttaacggatccaGATCTGCTGTGCTTCTAGTTCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGTCCCTTCCCTGACCC
1400 *
1492 GGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAG
1592 GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCAGGTGCTGAAGAATTGACCGGTTCTCTCT
1692 GGGCCAGAAAGAGCAGGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCTGGTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAG
1792 GAGGGCTCGGCTTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAACCAAACTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGA
1892 AATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA
    
```

Fig. 7D

AG151 hull-15 huGM-CSF

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATOCATATCATAAATATGTACATTTATATGGCTCATGTCCA
 ACATTACCGOCATGTTGACATGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
 GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAATTGAOGTCAATAATGAOGTATGTTCCCATAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAOGGTAAACTGCCCACTTGGC
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAOCCCCCTATTGAOGTCAATGATGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCATTATGCCCRGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTCATOGCTATTACCATGGTGATGOGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGAOGTCAATGGGAGTTTGT
 GGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATG
 GCGGTTAGGOGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTOGTTTTAGTGAACCGTCAGAT
 CGCCTGGAGAOGCCATCCACGCTGTTTTGAOCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC
 TCCGGGGGggegqcgteqacaagaaATGTGGCTCCAGAGCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGC
CTGCAGCATCTCGAACTGGGTGAACGTGATCTCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCC
AGTCGATGCACATCGACGGGACGCTGTACACGGAGTCGGACGTCACCCCGTCTGTCAAGGTC
ACGGCGATGAAGTGCTTCTCTGGAGCTCCAAGTCATCTGGCTCGAGTCGGGGGACGGCTC
GATCCACGACACGGTGGAGAACCTGATCATCTGGGSAACAACTCGCTGTCTCGAACGGGA
ACGTACCGGAGTCGGGCTGCAAGGAGTGGGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTC
CTGCAGTCGTTCTGTCCACATCGTCCAGATGTTTCATCAACACGTCGTGAgggccccgggeggeg
 gaattcggggatateggttaecggatccagATCTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
 TTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGAOCTGGAAAGGTGCCACTCCCACCTGTCTCTTCC
 TAATAAAATGAGGAAATPGCATGCCATTGCTGTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG
 GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
 TGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGAOCCGGTCTCTCTGGGOCAGAAAGAAG
 CAGGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCTGTCCACGCCCTGGTTCCTAGTTCCAGCCCC
 ACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTG
 GAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCAOCAAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGA
 AATTAAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGGAGAGAAAATGCTCCAACATGTTGAGGAA
 GTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 8A

MWLGSLLLLGTVACSLSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHI
 DATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELOVISLES GDASI
 HDTVENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECEEELEEKNIK
 EFLQSFVHIVQMFINTS.

Fig. 8B

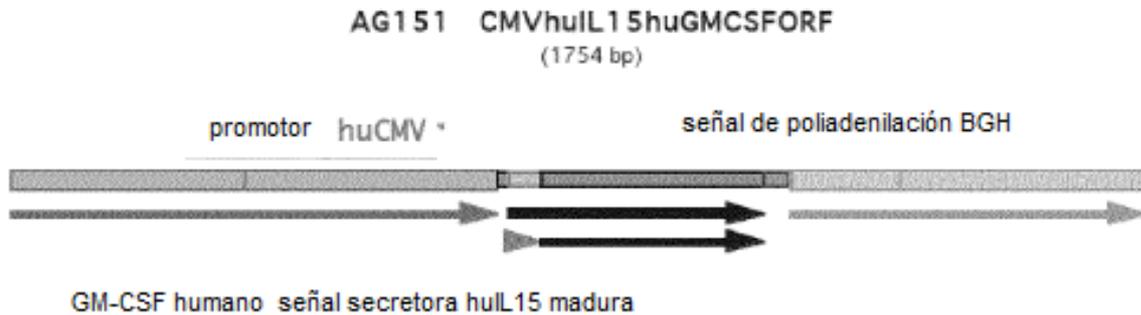


Fig. 8C

```

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATGGCTCATGTCACACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA
101 TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC6CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAAC
201 GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG
301 CCCACTTGGCAGTACATCAAATGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC
401 CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
501 TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACT
601 CCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGCGGTACGGTGGGAGGCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCC
701 ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGGCGCGCGTcgcacaagaa ATG TGG CTC CAG AGC CTG CTA
81 M W L Q S L L
790 CTC CTG GGG ACG GTG GCC TGC AGC ATC TCG AAC TGG GTG AAC GTG ATC TCG GAC CTG AAG AAG ATC GAG GAC CTC
81 L L G T V A C S I S N W V N V I S D L K K I E D L
865 ATC CAG TCG ATG CAC ATC GAC GCG ACG CTG TAC ACG GAG TCG GAC GTC CAC CCG TCG TGC AAG GTC ACG GCG ATG
33 I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M
940 AAG TGC TTC CTC CTG GAG CTC CAA GTC ATC TCG CTC GAG TCG GGG GAC GCG TCG ATC CAC GAC ACG GTG GAG AAC
58 K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N
1015 CTG ATC ATC CTG GCG AAC AAC TCG CTG TCG TCG AAC GGG AAC GTC ACG GAG TCG GGC TGC AAG GAG TGC GAG GAG
83 L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E
1090 CTG GAG GAG AAG AAC ATC AAG GAG TTC CTG CAG TCG TTC GTG CAC ATC GTC CAG ATG TTC ATC AAC ACG TCG TGA
108 L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S *
1165 gggcccgcgccggaattcgcggatattcgggttaacggatcccaGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCTCCCGTGCCTT
1265 CCTTGACCTCGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCAATTCATTTCTGGGGGTGG
1365 GGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGFGCTGAAGAAATTGACCC
1465 GTTCTCTCTGGGCCAGAAAGCAAGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCTGTCCACGCCCTGGTTCTTAATTCCAGCCCACTCATAGGACACT
1565 CATAGCTCAGGAGGGCTCCGCTTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACTAACTAGCTCCAAG
1665 AGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

```

Fig. 8D