



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 518 393**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 08743432 (0)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2160401**

④ Título: **Moléculas de fusión y variantes de IL-15**

⑩ Prioridad:

11.05.2007 US 928900 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2014

⑬ Titular/es:

**ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 NORTH COMMERCE PARKWAY
MIRAMAR, FLORIDA 33025, US**

⑫ Inventor/es:

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

⑭ Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 518 393 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de fusión y variantes de IL-15

Antecedentes de la invención

5 Los Receptores de Células T (TCR) son efectores primarios del sistema inmunitario que tienen ventajas únicas como plataforma para desarrollar agentes terapéuticos. Si bien los agentes terapéuticos de anticuerpos se limitan al reconocimiento de patógenos en la sangre y los espacios extracelulares o a dianas proteicas sobre la superficie de la célula, los receptores de células T pueden reconocer antígenos presentados con moléculas del MHC sobre las superficies de las células (incluyendo antígenos derivados de proteínas intracelulares). Dependiendo del subtipo de células T que reconocen el antígeno presentado y se activan, los receptores de células T y las células T que 10 albergan los receptores de células T pueden participar en el control de diversas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, las células T están implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral a través de la inducción de la diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos. Además, las células T activadas actúan iniciando las respuestas inmunitarias mediadas por células. De este modo, los receptores de células T pueden reconocer dianas adicionales no disponibles para los anticuerpos.

15 Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (células polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B y NK) constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas, las células T funcionan en la vigilancia inmunitaria y en la eliminación de antígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existe una evidencia convincente de que las células T juegan un papel principal en la causalidad y la propagación de enfermedades. En estos trastornos, el 20 desmoronamiento de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causalidad de la enfermedad inmunitaria.

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

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

30 Por otra parte, es deseable utilizar los TCR para dirigir las diferentes moléculas efectoras al sitio de la enfermedad donde pueden proporcionar beneficio terapéutico sin los efectos secundarios asociados con la actividad sistémica no dirigida. Uno de ellos es la IL-15, un miembro de la familia de linfoquinas de cuatro haces de hélices alfa. La IL-15 juega un papel multifacético en el desarrollo y el control del sistema inmunitario. Más específicamente, la IL-15 influye en la función, el desarrollo, la supervivencia, y la proliferación de las células T CD8+, las células NK, las 35 células T asesinas, las células B, los linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) y las células presentadoras de antígenos (CPA). Se ha demostrado que los ratones transgénicos tanto IL-15-/-, como IL-15Ra-/- carecen de poblaciones de células T NK periféricas y asesinas, ciertos subgrupos de LIE, y la mayor parte de células T CD8+ de fenotipo de memoria, sugiriendo que la IL-15 juega un papel en el desarrollo, la proliferación o/y la supervivencia de estos tipos de células. El receptor (R) de IL-15 consiste en tres polipéptidos, el IL-15R alfa de tipo específico ("IL-40 15Ra" o "IL-15Ra"), el IL-2/IL-15R beta ("IL-2Rβ" o "IL-15Rb"), y la cadena gamma común ("γC," o "gC" que es compartida por múltiples receptores de citoquinas).

45 La señalización de IL-15 se puede producir a través del complejo heterotrimérico de IL-15Ra, IL-2Rβ y γC; a través del complejo heterodimérico de IL-2Rβ y γC. Un mecanismo novedoso de acción de la IL-15 es el de la transpresentación en la que la IL-15 y el IL-15Ra son expresados de manera coordinada por las células presentadoras de antígenos (monocitos y células dendríticas), y la IL-15 unida al IL-15Ra se presenta en trans a las células T NK o CD8 próximas que expresan solamente el receptor IL-15RβγC. En cuanto al evento co-estimulador que se produce en la sinapsis inmunológica, la transpresentación de IL-15 parece ser ahora un mecanismo dominante para la acción de IL-15 *in vivo* y parece jugar un papel principal en la inmunovigilancia tumoral (Waldmann, TA, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601). Se ha demostrado que las subunidades de IL-2Ra soluble, 50 que inducen isoformas que contienen una delección del exón 3 y el denominado dominio "sushi" en el extremo N, portan la mayor parte de los elementos estructurales responsables de la unión de las citoquinas. Mientras IL-2Ra solo es un receptor de baja afinidad para la IL-2 (Kd_10 nM), IL-15Ra se une a IL-15 con una afinidad elevada (Kd_100 pM). De este modo el IL-2Ra soluble y la IL-15 son capaces de formar complejos heterodiméricos estables en disolución y estos complejos son capaces de modular (esto es estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del complejo de IL-15R de afinidad elevada o intermedia (Mortier et al. 2006. *J Biol Chem* 281: 1612-1619; Stoklasek et al. 2006. *J Immunol* 177: 6072-6080; Rubinstein et al. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9166-9171).

En el documento de Mosquera, Luis A. et al.: "In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-

Chain TCR Human IgG1 Fusion Protein", Journal of Immunology, American Association of Immunologists, US, Vol. 174, Núm. 7, 1 de Abril de 2005, págs. 4381-4388 se describe la construcción de una proteína, que está formada por un TCR de cadena sencilla soluble conectado genéticamente al dominio constante de una cadena H de IgG1.

5 Dados los efectos conocidos de la IL-15 sobre el sistema inmunitario, se han explorado numerosos enfoques basados en IL-15 para manipular el sistema inmunitario en beneficio de los anfitriones. Si bien la administración de IL-15 se ha empleado para reforzar las respuestas inmunitarias o aumentar la reconstitución del sistema inmunitario, el bloqueo de la actividad de IL-15 puede inhibir las respuestas autoinunitarias y otras respuestas inmunitarias no deseadas (Waldmann, TA, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601). De hecho, una de las limitaciones con el tratamiento sistémico con IL-15 es la posible inducción de enfermedades autoinmunitarias. Otras limitaciones incluyen la dificultad para producir esta citoquina en sistemas de expresión de células de mamífero convencionales así como su vida media muy corta *in vivo*. Por lo tanto, existe la necesidad de generar una forma terapéutica inmunoestimuladora adecuada de IL-15 que presente una vida media *in vivo* más prolongada, un aumento de la actividad de unión a células inmunitarias, o un incremento de la bioactividad. Adicionalmente existe la necesidad de antagonistas de IL-15 eficaces. En teoría sería deseable que tales moléculas fueran dirigidas selectivamente al lugar 10 de la enfermedad para evitar toxicidades sistémicas no deseadas y proporcionar un beneficio terapéutico más eficaz.

15

Compendio de la invención

La presente descripción proporciona numerosas variantes de IL-15 y complejos de proteínas de fusión solubles que tienen uso terapéutico y métodos para elaborar tales proteínas.

20 Las variantes de IL-15 y los complejos solubles descritos en la presente memoria tienen una utilidad terapéutica potencial.

Por consiguiente, la invención proporciona:

1. Un complejo de proteínas de fusión soluble que comprende al menos dos proteínas de fusión, en donde

la primera proteína de fusión comprende (a) un primer receptor de células T de cadena sencilla (scTCR) unido covalentemente a (b) el polipéptido de interleuquina 15 (hIL-15) o un fragmento funcional del mismo; y

25 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo scTCR unido covalentemente a (d) un polipéptido receptor α de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;

en donde el dominio IL15 de la primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión soluble.

30 2. el complejo de proteínas de fusión soluble del apartado 1, en donde el primer scTCR y el segundo scTCR son idénticos, creando de ese modo un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con una mayor actividad de unión.

35 3. el complejo de proteínas de fusión soluble del apartado 1, en donde el primer scTCR es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto.

40 4. el complejo de proteínas de fusión soluble de uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde el primer o segundo scTCR comprenden una cadena V-a de TCR unida covalentemente a una cadena V-b de TCR por medio de una secuencia conectora peptídica.

45 5. el complejo de proteínas de fusión soluble del apartado 4, en donde el scTCR comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Cb de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-b de TCR.

60 6. el complejo de proteínas de fusión soluble del apartado 4 o 5, en donde el scTCR comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Ca de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-a de TCR.

7. el complejo de proteínas de fusión soluble del apartado 1, en donde el polipéptido IL-15 es una variante de IL-15 que comprende al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de IL-15 nativa, por ejemplo, una o más sustituciones o delecciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura. (SEQ ID NO: 1), tal como la sustitución de D por N o A en la posición 8, D por A en la posición 61, N por A en la posición 65, N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura, N por R en la posición 72 o Q por A en la posición 108 de la secuencia de IL-15 humana madura, o cualquier combinación de estas sustituciones.

En otra realización del aspecto, el TCR es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto.

En una realización adicional del aspecto, el TCR es un heterodímero que comprende un TCR de cadena a y b.

50 En otra realización más del aspecto, el TCR comprende un polipéptido TCR de cadena sencilla. En una realización adicional, el TCR de cadena sencilla comprende una cadena V- α de TCR unida covalentemente a una cadena V- β

de TCR por medio de una secuencia conectora peptídica. En otra realización más, el TCR de cadena sencilla comprende adicionalmente un fragmento de la cadena C β de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V- β de TCR.

5 En otra realización, el TCR de cadena sencilla comprende adicionalmente un fragmento de la cadena C α de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V- α de TCR.

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

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

En una realización de los aspectos descritos anteriormente, la invención caracteriza una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión o la segunda proteína de fusión de uno cualquiera de los apartados 1-7.

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

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

20 En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor, una señal de inicio de la traducción, y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia que codifica la proteína de fusión o la variante de IL-15. En otra realización, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descrita anteriormente está contenida en un vector de ADN (apartado 9).

La invención proporciona adicionalmente un vector de ADN que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión de cualquiera de los apartados 1-7; y una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión de cualquiera de los apartados 1-7.

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

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

45 Adicionalmente se describe un método para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una célula anfitriona de un vector de ADN del apartado 11 que codifica la primera y segunda proteínas de fusión, el cultivo de la célula anfitriona en el medio en condiciones suficientes para expresar las proteínas de fusión en la célula o el medio y permitir la asociación entre el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión y el dominio IL-15Ra soluble de una segunda proteína de fusión para formar el complejo de proteínas de fusión soluble, purificando el complejo de proteínas de fusión soluble a partir de las células anfitrionas o el medio.

55 Adicionalmente se describe que el vector de ADN que codifica la variante de IL-15 se utiliza en lugar del vector de ADN que codifica la primera proteína de fusión para generar una célula anfitriona susceptible de expresar la variante de IL-15 y se permite que la variante de IL-15 se asocie con el dominio IL-15Ra de una segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión soluble.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En otra realización, la invención caracteriza el complejo de proteínas de fusión soluble de uno cualquiera de los apartados 1-7 para su uso en un método para estimular o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero (apartado 10).

50 Descripción de los dibujos

La Figura 1 (A y B) es un dibujo esquemático. (A) es un esquema que representa un ejemplo de un complejo de una proteína de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla. (B) es un esquema que representa constructos representativos de proteínas de fusión que comprende el complejo de proteínas de fusión.

La Figura 2 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa de del vector de expresión de pNEF38-

c264scTCR/hull15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/hull15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 3 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-hull15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-hull15, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 4 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/hull15RaDE3. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/hull15RaΔE3 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15RaΔE3, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 5 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/hull15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/hull15RaSushi y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15RaSushi, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 6 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa el vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-hull15RaSushi y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-hull15RaSushi, incluyendo la secuencia líder.

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

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

20 La Figura 9 (A y B) expone la caracterización de células transfectadas que expresan la proteína de fusión de TCR/IL15Ra. (A) son dos gráficos que muestran el análisis citométrico de flujo de células que expresan la proteína de fusión. (B) es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA basado en TCR para la producción de la proteína de fusión.

La Figura 10 (A y B) muestra el análisis de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra por medio de SDS PAGE reductora. (A) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/hull15 o c264scTCR/hull15RaSushi. (B) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/hull15 o c264scTCR/hull15RaΔE3.

25 La Figura 11 (A - C) muestra el análisis de TCR/IL15, TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/hull15. (B) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/hull15RaSushi. (C) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC del complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi.

30 La Figura 12 (A y B) es un análisis de TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/hull15RaΔE3. (B) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC del complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaΔE3.

35 La Figura 13 es un gráfico que muestra la unión de TCR/IL15, TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión a complejos de péptido/MHC presentados sobre las células, según se determina mediante citometría de flujo.

40 La Figura 14 (A-D) consiste en cuatro paneles. (A) muestra la secuencia de la proteína IL15 humana madura (SEQ ID NO: 1) y los residuos subrayados en color azul están sustituidos en las variantes de IL-15 como se muestra en la Tabla 1. (B) muestra los vectores de expresión pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8N. (C) muestra la secuencia de los genes pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8N y (D) muestra la secuencia de la proteína de fusión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-hull15D8N, incluyendo la secuencia líder. Los nucleótidos subrayados se cambiaron para generar las variantes de IL-15 indicadas.

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

50 La Figura 16 (A - C) son gráficos que muestran la unión de complejos de proteínas de fusión diméricos de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15, que comprende formas nativas y variantes de IL15, a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en células cargadas con el péptido, como se determina mediante citometría de flujo. También se muestra la unión de fondo de los complejos de proteínas de fusión diméricos en las células sin péptido cargado (A) es un gráfico que muestra la unión de los complejos diméricos de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en las células. (B) es un gráfico que muestra la ligera unión de fondo de complejos diméricos de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15wt (forma nativa) a las células sin péptido cargado. No se observó unión de fondo de complejos diméricos de TCR/IL15RaSushi y variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a las células no cargadas. (C) es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células 32Dβ que portan IL-15RβγC teñidas con

complejos dímeros de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15N72D, TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A. Se observó el aumento de la unión a IL-15R $\beta\gamma$ C del complejo que contenía TCR/IL15N72D y la disminución de la unión a IL-15R $\beta\gamma$ C de los complejos que contenían TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A.

5 La Figura 17 (A y B) son gráficos que muestran las actividades de unión de proteínas de fusión de TCR/IL15, antagonistas, y agonistas de tipo amplio a complejos de péptidos cognados/MHC e IL15Ra según se determina mediante ELISA. (A) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a complejos de péptidos cognados/MHC. (B) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a IL15Ra.

La Figura 18 es un gráfico que muestra las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión que apoyan el crecimiento de células que portan IL15R como se determina mediante un análisis de proliferación celular.

10 La Figura 19 (A - C) son gráficos que muestran la capacidad de las proteínas de fusión de TCR/IL-15 que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o aumentar el crecimiento de células que portan IL15R, como se determina mediante un análisis de proliferación celular. (A) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir la proliferación de células CTLL-2 que portan IL15R (complejo receptor $\alpha\beta\gamma$) de alta afinidad. (B) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o potenciar la proliferación de células 32D β que portan IL15R (complejo receptor $\beta\gamma$) de baja afinidad. (C) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para bloquear la proliferación estimulada por TCR/IL15wt de células CTLL-2 que portan IL15R de alta afinidad (complejo receptor $\alpha\beta\gamma$).

20 La Figura 20 representa los efectos de la incubación in vitro de células de NK con complejos de proteínas de fusión dímeros de TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15 sobre la supervivencia de xenoinjertos de ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores. A los ratones carentes de sistema inmunitario atípicos se les inyectaron células NSCLC A549-A2 humanas para permitir el establecimiento de metástasis de pulmón. Las células NK purificadas aisladas de bazos de ratones donantes alogénicos se incubaron in vitro con rhIL-2, MART1scTCR-IL2, c264scTCR-IL2 o c264scTCR-IL15/c264scTCR-IL15Ra y se transfirieron adoptivamente a los ratones portadores de tumores que habían sido pretratados con ciclofosfamida (CTX), como se indica en la leyenda de la figura. Se trazó el porcentaje de supervivencia después del tratamiento.

25 La Figura 21 expone la Tabla 1 que muestra las sustituciones de aminoácidos en las variantes de IL-15 y los efectos de estos cambios sobre la actividad de IL-15.

30 Las Figuras 22A-B exponen la secuencia de aminoácidos de la IL-15 (SEC ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico de IL-15 (SEC ID NO: 2), respectivamente.

Descripción detallada de la invención

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

Definiciones

40 Las siguientes definiciones se proporcionan para los términos específicos que se utilizan en la siguiente descripción escrita.

Según se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. El término "una molécula de ácido nucleico" incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

45 Tal según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "que comprende" signifique que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros elementos. "Que consiste esencialmente en", cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación ni portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" significará que excluye más elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para la administración de las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

55 Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítopo específico. El término abarca anticuerpos polyclonales, monoclonales, químéricos y de cadena sencilla, así

como anticuerpos biespecíficos.

El término "antígeno", según se utiliza en la presente memoria representa cualquier sustancia que hace que el sistema inmunitario produzca anticuerpos o respuestas inmunitarias mediadas por células específicas contra ella. Un antígeno asociado a una enfermedad es cualquier sustancia que está asociada con cualquier enfermedad.

5 Se pretende que el término "polipéptido biológicamente activo" según se utiliza en la presente memoria se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, o lipoproteína que puede producir los efectos deseados comentados en la presente memoria, incluyendo un TCR o un complejo de una proteína de fusión de anticuerpo con actividad de unión al antígeno.

10 Se pretende que el término "célula", según se utiliza en la presente memoria incluya cualquier célula primaria procariótica, eucariótica o línea celular inmortalizada, cualquier grupo de células tales como, un tejido o un órgano. Preferiblemente las células son de mamífero y particularmente de origen humano, y pueden estar infectadas por uno o más patógenos. Una "célula anfitriona" de acuerdo con la invención puede ser una célula transfectada, transformada, transducida o infectada de cualquier origen, incluyendo células procarióticas, eucarióticas, de mamífero, de ave, de insecto, de planta o bacterianas, o puede ser una célula de cualquier origen que se puede utilizar para propagar un ácido nucleico descrito en la presente memoria.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

conectores internucleotídicos).

Se pretende que el término "polipéptido" se refiera a cualquier polímero que consista preferiblemente esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, independientemente de su tamaño. Aunque el término "proteína" se utiliza a menudo en referencia a proteínas relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la materia a menudo se solapa. El término "polipéptido" se refiere generalmente a proteínas, polipéptidos, y péptidos a no ser que se indique lo contrario. Los péptidos útiles de acuerdo con la presente invención, en general, tendrán generalmente entre aproximadamente 0,1 y 100 KD o más hasta aproximadamente 1.000 KD, preferiblemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 KD a juzgar por las técnicas convencionales de dimensionamiento de moléculas tales como centrifugación o electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

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

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

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

Las disoluciones acuosas referidas en la presente memoria tienen típicamente un compuesto tamponador para establecer un pH, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5-9, y un intervalo de fuerza iónica entre aproximadamente 2 mM y 500 mM. En ocasiones se añade un detergente no iónico suave o inhibidor de la proteasa. Adicionalmente, se puede añadir si se desea una proteína portadora tal como albúmina de suero bovino (BSA) a unos pocos mg/ml. Los tampones acuosos ilustrativos incluyen solución salina tamponada con fosfatoconvencional, solución salina tamponada con tris, u otros tampones y formulaciones de medios celulares conocidos.

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

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

Se pretende que el término "Receptor de células T" (TCR) haga referencia a polipéptidos de un complejo de proteínas integrantes de la membrana que participa en la activación de las células T en respuesta a la presentación del antígeno. Las células T reconocen un péptido unido al producto del MHC a través del receptor de células T (TCR) heterodimérico $\alpha\beta$. El repertorio de TCR tiene una considerable diversidad creada por el mismo mecanismo de reordenamiento génico utilizado en los genes de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos [Tonegawa, S. (1988) Biosci. Rep. 8:3-26]. La mayor parte de la diversidad se genera en las conexiones de las regiones variable (V) y de empalme (J) (o diversidad, D) que codifican la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de las cadenas α y β [Davis and Bjorkman (1988) Nature 334:395-402]. Sin embargo, los TCR no experimentan mutaciones puntuales somáticas como lo hacen los anticuerpos y, quizás no casualmente. Los TCR tampoco experimentan el mismo grado de maduración de la afinidad que los anticuerpos. Los TCR como ocurre en la naturaleza parece que tienen afinidades que oscilan de 10^5 a 10^7 M⁻¹ mientras que los anticuerpos tienen típicamente afinidades que oscilan de 10^5 a 10^9 M⁻¹ [Davis et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16:523-544; Eisen et al. (1996) Adv. Protein Chem. 49:1-56]. Si bien la ausencia de mutación somática en los TCR puede estar asociada con afinidades inferiores, también se ha señalado que no es una ventaja selectiva para un TCR tener una afinidad más alta. De hecho, los modelos de activación en serie [Valitutti et al. (1995) Nature 375:148-151] y de actividad correctora cinética [Rabinowitz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1401-1405] de activación de células T sugieren ambos que tasas de disociación más extensas (asociadas con una afinidad más alta) serían perjudiciales para el proceso de

señalización. También es posible que los TCR de afinidad más alta no mantuvieran la especificidad por el péptido requerida para las respuestas de la célula T. Por ejemplo, los péptidos unidos en la hendidura del MHC despliegan una superficie accesible limitada [Bjorkman, P. J. (1997) *Cell* 89:167-170], lo que a su vez puede limitar la cantidad de energía que se puede generar en la interacción. Por otro lado, el aumento de la afinidad de un TCR dirigiendo la energía hacia las hélices del MHC conduciría presumiblemente a la deleción tímica durante la selección negativa [Bevan, M. J. (1997) *Immunity* 7:175-178]. El término "TCR" abarca receptores de células T policlonales, monoclonales, químéricos, humanizados, heterodiméricos y de cadena sencilla o un fragmento funcional de los mismos, incluyendo la molécula que comprende los dominios $\text{V}\alpha$ y $\text{V}\beta$ del TCR. El término "TCR" también abarca los receptores de células T descritos por ejemplo en, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Titulada "T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF", presentada el 19 de Marzo de 2008 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2003 01-44474A1.

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

Receptores de células T (TCR)

Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B, NK), constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas las células T funcionan en la vigilancia inmunológica y en la eliminación de抗ígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existen pruebas convincentes de que las células T desempeñan un papel importante en la causa y la propagación de la enfermedad. En estos trastornos, el fallo de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causa de las enfermedades autoinmunitarias.

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

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

Proteínas de fusión

Los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención comprenden al menos dos proteínas de fusión solubles, donde la primera proteína de fusión comprende un primer scTCR unido covalentemente a interleuquina 15 (IL-15) o un fragmento funcional de la misma; la segunda proteína de fusión comprende un segundo scTCR unido covalentemente al polipéptido receptor alfa de interleuquina 15 (IL-15Ra) soluble o un fragmento funcional del mismo, y en donde el dominio IL-15 de una primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión soluble.

De este modo se crea un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con una mayor actividad de unión para ligandos cognados en comparación con el TCR monovalente.

En ciertos ejemplos, se producen TCR que tienen una mayor afinidad, o un incremento de afinidad de unión para ligandos cognados en comparación, por ejemplo, con el TCR nativo. Si el scTCR soluble de la invención descrito en la presente memoria tiene una mayor avidez o afinidad por su ligando, es útil como sonda específica para el抗ígeno unido a la superficie de la célula. En ciertos ejemplos preferidos de la invención, el scTCR es específico

para el reconocimiento de un antígeno concreto.

En realizaciones ilustrativas, el TCR es un heterodímero que comprende una cadena α (referida en la presente memoria como cadena α , alfa o a) y una cadena β (referida en la presente memoria como cadena β , beta o b). En otras realizaciones ilustrativas, el TCR comprende un polipéptido de TCR de cadena sencilla. El TCR de cadena

5 sencilla puede comprender una cadena V- α de TCR unida covalentemente a una cadena V- β de TCR por medio de una secuencia conectora peptídica. El TCR de cadena sencilla puede comprender adicionalmente un fragmento de la cadena C β del TCR soluble unido covalentemente a una cadena V- β del TCR. El TCR de cadena sencilla puede comprender adicionalmente un fragmento de la cadena C α de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V- α de TCR.

10 Los efectos deseados de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la formación de un complejo de proteínas de fusión de TCR con aumento de la actividad de unión, eliminación de una célula diana, p. ej., para inducir la proliferación celular o la muerte celular, iniciar una respuesta inmunitaria, en la prevención o tratamiento de una enfermedad, o para actuar como molécula de detección con fines diagnósticos. Para semejante detección, se 15 podría utilizar un análisis, por ejemplo un análisis que incluya etapas sucesivas de cultivo de células para su proliferación, y el contacto de las células con un complejo de fusión de TCR de la invención y a continuación la evaluación de si el complejo de fusión de TCR inhibe el desarrollo adicional de las células.

20 La conexión covalente de la molécula efectora al péptido de scTCR de acuerdo con la invención proporciona una serie de ventajas significativas. Se pueden producir complejos de fusión de scTCR de la invención que contienen una única molécula efectora, incluyendo tal péptido de estructura conocida. Adicionalmente, se puede producir una amplia variedad de moléculas efectoras en vectores de ADN similares. Esto es, se puede conectar una biblioteca de 25 moléculas efectoras diferentes a la molécula de TCR para la presentación de las células infectadas o enfermas. Adicionalmente, para aplicaciones terapéuticas, en lugar de la administración de una molécula de TCR a un sujeto, se puede administrar el vector de expresión de ADN que codifica la molécula de TCR conectada al péptido efector para la expresión in vivo del complejo de fusión de TCR. Semejante enfoque evita etapas de purificación costosas típicamente asociadas con la preparación de proteínas recombinantes y evita las complejidades de la absorción y procesamiento de los antígenos asociados con los enfoques convencionales.

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

35 Conectores

Los complejos de fusión de la invención también incluyen preferiblemente una secuencia conectora flexible intercalada entre los dominios IL-15 o IL-15Ra y el polipéptido de scTCR. La secuencia conectora debe permitir el posicionamiento eficaz del scTCR con respecto a los dominios IL-15 o IL-15Ra para permitir la actividad funcional de ambos dominios.

40 La secuencia conectora sitúa la hendidura de unión de la molécula de TCR de manera que el receptor de células T pueda reconocer complejos presentadores de MHC-peptido y pueda liberar la molécula efectora en el sitio deseado. La presentación satisfactoria de la molécula efectora puede modular la actividad de una célula para inducir o para 45 inhibir la proliferación de las células T, o para iniciar o inhibir una respuesta inmunitaria en un sitio concreto, como se determina mediante los análisis descritos más abajo, incluyendo los análisis in vitro que incluyen etapas sucesivas de cultivo de células T para su proliferación, y el contacto de las células T con un complejo de fusión de scTCR de la invención y a continuación la evaluación de si el complejo de fusión de scTCR inhibe el desarrollo adicional de las células.

El complejo de proteínas de fusión soluble tiene un conector en donde el primer scTCR está unido covalentemente a IL-15 (o un fragmento funcional de la misma) por una secuencia conectora polipeptídica.

50 El complejo de proteínas de fusión soluble descrito en la presente memoria tiene un conector en donde el segundo scTCR está unido covalentemente a un polipéptido de IL-15Ra (o un fragmento funcional del mismo) por una secuencia conectora polipeptídica.

55 La secuencia conectora está codificada preferiblemente por una secuencia de nucleótidos que da como resultado un péptido que puede situar eficazmente la hendidura de unión de la molécula de TCR para el reconocimiento de un antígeno de presentación. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que la expresión "localización eficaz del polipéptido biológicamente activo que es scTCR con respecto a los dominios IL-15 o IL-15Ra", u otra expresión similar, represente que el polipéptido biológicamente activo unido a los dominios IL-15 o IL-15Ra esté localizado de manera que los dominios IL-15 o IL-15Ra sean susceptibles de interaccionar entre sí para formar un complejo de

proteína. En ciertas realizaciones, los dominios IL-15 o IL-15Ra están localizados eficazmente para permitir interacciones con células inmunitarias para iniciar o inhibir una reacción inmunitaria, o para inhibir o estimular el desarrollo celular.

5 Preferiblemente la secuencia conectora comprende de aproximadamente 7 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 8 a 16 aminoácidos. La secuencia conectora es preferiblemente flexible con el fin de no mantener el polipéptido biológicamente activo o la molécula efectora en una única conformación no deseada. La secuencia conectora se puede utilizar, p. ej., para separar el sitio de reconocimiento de la molécula fusionada. Específicamente, la secuencia conectora peptídica puede estar localizada entre el polipéptido biológicamente activo y la molécula efectora, p. ej., para entrecruzarlos químicamente y para proporcionar flexibilidad molecular. El conector preferiblemente comprende predominantemente aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. Preferiblemente aproximadamente 80 o 90 por ciento o más de la secuencia conectora comprende residuos de glicina, alanina o serina, concretamente residuos de glicina y serina. Para un complejo de proteínas de fusión que comprende un TCR heterodimérico, la secuencia conectora está unida adecuadamente a la cadena b de la molécula de TCR, aunque la secuencia conectora también podría estar anclada a la cadena a de la molécula de TCR. Alternativamente, la secuencia conectora puede estar unida a las cadenas a y b de la molécula de TCR. Cuando semejante cadena peptídica beta es expresada junto con la cadena a, el péptido TCR-efector unido se debe plegar dando como resultado una molécula de TCR funcional como se representa generalmente en la Figura 1. Una secuencia conectora adecuada es ASGGGGSGGG (esto es ala ser gly gly gly gly ser gly gly gly), unida preferiblemente al primer aminoácido del dominio b del TCR. Se podrían utilizar secuencias conectoras diferentes incluyendo cualquiera de los numerosos diseños de conectores flexibles que se ha utilizado con éxito para conectar entre sí regiones variables de anticuerpos, véase Whitlow, M. et al., (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105. En algunos ejemplos, para unir covalentemente una molécula efectora a una molécula de la cadena b de TCR, la secuencia de aminoácidos del conector debe ser capaz de abarcar una distancia adecuada desde el residuo C terminal de la cadena beta de TCR hasta el residuo N terminal de la molécula efectora. Las secuencias conectoras adecuadas se pueden identificar fácilmente de manera empírica. Adicionalmente, también se pueden determinar el tamaño y las secuencias adecuadas de las secuencias conectoras mediante técnicas de modelado por ordenador convencionales basadas en el tamaño y en la forma pronosticadas de la molécula de TCR.

30 El general, la preparación de los complejos de proteínas de fusión de la invención se puede completar mediante procedimientos descritos en la presente memoria y mediante técnicas de ADN recombinante reconocidas que implican, p. ej., reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), preparación de ADN plasmídico, escisión de ADN con enzimas de restricción, preparación de oligonucleótidos, ligación de ADN, aislamiento de ARNm, introducción del ADN en una célula adecuada, transformación o transfección de un anfitrión, cultivo del anfitrión. Adicionalmente, las moléculas de fusión se pueden aislar y purificar utilizando agentes caotrópicos y 35 métodos electroforéticos, de centrifugación y cromatográficos bien conocidos. Véanse en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Segunda Ed.) (1989); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York (1989) para descripciones relacionadas con estos métodos.

40 De acuerdo con la invención, la primera proteína de fusión comprende un primer receptor de células T de cadena sencilla (scTCR) unido covalentemente al dominio interleuquina-15 (IL-15) o un fragmento funcional del mismo. La IL-15 es una citoquina que afecta a la activación y proliferación de células T. La actividad de IL-15 al afectar a la activación y proliferación de células inmunitarias es similar en algunos aspectos a IL-2, aunque se han caracterizado bien las diferencias fundamentales (Waldmann, TA, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601.

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

5 sustituciones/delecciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura; concretamente, sustituciones D8N ("D8" se refiere a la posición del aminoácido y el residuo en la secuencia de IL-15 humana madura nativa y "N" se refiere al residuo de aminoácido sustituido en esa posición en la variante de IL-15), D8A, D61A, N65A, N72R o Q108A dan como resultado variantes de IL-15 con actividad antagónica y las sustituciones N72D dan como resultado variantes de IL-15 con actividad agonística.

10 Si bien en un aspecto de la invención la variante de IL-15 es un componente de un complejo de proteínas de fusión, se describe adicionalmente la variante de IL-15 como proteína no de fusión. Preferiblemente la forma no de fusión de la variante de IL-15 es una citoquina soluble que funciona como agonista o antagonista de IL-15. En algunos 15 ejemplos, la variante de IL-15 no de fusión forma un complejo con IL-15Ra mientras que en otro ejemplo, actúa de forma independiente de IL-15Ra.

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

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

25 En algunos contextos, puede resultar útil elaborar complejos de fusión de proteínas solubles de la presente invención polivalentes, p. ej., para aumentar la valencia del scTCR. En particular, las interacciones entre los dominios IL-15 y IL-15Ra del complejo de proteínas de fusión proporcionan un método para generar complejos polivalentes. Además, la proteína de fusión polivalente se puede elaborar uniendo covalentemente o no covalentemente entre 1 y 4 proteínas (iguales o diferentes) utilizando p. ej., técnicas de marcaposición con biotina-estreptavidina convencionales, o mediante conjugación con soportes sólidos adecuados tales como cuentas de 30 látex. Las proteínas entrecruzadas químicamente (por ejemplo entrecruzadas con dendrímeros) también son especies polivalentes adecuadas. Por ejemplo, la proteína se puede modificar mediante la inclusión de secuencias que codifican las secuencias de etiquetas que se pueden modificar, tales como la etiqueta de biotinilación BirA o residuos de aminoácidos con cadenas laterales químicamente reactivas tales como Cys o His. Tales etiquetas de aminoácidos o aminoácidos químicamente reactivos se pueden localizar en una variedad de posiciones en la proteína de fusión, preferiblemente distales con respecto al sitio activo del polipéptido biológicamente activo o 35 molécula efectora. Por ejemplo, el extremo C de una proteína de fusión soluble se puede unir covalentemente a una etiqueta u otra proteína fusionada que incluye tales uno o más aminoácidos reactivos. Se pueden incluir cadenas laterales adecuadas para conectar químicamente dos o más proteínas de fusión a un dendrímero adecuado u otra nanopartícula para dar una molécula multivalente. Los dendrímeros son polímeros químicos sintéticos que pueden 40 tener cualquiera de una serie de diferentes grupos funcionales en su superficie (D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)). Los dendrímeros ilustrativos para uso de acuerdo con la presente invención incluyen p. ej., dendrímero de poliamina "starburst" E9 y dendrímero de poliamina "combust" E9, que pueden conectar residuos de cistina.

Ácidos nucleicos y Vectores

Ácidos nucleicos

45 La invención proporciona adicionalmente secuencias de ácido nucleico y en particular secuencias de ADN que codifican las presentes proteínas de fusión. Preferiblemente, la secuencia de ADN es transportada por un vector adecuado para la replicación extracromosómica tal como un fago, virus, plásmido, fagérido, cósmido, YAC, o episoma. En particular, se puede utilizar un vector de ADN que codifica una proteína de fusión deseada para facilitar los métodos preparativos descritos en la presente memoria y obtener cantidades significativas de la proteína de fusión. La secuencia de ADN se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que 50 contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estos incluyen sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede emplear cualquiera de varios 55 elementos de transcripción y traducción adecuados. Véanse generalmente Sambrook et al., más arriba y Ausubel et al. más arriba.

Se describen métodos para elaborar un complejo de proteínas de fusión soluble, comprendiendo el método introducir

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

En general, un vector de ADN preferido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos unida por enlaces fosfodiéster que comprende, en una dirección 5' a 3', un primer sitio de clonación para la introducción de una primera secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de TCR, conectado operativamente a una secuencia que codifica una molécula efectora.

- 10 Los componentes de la proteína de fusión codificados por el vector de ADN se pueden proporcionar en un formato de casete. Por el término "casete" se quiere significar que cada componente puede ser fácilmente sustituido por otro componente mediante métodos recombinantes convencionales. En particular, un vector de ADN configurado en forma de casete es particularmente deseable cuando el complejo de fusión codificado se va a utilizar frente a patógenos que pueden tener o tienen la capacidad de desarrollar serotipos.
- 15 Para elaborar el vector que codifica un complejo de fusión de TCR, se une la secuencia que codifica la molécula de TCR con una secuencia que codifica el péptido efector mediante el uso de ligasas adecuadas. El ADN que codifica el péptido presentador se puede obtener aislando ADN de fuentes naturales, por ejemplo de una línea celular adecuada o mediante métodos sintéticos conocidos, p. ej., el método del triéster fosfato. Véase, p. ej., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984). Los oligonucleótidos sintéticos también se pueden preparar utilizando sintetizadores oligonucleotídicos automáticos disponibles en el mercado. Una vez aislado, el gen que codifica la molécula de TCR puede ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros medios conocidos en la técnica. Los cebadores de la PCR adecuados para amplificar el gen del péptido TCR pueden añadir sitios de restricción al producto de la PCR. El producto de la PCR incluye preferiblemente sitios de empalme para el péptido efector y las secuencias líder necesarias para una expresión y secreción adecuadas del complejo de fusión TCR-efector. El producto de la PCR también incluye preferiblemente una secuencia que codifica la secuencia conectora, o un sitio para una enzima de restricción para la ligación de tal secuencia.

Las proteínas de fusión descritas en la presente memoria se producen preferiblemente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, una vez que se aísla la molécula de ADN que codifica la proteína de TCR, la secuencia se puede ligar a otra molécula de ADN que codifica el polipéptido efector. La secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de TCR puede estar unida directamente a una secuencia de ADN que codifica el péptido efector o, más típicamente, se puede intercalar una secuencia de ADN que codifica la secuencia conectora comentada en la presente memoria entre la secuencia que codifica la molécula de TCR y la secuencia que codifica el péptido efector y se pueden unir utilizando ligasas adecuadas. La molécula híbrida de ADN resultante se puede expresar en una célula anfitriona adecuada para producir un complejo de fusión de TCR. Las moléculas de ADN se ligan entre sí en una orientación 5' a 3' de manera que, tras la ligación, el marco traduccional de los polipéptidos codificados no resulta alterado (esto es, las moléculas de ADN se ligan entre sí en marco). Las moléculas de ADN resultantes codifican una proteína de fusión en marco.

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

En la obtención de las secuencias codificantes de TCR variantes, los expertos en la técnica reconocerán que las proteínas derivadas de TCR pueden ser modificadas por ciertas sustituciones, adiciones, delecciones de aminoácidos, y modificaciones post-traduccionales, sin pérdida o reducción de la actividad biológica. En particular, es bien sabido que las sustituciones de aminoácidos conservativas, esto es, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de tamaño, carga, polaridad y conformación similares, es poco probable que altere significativamente la función de la proteína. Los 20 aminoácidos convencionales que son constituyentes de las proteínas se pueden clasificar ampliamente en cuatro grupos de aminoácidos conservativos como sigue: el grupo no polar (hidrófobo) incluye alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina; el grupo polar (no cargado, neutro) incluye asparragina, cisteína, glutamina, glicina, serina, treonina y tirosina; el grupo cargado positivamente (alcalino) contiene arginina, histidina y lisina; y el grupo cargado negativamente (ácido) contiene ácido aspártico y ácido glutámico. Es poco probable que la sustitución en una proteína de un aminoácido por otro de un mismo grupo tenga un efecto adverso sobre la actividad biológica de la proteína.

- 55 La homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante análisis de hibridación de ADN, en donde la estabilidad del híbrido de ADN de doble hebra depende del grado de emparejamiento de bases que se produzca. Las condiciones de alta temperatura y/o de bajo contenido de sal reducen la estabilidad del híbrido, y se pueden variar para evitar la hibridación de las secuencias que tienen menos de un grado seleccionado de homología. Por ejemplo, para las secuencias con aproximadamente 55% de contenido de GC, las condiciones de hibridación y lavado de 40-50°C, 6xSSC (tampón de cloruro de sodio/citrato de sodio) y SDS (dodecilsulfato de

- 5 sodio) al 0,1% indican aproximadamente una homología de aproximadamente 60-70%, las condiciones de hibridación y lavado de 50-65°C, 1xSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 82-97%, y las condiciones de hibridación y lavado de 52°C, 0,1xSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 99-100%. También se encuentra disponible una amplia gama de programas informáticos para comparar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (y medir el grado de homología), y una lista que proporciona fuentes de soporte lógico tanto asequibles comercialmente como libres se encuentra en Ausubel et al. (1999). Los algoritmos de comparación de secuencias y alineamiento de secuencias múltiples fácilmente asequibles son, respectivamente, los programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) y ClustalW. BLAST está disponible en la red en ncbi.nlm.nih.gov y una versión de ClustalW está disponible en 2.ebi.ac.uk.
- 10 10 Los componentes de la proteína de fusión se pueden organizar casi en cualquier orden siempre que cada uno sea capaz de realizar su función pretendida. Por ejemplo, en una realización, el TCR está situado en el extremo C o N terminal de la molécula efectora.
- 15 15 Las moléculas efectoras preferidas de la invención tendrán tamaños que conduzcan a la función a la cual están destinados esos dominios. Las moléculas efectoras de la invención se pueden elaborar y fusionar al TCR mediante una variedad de métodos incluyendo métodos de entrecruzamiento químico bien conocidos. Véase p. ej., Means, G. E. y Feeney, R. E. (1974) en *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. Véase también S. S. Wong (1991) en *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press. Sin embargo se prefiere generalmente utilizar manipulaciones recombinantes para elaborar la proteína de fusión en marco.
- 20 20 Como se ha indicado, una molécula de fusión o una molécula conjugada de acuerdo con la invención se pueden organizar de diferentes maneras. En una configuración ilustrativa, el extremo C del TCR está conectado operativamente al extremo N de la molécula efectora. Esta conexión se puede lograr, si se desea, mediante métodos recombinantes. Sin embargo, en otra configuración, el extremo N del TCR está conectado al extremo C de la molécula efectora.
- 25 25 Alternativamente, o además, se pueden insertar una o más moléculas efectoras adicionales en los complejos de fusión o conjugados de TCR según se necesite.
- Vectores y Expresión*
- 30 30 Se pueden emplear varias estrategias para expresar complejos de fusión de proteínas solubles de la invención. Por ejemplo, el constructo de fusión del gen de TCR descrito anteriormente se puede incorporar a un vector adecuado mediante métodos conocidos tales como el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en el vector para la inserción del constructo seguida de ligación. El vector que contiene el constructo génico se introduce a continuación en un anfítrion adecuado para la expresión del péptido de fusión de TCR. Véase, en general, Sambrook et al., más arriba. La selección de vectores adecuados puede realizarse empíricamente basándose en factores relacionados con el protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con, y tener el replicón apropiado para el anfítrion que se está empleando. Adicionalmente el vector debe ser capaz de acomodar la secuencia de ADN que codifica el complejo de fusión de TCR que se va a expresar. Las células anfítrionas adecuadas incluyen células eucarióticas y procarióticas, preferiblemente aquellas células que pueden transformarse fácilmente y exhiben un rápido crecimiento en medio de cultivo. Las células anfítrionas específicamente preferidas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, p. ej., *S. cerevisiae*. Generalmente se prefieren células de mamíferos, particularmente J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros anfítriones adecuados incluyen, p. ej., células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, más arriba. A continuación se pueden seleccionar las líneas celulares transformadas o transfectadas estables. Las células que expresan un complejo de fusión de scTCR de la invención se pueden determinar por medio de procedimientos conocidos. Por ejemplo, la expresión de un complejo de fusión de TCR unido a una inmunoglobulina se puede determinar mediante un ELISA específico para la inmunoglobulina unida y/o mediante inmunotransferencia. Otros métodos para detectar la expresión de las proteínas de fusión que comprenden TCR unidos a dominios IL-15 o IL-15Ra se describen en los Ejemplos.
- 40 40 Como se menciona generalmente más arriba, se puede utilizar una célula anfítriona con fines preparativos para propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada. De este modo, una célula anfítriona puede incluir una célula procariótica o eucariótica en la cual se desea específicamente la producción de la proteína de fusión. Por lo tanto las células anfítrionas incluyen específicamente, células y órganos de levadura, mosca, gusano, planta, rana, mamífero que son capaces de propagar el ácido nucleico que codifica la fusión. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen células CHO dhfr- (Urlaub y Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), células 293 (Graham et al., J Gen. Virol., 36:59 (1977)) o células de mieloma de tipo SP2 o NSO (Galfre y Milstein, Meth. Enzymol., 73(B): 3 (1981)).
- 45 45 55 Las células anfítrionas capaces de propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada abarcan también células eucarióticas no de mamífero, incluyendo células de insecto (p. ej., *Sp. frugiperda*), levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; como fue revisado en general por Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486496 (1992)), fúngicas y vegetales. También se contemplan ciertos procariotas tales como *E. coli* y *Bacillus*.

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

5 Se pueden utilizar diversos promotores (región reguladora del inicio de la transcripción).

La selección del promotor apropiado depende del anfitrión de expresión propuesto. Los promotores procedentes de fuentes heterólogas se pueden ser utilizar siempre y cuando sean funcionales en el anfitrión seleccionado.

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

15 Se pueden utilizar diversas secuencias señal. Se puede utilizar una secuencia señal que es homóloga a la secuencia codificante de TCR. Alternativamente, también se puede utilizar una secuencia señal que ha sido seleccionada o diseñada para la secreción y procesamiento eficaces en el anfitrión de expresión. Por ejemplo, los pares de secuencia señal/célula anfitriona adecuados incluyen la secuencia señal *sacB* de *B. subtilis* para la secreción en *B.*

20 *subtilis*, y la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pho* de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* para la secreción en *P. pastoris*. La secuencia señal se puede unir directamente a través de la secuencia que codifica el sitio de escisión de la peptidasa señal a la secuencia que codifica la proteína, o a través de un puente de nucleótidos corto que consiste normalmente en menos de diez codones, donde el puente garantiza un marco de lectura correcto de la secuencia de TCR aguas abajo.

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

30 A menudo se emplea un marcador selectivo, que puede ser parte del constructo de expresión o puede estar separado de él (p. ej., transportado por el vector de expresión), de manera que el marcador se pueda integrar en un sitio diferente del gen de interés. Los ejemplos incluyen marcadores que confieren resistencia a los antibióticos (p. ej., *bla* confiere resistencia a la ampicilina para las células anfitrionas de *E. coli*, *nptII* confiere resistencia a la 35 kanamicina a una amplia variedad de células procarióticas y eucarióticas) o que permiten que el anfitrión crezca en un medio mínimo (p. ej., *HIS4* permite que *P. pastoris* o *S. cerevisiae* *His*⁻ crezcan en ausencia de histidina). El marcador seleccionable tiene sus propias regiones reguladoras del inicio y terminación de la transcripción y de la traducción para permitir la expresión independiente del marcador. Si se emplea la resistencia a antibióticos como marcador, la concentración del antibiótico para la selección variará dependiendo del antibiótico, oscilando generalmente entre 10 y 600 µg de antibiótico/ml de medio.

40 El constructo de expresión se ensambla mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante conocidas (Sambrook et al, 1989; Ausubel et al, 1999). La digestión y ligación con enzimas de restricción son etapas básicas empleadas para unir dos fragmentos de ADN. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligación, y esto se puede conseguir rellenando los salientes, suprimiendo las porciones terminales de los 45 fragmentos con nucleasas (p. ej., *ExoIII*), mutagénesis dirigida al sitio, o mediante la adición de nuevos pares de bases por medio de PCR. Se pueden emplear polilígadores y adaptadores para facilitar la unión de los fragmentos seleccionados. El constructo de expresión se ensambla típicamente en fases que emplean rondas de restricción, ligación, y transformación de *E. coli*. Se conocen en la técnica numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción del constructo de expresión (Lambda.ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, California, PET, 50 Novagen Inc., Madison, Wis - citado en Ausubel et al, 1999) y la elección concreta no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación se verá influida por el sistema de transferencia génica seleccionado para la introducción del constructo de expresión en la célula anfitriona. Al final de cada fase, el constructo resultante se puede analizar mediante análisis de restricción, de la secuencia de ADN, de hibridación y de PCR.

55 El constructo de expresión se puede transformar en el anfitrión en forma del constructo del vector de clonación, ya sea lineal o circular, o se puede retirar del vector de clonación y utilizar tal cual o introducirlo en un vector de liberación. El vector de liberación facilita la introducción y el mantenimiento del constructo de expresión en el tipo de célula anfitriona seleccionada. El constructo de expresión se introduce en las células anfitrionas mediante cualquiera de una serie de sistemas de transferencia de genes conocidos (p. ej., competencia natural, transformación mediada químicamente, transformación de protoplastos, electroporación, transformación biológica, transfección, o

conjugación) (Ausubel et al, 1999; Sambrook et al., 1989). El sistema de transferencia génica seleccionado depende de las células anfitrionas y de los sistemas vectores utilizados.

Por ejemplo, el constructo de expresión se puede introducir en células de *S. cerevisiae* mediante transformación de protoplastos o electroporación. La electroporación de *S. cerevisiae* se lleva a cabo fácilmente, y proporciona 5 eficacias de transformación comparables a la transformación de esferoplastos.

Adicionalmente se describe un procedimiento de producción para aislar una proteína de fusión de interés. En el procedimiento, una célula anfitriona (p. ej., una célula de levadura, hongo, insecto, bacteriana o animal), en la que se ha introducido un ácido nucleico que codifica la proteína de interés conectada operativamente a una secuencia reguladora, se hace crecer a escala de producción en un medio de cultivo en presencia de la proteína de fusión para estimular la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de interés. Con posterioridad, la proteína de fusión de interés se aísla de las células anfitrionas cosechadas o del medio de cultivo. Se pueden utilizar técnicas convencionales de purificación de proteínas para aislar la proteína de interés del medio o de las células cosechadas. En particular, se pueden utilizar las técnicas de purificación para expresar y purificar una 10 proteína de fusión deseada a gran escala (esto es en cantidades como mínimo de miligramos) a partir de una variedad de implementaciones incluyendo botellas rodadoras, matraces de agitación, placas de cultivo de tejidos, biorreactores o fermentadores.

Un complejo de fusión de proteínas expresado se puede aislar y purificar mediante métodos conocidos. Típicamente 20 el medio de cultivo se centrifuga y a continuación se purifica el sobrenadante mediante cromatografía de afinidad o inmunoafinidad, p. ej., cromatografía de afinidad con Proteína A o Proteína G o un protocolo de inmunoafinidad que comprende el uso de anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de fusión expresado tal como un TCR conectado o una región de inmunoglobulina del mismo. Las proteínas de fusión solubles de la presente invención se 25 pueden separar y purificar mediante una combinación apropiada de técnicas conocidas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos que utilizan la solubilidad tales como la precipitación de sal y la precipitación en disolvente, métodos que utilizan la diferencia en el peso molecular tales como la diálsis, la ultrafiltración, la filtración en gel, y la 30 electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, métodos que utilizan una diferencia en la carga eléctrica tales como la cromatografía en columna de intercambio iónico, métodos que utilizan la afinidad específica, tales como la cromatografía de afinidad, métodos que utilizan una diferencia en el carácter hidrófobo, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa y métodos que utilizan un diferencia en el punto isoelectrónico, tales como la electroforesis con isoelectroenfoque, columnas de afinidad con metales tales como Ni-NTA. Véanse en general Sambrook et al. y Ausubel et al. más arriba para la descripción referente a estos métodos.

Se prefiere que las proteínas de fusión solubles de la presente invención sean sustancialmente puras. Esto es, las 35 proteínas de fusión han sido aisladas de los sustituyentes celulares que normalmente las acompañan, de manera que las proteínas de fusión solubles se encuentran presentes preferiblemente con una homogeneidad de al menos 80% o 90% a 95% (p/p). Las proteínas de fusión solubles que tienen una homogeneidad de al menos 98 a 99% (p/p) son las más preferidas para muchas aplicaciones farmacéuticas, clínicas y de investigación. Una vez purificada 40 sustancialmente, la proteína de fusión soluble debe estar sustancialmente libre de contaminantes para las aplicaciones terapéuticas. Una vez purificada parcialmente o hasta una pureza sustancial, las proteínas de fusión solubles pueden ser utilizadas terapéuticamente, o en la realización de análisis *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente memoria. La pureza sustancial se puede determinar mediante una variedad de técnicas convencionales tales como la cromatografía y la electroforesis en gel.

Los complejos de fusión de scTCR truncado de la invención contienen una molécula de TCR que está suficientemente truncada, de manera que el complejo de fusión de TCR puede ser secretado al medio de cultivo después de la expresión. De este modo, un complejo de fusión de TCR truncado no incluirá regiones ricas en 45 residuos hidrófobos, típicamente los dominios transmembrana y citoplásmico de la molécula de TCR. De este modo, por ejemplo, para una molécula de TCR DR1 truncada preferida de la invención, preferiblemente de aproximadamente los residuos 199 a 237 de la cadena b y de aproximadamente los residuos 193 a 230 de la cadena a de la molécula de TCR no están incluidos en el complejo de fusión de TCR truncado.

Los presentes complejos de fusión de scTCR son adecuados para su uso *in vitro* o *in vivo* con una variedad de 50 células que están infectadas o pueden ser infectadas por una o más enfermedades.

50 Métodos

Terapéuticos

Se describen los métodos para prevenir o tratar enfermedades en pacientes en los que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método administrar al paciente un complejo 55 de proteínas de fusión soluble que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad, formar un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias, y dañar o eliminar las células enfermas lo suficiente como para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

Se describen los métodos para prevenir o tratar enfermedades en pacientes en los que las células enfermas

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

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

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

Los ejemplos de las enfermedades que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, neoplasias, incluyendo cáncer, o infecciones virales. Mediante "neoplasia" se quiere significar cualquier enfermedad que es causada por o resulta de niveles inadecuadamente altos de división celular, niveles inadecuadamente bajos de apoptosis, o ambos.

Por ejemplo, el cáncer es un ejemplo de una neoplasia. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, leucemias (p. ej., leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Se considera que los trastornos linfoproliferativos también son enfermedades proliferativas.

También se incluyen métodos de estimulación de la respuesta inmunitaria en un mamífero que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión soluble como se describe en la presente memoria. También se describen métodos de supresión de respuestas inmunitarias en un mamífero que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz del complejo de proteínas de fusión soluble como se describe en la presente memoria. En el caso de la supresión inmunitaria, puede ser particularmente ventajosa un complejo de proteínas de fusión que comprende antagonistas de IL-15 o dominios IL-15 que carecen de la capacidad para unirse al complejo IL-15 β γ c.

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

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

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

10 Por consiguiente, un método de tratamiento para la inhibición de una respuesta autoinmunitaria o inflamatoria incluiría un complejo de proteínas de fusión que comprendería un receptor de células T con especificidad de unión a un antígeno asociado con la enfermedad. Se administra un complejo de TCR soluble "truncado", esto es el complejo de TCR no contiene una porción transmembrana. El complejo de proteínas de fusión también comprende una 15 variante de IL-15 que funciona como antagonista de IL-15 para suprimir la respuesta inmunitaria no deseada. Despues de la administración, el dominio TCR dirige el complejo de proteínas de fusión al sitio de la enfermedad donde el antagonista de IL-15 suprime la respuesta autoinmunitaria o inflamatoria. Semejante complejo de proteínas de fusión puede ser particularmente útil para el tratamiento de alergias, enfermedades autoinmunitarias tales como 20 esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulinodependiente y artritis reumatoide o rechazo de trasplantes. Se podrían llevar a cabo enfoques no dirigidos similares utilizando variantes de IL-15 antagonistas como proteínas no de fusión.

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

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

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

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

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

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

Diagnóstico

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

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

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

5 Los complejos de proteínas de fusión de la presente invención que comprenden polipéptidos variantes de IL-15 pueden ser particularmente útiles en estas aplicaciones. Por ejemplo, para un complejo de proteínas de fusión que comprende moléculas de TCR, las interacciones entre el dominio de la variante de IL-15 y el polipéptido de IL-15Ra generan moléculas de TCR multivalentes con aumento de la actividad de unión al antígeno, como se describe en la 10 presente memoria. Por otra parte, la variante de IL-15 contiene cambios de aminoácidos que eliminan potencialmente la unión a las células que portan los receptores IL-15R β γC, reduciendo de ese modo la unión no específica o no dirigida a células inmunitarias. Como resultado, se puede lograr una mejor detección de los 15 antígenos específicos de TCR con tales complejos de proteínas de fusión. Adicionalmente, los complejos de proteínas de fusión de la invención se pueden multimerizar además por medio de secuencias de etiquetas peptídicas o conjugación con marcas detectables, como se describe en la presente memoria.

Dosificación y administración

20 La administración de los compuestos de la invención se puede realizar mediante una variedad de rutas adecuadas, incluyendo oral, tópica (incluyendo transdérmica, bucal o sublingual), nasal y parenteral (incluyendo inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular) siendo particularmente preferidas la ruta oral o parenteral. También se apreciará que el método preferido de administración y la cantidad de dosificación pueden 25 variar con, p. ej., la afección y la edad del receptor.

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

30 Si bien uno o más compuestos de la invención se pueden administrar solos, también pueden estar presentes como parte de una composición farmacéutica mezclados con un excipiente convencional, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración parenteral, oral u otra administración deseada y que no reaccionen perjudicialmente con los compuestos activos y no sean perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones farmacéuticas en general comprenden uno o más complejos de 35 proteínas de fusión o variante de IL-15 o constructos de ADN que codifican tales compuestos junto con uno o más portadores aceptables. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silílico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetheral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con 40 agentes coadyuvantes, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos.

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

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

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

Adicionalmente se describen métodos para invocar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ser

humano, incluyendo la vacunación de un mamífero tal como un ser humano contra un agente infeccioso o un trastorno diana, tal como el cáncer.

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

Los vectores de ADN que codifican los complejos de proteínas de fusión y las variantes de IL-15 se administran adecuadamente a un mamífero incluyendo un ser humano, preferiblemente mediante inyección intramuscular. La administración de ADNc al músculo esquelético de un mamífero con la absorción subsiguiente del vector de expresión administrado por parte de las células musculares y la expresión de la proteína codificada por el ADN han sido descritas por Ulmer et al. y representan un protocolo ilustrativo [Ulmer, J.B., et al, *Science* 259:1745-1749]. La dosis óptima para una aplicación terapéutica dada se puede determinar mediante métodos convencionales.

Además del tratamiento de trastornos humanos, los complejos de proteínas de fusión y las variantes de IL-15 y los constructos de ADN que codifican tales moléculas tendrán un uso significativo para aplicaciones veterinarias, p. ej., tratamiento de trastornos del ganado tal como ganado vacuno, ovejas, etc. y animales domésticos tales como perros y gatos.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de un complejo de proteínas de fusión y variante de IL-15_dados o el constructo de ADN que los codifica utilizadas en una terapia dada variarán de acuerdo con el compuesto o compuestos activos concretos que se estén utilizando, las composiciones concretas formuladas, el modo de aplicación, el sitio concreto de administración, el peso del paciente, la salud general, el sexo, etc., la indicación concreta que esté siendo tratada, etc. y otros factores semejantes que son reconocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el médico o veterinario a cargo. La tasas de administración óptimas para un protocolo de administración dado pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica usando ensayos de determinación de dosificación convencionales realizados por ejemplo, con respecto a las directrices anteriores y los ensayos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Diseño de un complejo de proteínas de fusión que comprende las proteínas de fusión de scTCR/huIL15 y scTCR/huIL15Ra.

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

Un ejemplo de un complejo de proteínas de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla se muestra esquemáticamente en la **Figura 1A**. En este complejo de proteínas de fusión, los dominios de TCR multivalentes proporcionan una mayor avidez/afinidad de unión por sus ligandos. Los ligandos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, complejos de péptido/MHC. Los dominios IL-15/IL-15Ra proporcionan actividad inmunomoduladora. Los constructos de proteínas de fusión representativos que comprenden el complejo de proteínas de fusión se muestran esquemáticamente en la **Figura 1B**. En estos constructos el polipéptido de TCR es un TCR de cadena sencilla (264scTCR) compuesto de los dominios TCR-V α y TCR-V β -C β conectados por una secuencia conectora peptídica ((G₄S)₄). El polipéptido scTCR se fusiona a cualquiera de los dominios IL-15 o IL-15Ra, directamente o a través de una secuencia conectora peptídica. Partiendo del polipéptido scTCR hay una secuencia de péptido señal (o péptido líder) que permite la expresión soluble. El péptido señal se escinde posteriormente durante el transporte de la proteína para generar la proteína de fusión madura. En otros ejemplos del complejo de proteínas de fusión, un dominio de anticuerpo puede sustituir a un dominio de TCR representado en la **Figuras 1A y 1B**. Tal anticuerpo puede estar en un formato de cadena sencilla o heteromultimérico. Para cualquiera de los complejos de proteínas de fusión descritos anteriormente, las secuencias pueden ser humanas o no humanas, por ejemplo, pero no limitadas a ratón. Estas secuencias se pueden emplear para una parte o la totalidad de los dominios de la proteína de fusión. Además, la disposición de los dominios puede variar siempre que las proteínas de fusión sigan siendo solubles y funcionales.

Ejemplo 2 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/hull15 en un vector de expresión.

El aislamiento y la caracterización de los genes de TCR para TCR específico de p53 (aa264-272) se describieron previamente (5-7). Para obtener genes de IL15 e IL15R α humanos, se aislaron PBMC humanas de 200 ml de sangre de un donante (Núm. de Lote 2238789, Community Blood Bank, Miami, FL) con HISTOPAGUE-1077 (Sigma). Las 5 células ($1,5 \times 10^7$) se activaron por medio de 30 ng/ml de PMA (Sigma), 200 ng/ml de ionomicina, y 220 ng/ml de IL2 humana recombinante en IMDM que contenía FBS al 10% en una incubadora con CO₂ durante 10 días. Las células activadas (1×10^7 por ml) se congelaron a -70°C para aplicaciones adicionales. Para purificar el ARN total de las 10 PBMC activadas, se utilizó RNEASY PLUS MINI (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El Gen de IL15 humana que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total con el cebador directo

5'-CACCTGCCATAGCCAGCTCTTC-3'

y el cebador inverso

5'-GTCTAACAGCAGAGTGTGTTG-3'

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

20 5'-TGGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

5'-ACCGCGTTTATCAAGAACAGTGTGATGAACATTGGAC-3'

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

5'-TGGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

30 5'-ACCGCGTTTATCAAGAACAGTGTGATGAACATTGGAC-3'

mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 63°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El gen de la proteína IL15 humana madura se retiró del vector lanzadera mediante digestión con Hpal y MluI y se ligó en un vector de expresión pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con Hpal y MluI. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR contiene el fragmento génico que codifica una secuencia líder de la cadena ligera de inmunoglobulina (o señal secretora) conectada a la proteína TCR de cadena sencilla quimérica soluble específica del péptido p53 (aa264-272) (c264scTCR) (5). El vector también contiene regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción, incluyendo una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y regiones reguladoras 3' con supuestos elementos reguladores del anclaje a la matriz. El vector también contiene secuencias de ADN que permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor de SV40/gen neoR/poli-A) y bacterias (gen Ori/AMP). La clonación del fragmento de ADN que codifica la proteína IL15 humana madura en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/hull15 que comprendía la siguiente secuencia: 3'- líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/hull15), que se muestra en la Figura 2A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR/hull15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 2B** y la **Figura 2C**, respectivamente.

40 50 Ejemplo 3 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/hull15 que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión

La construcción del vector pNEF38-c264scTCR/hull15 se describió en el Ejemplo 2. Se utilizó una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en donde se sustituyeron tres residuos de cisteína por tres residuos de serina para conectar c264scTCR y hull15. La región de bisagra se mutó y se amplificó a partir del gen

264scTCR/IgG1 descrito previamente (7) con el cebador directo

5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

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

5'-TGAGTGATCGATAACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

15 mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La hulL15 se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/hulL15 descrito en el Ejemplo 2 con el cebador directo

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGGTGTGATG-3'

20 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de hulL15 de 380 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen hulL15 se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que contenía el gen mutado de la bisagra que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el inserto del gen de hulL15 se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATAACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGGTGTGATG-3'

30 mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 2 min; 70°C 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y la proteína IL15 humana madura en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-hulL15 que comprendía la secuencia siguiente: 3'

35 - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-hulL15), que se muestra en la Figura 3A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-hulL15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 3B** y **Figura 3C**, respectivamente.

40 Ejemplo 4 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/hulL15RαΔE3 en un vector de expresión.

El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15Rα humano que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total de las PBMC con el cebador directo

5'-AGTCCAGCGGTGTCCTGTGG -3'

45 y el cebador inverso

5'-TGACCGCTTAAGTGGTGTGCGCTGTGCCCTG-3'

mediante SUPERSCRIPT III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen) de acuerdo con las siguientes condiciones: para RT; 55°C, 30 min; 94°C, 2 min; para amplificar ADNc; 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35

ciclos; 72°C, 5 min. El producto de ADNc de la PCR de IL15Ra humano de 970 pb se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen del dominio extracelular de IL15Ra humano se amplificó a partir del ADNc de IL15Ra humano de 970 pb con el cebador directo

5 5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

y el cebador inverso

5'-TGACGCGTTAACGTGGTGTGCGCTGTGCCCTG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 72°C 2 min; x35 ciclos, 72°C, 10 min. El gen del dominio extracelular de IL15Ra humano se purificó en gel y se clonó en el vector lanzadera, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Vector (Invitrogen), mediante reacción TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon que contenía el inserto del gen del dominio extracelular IL15Ra humano correcto se seleccionó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN con el GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó que el gen era el gen del dominio extracelular de IL15RaΔE3 humano. El gen del dominio extracelular de IL15RaΔE3 humano se retiró del vector lanzadera mediante digestión con Hpal y Mlul y se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con Hpal y Mlul. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio extracelular de IL15RaΔE3 humano en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/huIL15Ra que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - dominio extracelular de IL15 RaΔE3. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/huIL15RaΔE3), mostrado en la **Figura 4A**, que contiene el inserto del gen del dominio extracelular de IL15RaΔE3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/huIL15RaΔE3 y de la proteína se muestran en **Figura 4B** y la **Figura 4C**, respectivamente.

Ejemplo 5 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huIL15RaSushi en un vector de expresión.

25 El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15RaSushi humano se amplificó a partir del ADNc de IL15Ra humano de 970 pb (véase el Ejemplo 3) con el cebador directo

5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

y el cebador inverso

5'-TTGTTGACCGCGTTATCTAATGCATTGAGACTGG-3'

30 mediante PfuULTRA (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 70°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de PCR del gen IL15RaSushi humano se purificó en gel y se digirió con Hpal y Mlul. El gen se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con Hpal y Mlul. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio IL15RaSushi humano en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR/huIL15Ra que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - IL15RaSushi humano. El vector resultante, mostrado en la **Figura 5A**, que contenía el inserto del gen IL15RaSushi humano correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/huIL15RaSushi y de la proteína se muestran en la **Figura 5B** y la **Figura 5C**, respectivamente.

40 Ejemplo 6 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huIL15RaSushi que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión.

La construcción del vector de pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi se describió anteriormente. Una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en la que tres residuos de cisteína se habían remplazado por tres residuos de serina se utilizó para conectar c264scTCR y huIL15RaSushi. La región de bisagra se mutó, se amplificó, se ligó, y se verificó como antes. El huIL15RaSushi se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi descrito anteriormente con el cebador directo

5'-TAATAAACCGCGTATCACGTGCCCTC-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGCTAGATTATCATCTAATGCATTG -3'

50 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de huIL15RaSushi de 250 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó a partir de la agarosa con un Kit de Extracción de Gel Qiaquick (Qiagen). El gen huIL15RaSushi se digirió con Mlul y XbaI y se ligó en pNEF38-

c264scTCR que contenía el gen de la bisagra mutado que había sido digerido con *Mlul* y *Xba*I. El clon que contenía el inserto del gen de *hull15* se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGGTGGGTTAACGAGCCAAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

5 5'-TGGTGGCTAGATTATCATCTAATGCATTTG-3'

mediante RedTag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y la proteína IL15R α Sushi humana en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR-hmt-hull15R α Sushi que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15R α Sushi humano. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-hull15R α Sushi), que se muestra en la Figura 6A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-hull15R α Sushi y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la Figura 6B y la Figura 6C, respectivamente.

Ejemplo 7 - Construcción de los genes c264scTCR/hull15RaSushi y c264scTCR/hull15 en un único vector de expresión.

20 Para lograr la expresión de dos proteínas de fusión de la invención en una única célula anfitriona, los genes que codificaban c264scTCR/hull15RaSushi y c264scTCR/hull15 se clonaron en un único vector de expresión. El gen c264scTCR/hull15RaSushi se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 5 mediante *Pfu*Ultra (Stratagene) con el cebador directo 5'-TGAGTGCCGGAACCACCATGGAGACAGACAC-3' y el cebador inverso 5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCATCTAATGCATTTGAG-3' en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min ; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/hull15RaSushi se purificó en gel, 25 se digirió con *Bsp*EI y *Not*I y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con *Bsp*EI y *Not*I. El vector de expresión pSUN34R1 contiene dos sitios de clonación de genes de interés, así como regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción que incluyen una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y un intrón y regiones 3' con elementos reguladores. Este vector también contiene secuencias de ADN que 30 permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor de SV40/gen neoR/poli-A) y bacterias (gen Ori/AMP). El vector que contiene el inserto del gen c264scTCR/IL15R α Sushi correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/hull15 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 2 mediante *Pfu*Ultra (Stratagene) con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

35 y el cebador inverso

5'-TGAGTGTCGAATTATCAAGAAGTGTTGATGAAC-3'

en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la 40 PCR del gen c264scTCR/hull15 se purificó en gel, se digirió con *Clal* y *Csp*45I y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1-c264scTCR/hull15RaSushi que había sido digerido con *Clal* y *Csp*45I. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi), mostrado en la Figura 7, que contenía el inserto del gen c264scTCR/hull15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/hull15RaSushi y c264scTCR/hull15.

Ejemplo 8 - Construcción de los genes c264scTCR/hull15Ra Δ E3 y c264scTCR/hull15 en un único vector de expresión.

45 El gen de fusión c264scTCR/hull15Ra Δ E3 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 4 mediante *Pfu*Ultra (Stratagene) con el cebador directo

5'-TGAGTGCCGGAACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCAAGTGGTGTGCGCTG-3'

50 en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/hull15Ra Δ E3 se purificó en gel, se digirió con *Bsp*EI y *Not*I y se ligó al vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con *Bsp*EI y *Not*I. El vector que contenía el inserto del gen c264scTCR/hull15Ra Δ E3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar

mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/huIL15 se amplificó y se clonó en el vector de expresión descrito en el Ejemplo 7. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaDE3), mostrado en la **Figura 8**, que contiene el inserto del gen c264scTCR/huIL15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante la secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/huIL15RaΔE3 y c264scTCR/huIL15.

Ejemplo 9 - Generación de líneas celulares anfítrionas transfectadas que producen proteínas de fusión.

Los vectores de expresión se pueden introducir en una variedad de líneas de células anfítrionas mediante varios métodos diferentes de transformación, transfección o transducción. En uno de tales métodos, se sembraron células CHO-K1 (5×10^4) en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche en una incubadora con CO_2 . Las células se transfectaron con 5 μg de vector de expresión que contenía los genes de fusión TCR/IL15 y/o TCR/IL15Ra utilizando 10 μl de reactivo Mirus TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las células se seleccionaron con 4 mg/ml de G418 (Invitrogen) un día después de la transfección. Las células resistentes a G418 se expandieron y las células que expresaban la proteína de fusión con TCR fueron enriquecidas mediante 3-5 rondas de selección de MACS como se describe a continuación. Las células se desprendieron en EDTA 10 mM y se lavaron una vez con IMDM que contenía FBS al 10%. Las células se resuspendieron (10^7 células en 100 μl) y se incubaron con 5 μg de reactivo de tetramero de p53 conjugado con R-ficoeritrina (PE) (aa264-272)/HLA-A2 durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se incubaron con cuentas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 15 min a 4°C. Las células se cargaron en una columna magnética (en un campo magnético) y las células no unidas se eliminaron con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5%).

Las células unidas a la columna se hicieron eluir con IMDM que contenía FBS al 10% después de que la columna se hubiera retirado del campo magnético. Este procedimiento permite el enriquecimiento de las células que expresan la proteína de fusión basándose en la presentación transitoria de la proteína soluble sobre la superficie celular durante el proceso de producción/secreción. La asociación en la superficie de la célula de las proteínas de fusión se controló después de cada enriquecimiento. Los niveles de proteínas de fusión unidas a la superficie celular determinados mediante citometría de flujo se compararon con los niveles de proteínas de fusión solubles presentes en el medio de cultivo celular según se determinó mediante ELISA. Un ejemplo de la comparación se muestra en la **Figura 9A** y **9B**.

En este ejemplo, células CHO-K1 transfectadas con pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi se enriquecieron por medio de MACS de una a cinco $\times 10^5$ células/100 μl de IMDM + FBS al 10%) con 0,6 μg de tetramero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 o la misma cantidad de tetramero de CMVpp65 (aa495-503) conjugado con PE/HLA-A2 durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron una vez y se analizaron para determinar los niveles de proteína de fusión soluble asociada a la superficie celular mediante citometría de flujo, como se muestra en la **Figura 9A**. El nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo celular también se determinó mediante ELISA específico de TCR con un anticuerpo de captura, anticuerpo anti-TCR C β humano (BF1), y un anticuerpo de detección, anticuerpo anti-TCR C β humano biotinilado (W4F) descrito previamente (5), como se muestra en la **Figura 9B**. Los resultados indican que el proceso de enriquecimiento basado en cuentas magnéticas produjo transfectantes que producían un aumento de los niveles de proteína de fusión soluble. Las células transfectadas enriquecidas se subclonaron a continuación tres veces mediante dilución limitante y las líneas celulares de producción se escrutaron basándose en el nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo (determinado mediante el ELISA descrito anteriormente). Las líneas celulares de producción se expandieron y se cultivaron en IMDM + FBS al 10% o medio libre de suero en condiciones (esto es, matraces, centrífugas, fermentadores, bolsas, botellas) adecuadas para generar la proteína de fusión soluble.

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

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

Ejemplo 10 - Purificación de las proteínas de fusión o complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra.

Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles de la invención se pueden purificar a partir de las células anfítrionas o los medios de cultivo celulares utilizando una variedad de métodos, incluyendo partición selectiva o solubilidad en disolventes o mediante separación (es decir, a través de cromatografía) basándose en la carga, el carácter hidrófobo, el carácter hidrófilo, el tamaño, y/o la unión selectiva o semiselectiva a un ligando. Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles se pueden generar a partir de materiales insolubles a través del uso de condiciones de plegamiento de proteínas apropiadas. En un ejemplo, la proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se purificó del medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo (BF1) que reconocía el dominio TCR-C β humano. Típicamente, una columna que contenía Sefarosa conjugada con BF1 se equilibró primero con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (tampón de carga) y después se cargó a 2

ml/min con medio de cultivo celular de pH ajustado que contenía la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. A continuación, la columna se lavó con 5 veces el volumen de la columna de tampón de carga para eliminar las proteínas no unidas, y la proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se hizo eluir con 4 veces el volumen de la columna de citrato de Na 0,5 M, pH 4. Después de la recogida, el eluato se ajustó a pH 8,0 por medio de Tris-HCl 2 M, pH 8,0. La proteína purificada se cambió de tampón a PBS y se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm. La columna BF1 se vació con glicina-HCl 50 mM, pH 3,0, y se almacenó en etanol al 20% a 4°C para su uso posterior. La proteína de fusión se pudo purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico y/o de exclusión por tamaño. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían las proteínas de fusión de c264scTCR/IL15, c264scTCR/IL15RaSushi y c264scTCR/IL15RaΔE3 se purificaron mediante los métodos anteriores y las muestras de las proteínas de fusión purificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras y seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. Los ejemplos de tales geles se muestran en la Figura 10. Las principales bandas de proteínas corresponden a los pesos moleculares correctos esperados basándose en las secuencias de las proteínas de fusión.

Ejemplo 11 - Generación de un complejo de proteínas de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra.

IL15 se une específicamente al dominio extracelular de IL15Ra con una alta afinidad (4). De este modo se puede formar un complejo de proteínas de fusión que porta los dominios de IL-15 e IL15Ra en una variedad de condiciones, incluyendo dentro de la célula de expresión o extracelularmente con proteínas de fusión no purificadas o purificadas. En un ejemplo, se pueden mezclar cantidades molares iguales de proteínas de fusión purificadas en las condiciones apropiadas (es decir, 10 min a temperatura ambiente) para formar un complejo de proteínas de fusión. La formación de complejos se puede verificar utilizando una variedad de técnicas que incluyen análisis de unión directa, análisis de unión competitiva, inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, o análisis basados en el tamaño, la actividad u otras propiedades del complejo. Por ejemplo, como se muestra en la **Figura 11**, la cromatografía de exclusión por tamaño puede verificar la formación de complejos que comprenden las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 y c264scTCR/hull15RaSushi basándose en el peso molecular. En este estudio, se cargaron aproximadamente 100 µg de c264scTCR/hull15 (0,5 mg/ml) en una columna Superdex 200 HR 10/30 para el análisis. El peso molecular calculado para c264scTCR/hull15 es de aproximadamente 57 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11A**), el peso molecular estimado es de aproximadamente 98 kD, lo que sugiere que es probable que esta proteína de fusión sea un monómero. Del mismo modo, se cargaron aproximadamente 60 µg de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15RaSushi (0,3 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/hull15RaSushi es de aproximadamente 52 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11B**), el peso molecular estimado de la proteína de fusión es de aproximadamente 81 kD, lo que sugiere de nuevo que esta proteína de fusión es un monómero. El análisis SEC anterior de otras proteínas de fusión basadas en TCR mostró diferencias similares entre el peso molecular monomérico calculado y el peso molecular estimado de la proteína de fusión glicosilada. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 y c264scTCR/hull15RaSushi se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 126 µg de las proteínas mezcladas (0,63 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil mostrado en la **Figura 11C**. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno a aproximadamente 170 kD, que es un heterodímero de las dos proteínas de fusión y otro a aproximadamente 91 kD, que es probablemente una mezcla de formas monoméricas de las proteínas de fusión. De este modo, la aparición de las especies de 170 kD en la preparación de las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de proteínas de fusión de la invención.

También se llevó a cabo análisis del complejo de proteínas de fusión que comprendía las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 y c264scTCR/hull15RaΔE3. Se cargaron aproximadamente 100 µg de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15RaΔE3 (0,5 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/hull15RaΔE3 es de aproximadamente 60 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 12A**), el peso molecular estimado de la proteína es de aproximadamente 173 kD, lo que sugiere que esta proteína existe como un homodímero. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 y c264scTCR/hull15RaΔE3 se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 118 µg de las proteínas mezcladas (0,59 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil que se muestra en la Figura 12B. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno es >210 kD, que es probablemente un tetrámero compuesto por dos heterodímeros y el otro es de aproximadamente 93 kD, que es probable que sea un monómero de c264scTCR/hull15. De este modo, la aparición de la especie de 170 kD en la preparación de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaΔE3 mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de proteínas de fusión de la invención.

Ejemplo 12 - El complejo de proteínas de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra muestra una mayor unión a los complejos de péptido/MHC.

Los complejos de proteínas de fusión generados como se ha descrito anteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban este antígeno, se cargaron células T2 HLA-A2.1 positivas con el péptido p53 (aa264-272) a 26°C durante la noche y después se almacenaron a 5 x 10⁶ células/ml en nitrógeno líquido. Las células T2 que no se incubaron con péptido sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con el péptido p53 o de control se

descongelaron y se resuspendieron en 1 ml de IMDM + FBS al 10%. Las células (5×10^5 /100 μ l) se tiñeron a continuación durante 30 min a RT con 0,5 μ g de las proteínas de fusión siguientes: c264scTCR/huIL15, c264scTCR/huIL15RaSushi, complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,1 μ g de anticuerpo anti-TCR C β humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100 μ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5 μ g de estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina en 100 μ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para el análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 13**, cada una de las proteínas de fusión fue capaz de teñir específicamente las células cargadas con péptido p53. Además, el complejo de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi presentó una mayor unión específica a través de los dominios c264scTCR multivalentes a los complejos de p53(aa264-272)/HLA-A2.1 presentados sobre las células T2. En particular, el complejo de proteínas de fusión dimérico mostró una mejor tinción de las células T2 cargadas con péptido p53 que las proteínas de fusión monoméricas c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15RaSushi. Estos datos sugieren que el complejo de proteínas de fusión multimérico proporcionará mejores propiedades de reconocimiento del antígeno que la forma monomérica de las proteínas de fusión.

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

Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi son capaces de formar un complejo a través de interacciones de los dominios de IL-15 e IL-15Ra y el complejo de proteínas de fusión multivalente tiene unión mejorada para los complejos de péptido/MHC. Tal complejo de proteínas de fusión tiene ventajas como agente de búsqueda específico de antígeno o dirigido, de diagnóstico y terapéutico basadas en la actividad de unión mejorada. La capacidad de los dominios de IL-15/IL-15Ra de la proteína de fusión para unirse a células que expresan los receptores de IL-15 también es una característica deseable como se indica en la presente memoria. Sin embargo, existen aplicaciones en las que resulta ventajoso aumentar o disminuir la capacidad de los dominios de IL-15/IL-15Ra para interactuar con y/o afectar a las respuestas de las células que expresan los receptores de IL-15. Por ejemplo, puede ser deseable reducir esta interacción en las aplicaciones (es decir, usos de búsqueda y de diagnóstico), en las que el objetivo principal es la utilización del complejo de proteínas de fusión para la detección específica de los complejos de péptido/MHC. En aplicaciones terapéuticas, también puede ser deseable que los complejos de proteínas de fusión generados contengan dominios de IL-15 capaces de aumentar o disminuir las respuestas mediadas por IL-15. Para abordar esta cuestión, se llevó a cabo el análisis mutacional para identificar los residuos de IL-15 que afectan a su unión al complejo de IL-2/15R β γ _c sin afectar a sus interacciones con IL-15Ra. Las mutaciones resultantes pueden crear variantes de IL-15 incluyendo antagonistas o agonistas. Además del uso de las proteínas de fusión de la invención, los antagonistas y agonistas de IL-15 resultantes también pueden tener utilidad como citoquinas solubles (es decir, proteínas de no fusión) o como un complejo con dominios de IL-15Ra, para aplicaciones de búsqueda, diagnóstico o terapéuticas. Por ejemplo, los antagonistas de IL-15 pueden ser útiles en la supresión de respuestas inmunitarias no deseadas, mientras que los agonistas de IL-15 se pueden utilizar para estimular respuestas inmunitarias en estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Basándose en la comparación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura de IL-15 con IL-2, se identificaron varios aminoácidos que podrían afectar potencialmente a las interacciones entre IL-15 e IL-15Ra, IL-15R β y/o γ _c. Como se muestra en la **Figura 21** y en la **Figura 14A**, se crearon variantes de IL-15, en las que los posibles sitios de unión de la proteína de IL-15 humana madura a los receptores IL-15R β γ _c, aminoácidos en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 (numeración basada en la secuencia de IL-15 humana nativa madura), fueron sustituidos cada uno o combinados con dos o más sustituciones distintas. El ácido aspártico de la posición 8 se sustituyó por alanina o aspárragina. El ácido aspártico en la posición 61 se sustituyó por alanina. La aspárragina de la posición 65 se sustituyó por alanina o ácido aspártico. La aspárragina de la posición 72 se sustituyó por arginina o ácido aspártico. La glutamina de la posición 108 se sustituyó por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Gln de la posición 108 se sustituyeron cada uno por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una aspárragina o alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una serina o arginina. Para generar mutantes de IL-15, se utilizó la PCR solapante.

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

5'-TGGTGGACGCGTAAGTGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 1

55 5'-AGATCTTCAATTTTTCAAMKHACTTATTACATTACCCAG-3'

y con el cebador directo para el fragmento 2

5'-ACTGGGTGAATGTAATAAGTDMKTTGAAAAAAATTGAAGATC-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 2

5'-TGGTGGCTAGATTATCAAGAAGTGGTGATG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de

5 Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se fusionaron entre sí mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x10 ciclos. El fragmento de ADNc de la PCR solapante se amplificó con el cebador directo

5'-TGGTGGACGCGTAACGGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso

10 5'-TGGTGGCTAGATTATCAAGAAGTGGTGATG -3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 64°C, 1,5 min; 69°C, 1,5 min; x30 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de huIL-15 mutante se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de

15 Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de huIL15 mutante se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR-hmt que había sido digerido con MluI y XbaI. El clón que contenía el gen de huIL15 de la posición 8 con una sustitución de alanina o aspárragina se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de ADN que codificaba la proteína IL-15 humana mutada en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-huIL15D8A o c264scTCR-hmt-huIL15D8N que comprendía la secuencia siguiente: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V-α - conector peptídico - 264 TCR V-β - TCR C-β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15D8A humana o -IL15D8N humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N), mostrado en la **Figura 14B**, se confirmó mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen de fusión pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 14C** y en la **Figura 14D**, respectivamente.

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

25 35 Ejemplo 14 - Caracterización funcional de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra

30 La unión funcional del dominio TCR de la proteína de fusión se demostró basándose en el ELISA y los métodos de tinción celular utilizando los reactivos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 descritos en el Ejemplo 9 y los métodos de tinción de células presentadoras de antígeno descritos en el Ejemplo 12. La capacidad de los dominios de IL15 e IL15Ra de la proteína de fusión para interaccionar se demostró como se describe en el Ejemplo 11. Adicionalmente la actividad funcional de los dominios IL15 e IL15Ra se puede evaluar a través de una variedad de métodos, incluyendo la unión a receptores IL-2/15R β γ _c o la modulación de la actividad de las células inmunitarias que portan los receptores de IL-15. En un ejemplo, las células CTLL-2, que expresan IL-15R (cadenas α β γ _c) heterotrimérico, se incubaron con 0,5 μ g de las proteínas de fusión individuales: c264scTCR/huIL15, 264scTCR/huIL15RaSushi, o complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5 μ g de tetrámero de p53 (aa 264-272) conjugado con R-ficoeritrina (PE)/HLA-A2 durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis por medio de citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 15**, la asociación de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 y el complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi a través de sus dominios huIL15 con los receptores de IL-15 sobre las células CTLL-2 se puede detectar con el tetrámero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 que reconoce el dominio c264scTCR de la proteína de fusión unida. Estos resultados indican que los dominios tanto de IL-15 como de TCR de la proteína de fusión/complejos de proteína de fusión son capaces de interactuar funcionalmente con sus ligandos cognados.

40 45 50 55 Además, las células CTLL-2 son dependientes de citoquinas para el crecimiento y pueden responder a IL-15 humana recombinante. Se desarrolló un análisis de proliferación de WST-1 basado en células utilizando células CTLL-2 para evaluar la actividad biológica frente a IL-15 de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión. WST-1 (Roche) es un reactivo que se puede convertir en formazán por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. En el análisis de WST-1, la cantidad de formazán en el medio de

cultivo medida por la cantidad de absorbancia a 440-450 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Las células CTLL-2 ($2 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) se incubaron con las concentraciones indicadas de las proteínas de fusión (0-28 ng/ml): c264scTCR/hull15, complejo de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi o complejo de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaΔE3 durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en una incubadora con CO₂. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 100 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440-450 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en **Figura 16**, la proteína de fusión de c264scTCR/hull15 puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 a una concentración tan baja como 1,8 ng/ml (~ 31,25 pM), lo que sugiere la activación de las células CTLL-2 con la proteína de fusión de c264scTCR/hull15 a través del receptor de IL15 de alta afinidad. Curiosamente, los complejos de proteínas de fusión también apoyaron proliferación de células CTLL-2, pero en un menor grado lo que sugiere que la actividad estimuladora de c264scTCR/hull15 era inhibida tras la formación del complejo con c264scTCR/hull15RaSushi o c264scTCR/hull15RaΔE3 (una vez o cuatro veces, respectivamente). Esto sugiere que la unión de c264scTCR/hull15 al receptor de IL-15 de alta afinidad es inhibida por las proteínas de fusión de c264scTCR/hull5RaSushi o c264scTCR/hull15RaΔE3. Estos resultados proporcionan evidencia de que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión pueden activar o suprimir las respuestas de las células inmunitarias en diferentes condiciones.

Se llevaron a cabo análisis similares con líneas celulares que expresaban solamente los receptores de IL-15βγ_c de afinidad intermedia, tales como las líneas celulares 32Dβ (véase más abajo). En algunos casos, es posible que la actividad biológica de IL15 en la estimulación de la proliferación de las células que portan IL-15R sea mejorada cuando ésta se encuentra en un complejo con el dominio de IL15Ra (1-3). Se evaluará la estimulación de la proliferación celular por los complejos de c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi o c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaΔE3 y puede proporcionar una evidencia adicional de que los complejos de proteína de fusión pueden estimular o activar la respuesta inmunitaria de las células inmunitarias.

Ejemplo 15 - Los complejos de proteínas de fusión diméricos de las variantes TCR/IL15RaSushi y TCR/IL15 exhiben una unión específica de TCR al complejo de péptido/MHC pero menos unión a los receptores IL-15Rβγ_c.

Los complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 descritos anteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, se cargaron células T2 positivas para HLA-A2.1 ($2 \times 10^6 \text{ mL}$) con péptido p53 (aa264-272) 20 µM a 37°C en presencia de 1 x PLE (Altor Bioscience) durante 2-3 horas. Las células T2 que no se incubaron con el péptido y las células 32Dβ que expresaban IL-2/15Rβγ_c sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con péptido p53, las células T2 de control, o las células 32Dβ ($2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) se incubaron a continuación durante 30 min a 4°C con 320 nM de los siguientes complejos de proteínas de fusión diméricos: 1) c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi, 2) c264scTCR/hull15D8A + c264scTCR/hull15RaSushi, y 3) c264scTCR/hull15D8N + c264scTCR/hull15RaSushi. Estos complejos se generaron incubando 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/hull15 purificada y 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/hull15RaSushi purificada a 4°C durante 3 horas: Despues de la tinción, las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5 µg de anticuerpo anti-TCR Cβ humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100 µl de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5 µg de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina en 100 µl de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 17A**, el complejo de c264scTCR/hull15D8A + c264scTCR/hull15RaSushi y el complejo de c264scTCR/hull15D8N + c264scTCR/hull15RaSushi exhibieron una actividad equivalente a la del complejo c264scTCR/hull15 + c264scTCR/hull15RaSushi para teñir específicamente las células T2 cargadas con péptido p53. Estos resultados indican que los dominios scTCR multivalentes son completamente funcionales en cada uno de estos complejos de fusión. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 17B** y la **Figura 17C**, los complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 mutantes mostraron una menor tinción de fondo en las células T2 de control (**Figura 17B**) y en las células 32Dβ positivas para IL-15Rβγ_c (**Figura 17C**) que el complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15 de tipología amplia. Así, estos complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 (D8A y D8N) no muestran actividad de unión a los receptores IL-15Rβγ_c presentes en las células 32Dβ. Se llevaron a cabo estudios similares de unión al receptor IL-15Rβγ_c con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los resultados indican que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de la invención que comprenden variantes de IL-15 conservan la actividad para reconocer complejos de péptido/MHC y muestran una actividad de unión menor o mayor de los receptores IL-15Rβγ_c.

Para confirmar los dominios TCR e IL-15 funcionales de las proteínas de fusión anteriores, se midió la actividad de unión del péptido/MHC e IL-15Ra mediante un análisis ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron previamente con BF1 20 nM, un anticuerpo anti-TCR Cβ, o TCR/IL15RaSushi 20 nM en tampón carbonatado de pH 9,1 (bicarbonato de sodio 35 mM, Na₂CO₃ 17,5 mM, NaCl 50 mM) durante 3 horas a 4C. Las placas se lavaron con tampón de lavado (imidazol 40 mM, NaCl 150 mM) 4 veces y se bloquearon con BSA-PBS al 1% durante 10 minutos. Se añadieron las proteínas de fusión indicadas a una concentración de 0,03 - 4 nM a las placas y se incubaron a RT durante 30 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces. Las proteínas de fusión capturadas con BF1 se incubaron con 1 µg/ml de tetrámero de p53 conjugado con HRP/HLA-A2.1 durante 45 minutos a RT y las proteínas de fusión capturadas con TCR/IL15RaSushi se incubaron con 50 ng/ml de anti-IL-15

humana biotinilada de ratón durante 30 minutos a RT. Después de lavar 4 veces, la placa incubada con anti-IL-15 humana biotinilada de ratón se incubó con 0,25 µg/ml de HRP-estreptavidina durante 15 minutos. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron con sustrato de peroxidasa ABT durante 1-10 minutos y se desarrollaron para la medición de absorbancia a 405 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 18A** y en la **Figura 18B**, las proteínas de fusión compartieron una actividad de unión específica de TCR similar para el tetramero p53/HLA-A2 y una actividad de unión a IL-15 equivalente para IL15RaSushi. Se llevaron a cabo estudios similares de la unión de IL-15Ra con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los resultados indican que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de la invención que comprenden variantes de IL-15 conservan la actividad para reconocer los complejos de péptido/MHC y los receptores IL-15Ra.

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

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas de fusión que comprenden un antagonista o agonista de IL-15 pueden ser útiles como agentes dirigidos para inhibir o estimular las respuestas mediadas por IL-15 (es decir, actividad de células T o células NK) en el sitio de la enfermedad. Para determinar la bioactividad frente a IL-15 de estas proteínas de fusión para afectar a las respuestas inmunitarias, se llevaron a cabo estudios de proliferación de celular con células CTLL-2 que expresaban IL-15R (cadenas $\alpha\beta\gamma_c$) de alta afinidad y con células 32D β que expresaban IL-15R (cadenas $\beta\gamma_c$) de afinidad intermedia. Las células ($2 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) se incubaron con 0,4-40 nM de las proteínas de fusión de TCR/IL15 descritas anteriormente durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en una incubadora con CO₂. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19A** y en la **Figura 19B**, la proteína de fusión de c264scTCR/hull15 que comprende el dominio IL-15 de tipo salvaje puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 y 32D β a una concentración tan baja como 40 pM o 1 nM, respectivamente. Curiosamente, la proteína de fusión que comprende una variante de IL15 con una sustitución de asparragina a ácido aspártico en la posición 72 con un aminoácido (c264scTCR/hull15N72D) era mucho más activa que la proteína de fusión que comprendía el dominio IL-15 de tipo salvaje al apoyar la proliferación de la línea celular 32D β , que muestra la actividad biológica a una concentración tan baja como 80 pM (**Figura 19B**). En este sentido, la proteína de fusión que comprendía la variante de IL-15 (hull15N72D) mostró una actividad superagonística. En un complejo con c264scTCR/IL15RaSushi a una razón uno a uno, c264scTCR/hull15N72D tenía una capacidad de unión similar a la de c264scTCR/hull15wt al complejo de p53/HLA-A2.1 en células T2 (**Figura 17A**), pero mostró una mayor capacidad de unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ sobre las células 32D β (**Figura 17C**). En contraste, las proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 con sustituciones de la posición 8 (c264scTCR/hull15D8N o c264scTCR/hull15D8A), en la posición 65 (c264scTCR/hull15N65A), en la posición 108 (c264scTCR/hull15Q108A), o una sustitución diferente en la posición 72 (c264scTCR/hull15N72R) fueron menos activas en el apoyo a la proliferación de las células tanto CTLL-2 como 32D β en comparación con la proteína de fusión de c264scTCR/hull15wt (**Figura 19A** y **Figura 19B**). Se llevaron a cabo estudios similares de la actividad proliferativa dependiente de IL-15 con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los datos apoyan la hipótesis de que las mutaciones en las posiciones 8, 61, 65, 72 y 108 de la proteína IL-15 pueden dar como resultado antagonistas de IL-15 con disminución de la unión a IL-15R y poca o ninguna actividad para estimular la respuesta inmunitaria. Los resultados con las sustituciones en la posición 72 son inesperados, dado que un mutante (c264scTCR/hull15N72R) actuó como antagonista de IL-15, mientras que un mutante diferente (c264scTCR/hull15N72D) mostró un aumento de la unión a IL-15R y mayor actividad en la estimulación de respuestas inmunitarias.

En una circunstancia típica, la IL-15 es trans-presentada por IL15Ra sobre la superficie de una célula dendrítica a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ sobre una célula T de memoria, NKT, o NK para apoyar la supervivencia celular y estimular las respuestas inmunitarias. Un antagonista debe bloquear la trans-presentación de IL-15 uniéndose a IL15Ra. Para evaluar si las proteínas de fusión antagonistas pueden competir con c264scTCR/hull15wt para bloquear su actividad para apoyar el crecimiento de células CTLL-2, se incubaron 4×10^4 células CTLL-2 con 0,5 nM de c264scTCR/hull15wt en presencia o ausencia de 50 nM (exceso molar de 100 veces) de diversas proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 mutante a 37°C en una incubadora con CO₂ durante 24 horas. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19C**, la capacidad de c264scTCR/hull15wt para apoyar la proliferación de células CTLL-2 fue totalmente bloqueada en presencia de 100 veces más de c264scTCR/hull15D8N, c264scTCR/hull15D8A, c264scTCR/hull15D8A/Q108A, c264scTCR/hull15Q108A, o c264scTCR/hull15D8N/N65A, y se redujo 62% en presencia de la proteína de fusión de c264scTCR/hull15N72R. Esto sugirió que estas proteínas de fusión eran los antagonistas de la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. Estos datos indican que las proteínas de fusión de c264scTCR/hull15 mutante eran antagonistas funcionales de la actividad de IL-15, como era de esperar basándose en la capacidad de estas proteínas para unirse a los receptores IL-15Ra pero no IL-15R $\beta\gamma_c$.

Se llevarán a cabo estudios similares con otras proteínas de fusión de TCR/IL15 y variantes de IL-15 descritas en la presente memoria para demostrar la actividad antagonista y agonística de IL-15. Como se resume en la Figura 21, las sustituciones en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 de IL-15 muestran la capacidad de afectar a la unión de IL-15 a IL-15R (cadenas $\beta\gamma_c$). Otras sustituciones en las posiciones 92, 101, y 111 de IL-15 también se evaluarán como

5 posibles sitios de unión para la interacción con IL-15R. Además, las combinaciones de los cambios que incluyen sustituciones en todos o varios de estos residuos pueden crear los antagonistas o agonistas de IL-15 eficaces. Incluyendo las moléculas descritas anteriormente, las variantes de IL-15 que se van a evaluar incluyen aquellas con cambios en la posición 8 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 61 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 65 a alanina, ácido aspártico, o arginina; en la posición 72 a alanina, ácido aspártico, o arginina; y en las posiciones 92, 101, 108, o 111 a alanina o serina.

Ejemplo 17 - Conjugación célula-célula y redireccionamiento de las células inmunitarias por las proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra.

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

20 Del mismo modo, se pueden llevar a cabo estudios para demostrar que los complejos de proteínas de fusión pueden tender puentes entre células inmunitarias que portan el receptor de IL-15 y células diana que portan el péptido/MHC y dirigir la citotoxicidad inmunitaria contra las células diana. Por ejemplo, las células T2 se cargarán con péptido p53 (aa264-272) o péptido CMVpp65 (aa495-503) de control y a continuación se marcarán con calceína AM. Las células 25 efectoras inmunitarias que portan receptores de IL-15 (es decir, células NK o células T activadas) se mezclarán en diferentes proporciones y se incubarán en condiciones adecuadas (es decir 37°C durante 2-4 horas) en presencia o ausencia del complejo de proteínas de fusión. La citotoxicidad se evaluará basándose en la liberación de calceína desde las células diana T2 al medio de cultivo mediante métodos convencionales. La liberación específica de calceína-AM se medirá o se comparará con el control no específico de calceína-AM liberada espontáneamente. En ausencia del complejo de proteínas de fusión o cuando las células T2 se cargaron con el péptido de control, se 30 esperaban bajos niveles de citotoxicidad para las células diana. Sin embargo, cuando las células T2 se cargan con p53 (aa264-272) y se incuban con las células efectoras inmunitarias en presencia del complejo de proteínas de fusión, la lisis específica de las células T2 sería una indicación de que las células efectoras inmunitarias son redireccionadas contra las células presentadoras del péptido p53 a través del complejo de proteínas de fusión. Se 35 llevarán a cabo estudios similares con líneas de células tumorales que presentan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 como células diana.

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

40 Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o agonistas de variantes de IL-15 tienen actividad antitumoral *in vivo*, se utilizó un modelo de tumor de xenoinjerto experimental. Se han empleado líneas de células tumorales humanas que expresan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, tales como melanoma A375, adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, carcinoma pancreático PANCI, en estudios de eficacia en animales similares utilizando otras proteínas de fusión basadas en TCR (5-7). Por ejemplo, se inyectarán células de melanoma humano A375 por vía subcutánea en el flanco de ratones carentes de sistema inmunitario y se permitirá que se establezcan los tumores durante tres días. A los ratones portadores de tumor se les inyectará por vía 45 intravenosa complejo c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi o un agonista de variante de IL-15 (intervalo de dosis - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS, diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se medirá el tamaño del tumor y se calcularán los volúmenes del tumor. Se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con el complejo de proteínas de fusión o el agonista de la variante 50 de IL-15 sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Programas de dosificación alternativos, que incluyen la dosificación en múltiples ciclos también pueden demostrar la eficacia antitumoral de la proteína de fusión o el agonista de la variante de IL-15. Las líneas de células tumorales que carecen de complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 (tales como HT-29 o AsPC-1 (5, 9)) se pueden utilizar como controles para el reconocimiento específico de antígenos por el dominio c264scTCR del complejo de proteínas de fusión. Se podrían utilizar 55 complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendían otros dominios de TCR (es decir, específicos para el péptido CMVpp65 (aa495-503) (9)) como controles de redireccionamiento no tumoral.

60 Además, se llevarán a cabo estudios de transferencia adoptiva de células en ratones portadores de tumores de xenoinjertos. Por ejemplo, se aislarán células inmunitarias que portan el receptor de IL-15, tales como esplenocitos no sometidos a tratamiento previo o activados (o de memoria), células NK o células T, de ratones y se incubarán con el complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi o una variante de IL-15 agonística en condiciones que permitan la unión a las células. En algunos casos, se utilizarán el complejo de proteínas de fusión o una variante

de IL-15 agonística para activar las células inmunitarias. Las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con los complejos de proteína de fusión se transferirán a continuación a ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores A375. Los controles incluirán la transferencia de las células inmunitarias no tratadas, el complejo de proteínas de fusión solo y PBS. El crecimiento del tumor se controlará y se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrolle tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con complejos de proteínas de fusión sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Alternativamente, la variante de IL-15 o el complejo de proteínas de fusión y las células inmunitarias se administrarán al mismo tiempo, o por separado en los mismo momentos o en momentos diferentes. Las células inmunitarias pueden ser autólogas o alogénicas en relación con el anfitrión portador de un tumor. El número de células transferidas y el programa de dosificación se variarán para evaluar y optimizar la eficacia antitumoral. Como se ha descrito anteriormente, se emplearán otras líneas tumorales o complejos de proteínas de fusión para determinar el papel del direccionamiento al antígeno en cualquier actividad antitumoral observada.

Ejemplo 19 - El tratamiento in vitro de células inmunitarias con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra seguido de transferencia adoptiva de células proporciona una mejora de la supervivencia en el modelo animal de tumor por xenoinjerto

Para demostrar la eficacia anti-tumoral de las células NK de ratón alogénicas enriquecidas preincubadas con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra sobre el crecimiento del tumor, se llevó a cabo el siguiente estudio utilizando células tumorales NSCLC A549A2 humanas en un modelo de metástasis experimental en ratones carentes de sistema inmunitario.

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

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

Con el fin de activar las células, las células NK (5×10^6) se cultivaron a 37°C durante la noche en presencia o ausencia de complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra, proteína de fusión de TCR-IL2 o rhIL-2 en matraces T25 en 10 mL de RPMI 1640 con un suplemento de FBS al 10%. El complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra y la proteína de fusión de TCR-IL2 se añadieron a una concentración de 0,8 μ g/ml y se añadió rhIL-2 a 0,2 μ g/ml. Después de incubar durante la noche, las células se recogieron y se preincubaron en 0,5 mg/ml de complejo de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra o proteína de fusión de TCR-IL2 o 0,125 mg/ml de rhIL-2 en 100 μ l sobre hielo durante 30 min. Después de lavar en PBS (1 ml), las células se resuspendieron en PBS a 10×10^6 /mL para la transferencia adoptiva.

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

Grupo	CTX		Células NK	
	Dosis (mg/kg)	Inyección (IP)	Dosis ($\times 10^6$)	Inyección (IV)
CTX	200	Días 14, 21	0	Días 16, 22
CTX + NK/rhIL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22

Grupo	CTX		Células NK	
	Dosis (mg/kg)	Inyección (IP)	Dosis (x10 ⁶)	Inyección (IV)
CTX + NK/MART-1scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/c264scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/complejo de proteínas de fusión c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22

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

5 Las supervivencias medias para los ratones en los grupos de tratamiento con CTX, CTX + NK/rhIL-2, CTX + NK/MART1scTCR-IL2, CTX + NK/c264scTCR-IL2 y complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra son de 52, 67,5, 64,5, 85,5, y 80 días, respectivamente (**Figura 20**). De este modo, la transferencia adoptiva de las células NK activadas con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra dio como resultado un tiempo más largo de supervivencia media que el observado en los animales portadores de tumor tratados con quimioterapia solo o con células NK activadas por MARTscTCR-IL2 o rhIL-2 no dirigidos. Los resultados de este experimento piloto indican que la activación y el direccionamiento de las células NK de ratón con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra pueden proporcionar una mayor actividad antitumoral.

Ejemplo 20 - Mejora de la unión de los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra a células inmunitarias que portan IL-15R como se evidencia por un tiempo de residencia prolongado en la superficie celular

15 El tiempo de residencia en la superficie celular de los complejos de proteínas de fusión sobre las células portadoras de IL-15R puede influir en la capacidad de la proteína de fusión para elegir como diana, o unir mediante puentes células efectoras con células tumorales específicas de TCR. Para investigar esto, se compararon directamente la unión de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15, los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra e IL-15 recombinante a células CTL-L2 que portan receptor IL-15Ra β YC y células CTL-L2 que portan receptores IL-15Ra β YC, células 32D β por citometría de flujo. Después de la incubación con las diversas proteínas, las células se lavaron y se incubaron en medio a 37°C durante hasta 180 min y el nivel de las proteínas que permanecían en la superficie celular se detectó con mAb anti-IL-15 marcado con PE. Las comparaciones entre la tinción inicial a tiempo cero y tiempos posteriores permitieron la determinación del tiempo de residencia de la superficie celular para cada una de las proteínas que se unían a IL-15R. El aumento del tiempo de residencia sobre la superficie celular de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15 o los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra en comparación con IL-15 sería una indicación de la actividad de unión al receptor mayor y más estable.

Ejemplo 21 - Aumento de la vida media in vivo de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15Ra en comparación con IL-15 en ratones

30 Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra, IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble en la cepa de ratón transgénico para HLA-A2.1/Kb. La presencia del dominio HLA-A2.1, para el cual está restringido c264scTCR/IL-2, puede influir en la farmacocinética de esta proteína de fusión y debe proporcionar una visión "humanizada" más relevante de la farmacocinética que otras cepas de ratón. A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa cantidades equivalentes molares de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra, IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble y se recogió la sangre en varios momentos de 5 minutos a dos semanas después de la inyección. Las concentraciones en suero de las proteínas de fusión se evaluaron utilizando formatos de ELISA, descritos anteriormente. Las concentraciones de IL-15 se detectaron con un ELISA específico de IL-15 convencional.

40 Los parámetros farmacocinéticos in vivo de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra, IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble se determinaron utilizando un soporte lógico de ajuste de curvas (p. ej., WinNonlin). Los valores de Cmax elevados, el incremento de la vida media en suero o la disminución del aclaramiento para c264scTCR/IL-15 o complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra en comparación con IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble serían una indicación de que la generación de la fusión de TCR-IL15 o del complejo de TCR/IL15:TCR/IL-15Ra proporciona una farmacocinética más favorable que la observada con IL-15 sola.

45 Ejemplo 22 - Demostración *in vivo* de los efectos inmunosupresores de antagonistas de variantes de IL-15, proteínas

de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15

Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o los antagonistas de variantes de IL-15 tienen actividad inmunosupresora *in vivo*, se utilizó un modelo de artritis autoinmunitaria experimental. Se ha demostrado que la artritis autoinmunitaria se puede inducir después de la administración de colágeno de tipo II (CII) en ratones transgénicos HLA-DR4 (Rosloniec et al. 1998. *J Immunol.* 160:2573-8). Adicionalmente, se han caracterizado las células T específicas de CII implicadas en la patología de esta enfermedad. Los genes de TCR de estas células T se utilizaron para construir vectores de expresión y las líneas celulares anfitrionas adecuados para generar CIIscTCR/IL15 que comprendían antagonistas de variantes de IL-15 y proteínas de fusión de CIIscTCR/IL15RaSushi como se ha descrito en ejemplos anteriores. Después de la inducción de la artritis mediante administración de CII, se inyectaron intravenosamente a ratones transgénicos HLA-DR4 CIIscTCR/IL15-antagonista+complejo CIIscTCR/IL15RaSushi o un antagonista de variante de IL-15 (intervalo de dosificación - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se evaluaron las articulaciones de la pata del ratón y se evaluaron para determinar el grado de inflamación en una escala de 0 a 4. Se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen artritis. La supresión de la artritis (p. ej. disminución de la incidencia o la puntuación clínica) en algunos o todos los ratones tratados con el complejo de proteínas de fusión o la variante de IL-15 sería una indicación de un efecto inmunosupresor del tratamiento. Programas de dosificación alternativos que incluyen ciclos múltiples de dosificación también pueden demostrar la eficacia inmunosupresora de la proteína de fusión o la variante de IL-15. Se podrían utilizar complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendieran otros dominios de TCR (esto es específicos para el péptido p53) como controles no dirigidos a la enfermedad para demostrar la especificidad de la capacidad de las proteínas de fusión de TCR redireccionadas para dirigir la actividad inmunosupresora al sitio de la enfermedad.

Referencias

1. Mortier, E., A. Quemener, P. Vusio, I. Lorenzen, Y. Boublik, J. Grotzinger, A. Plet, e Y. Jacques. 2006. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem* 281: 1612-1619.
2. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, y L. Lefrancois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity *in vivo*. *J Immunol* 177: 6072-6080.
3. Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh, y J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R {alpha} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9166-9171.
4. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6: 595-601.
5. Belmont, H. J., S. Price-Schiavi, B. Liu, K F. Card, H. I. Lee, K. P. Han, J. Wen, S. Tang, X. Zhu, J. Merrill, P. A. Chavillaz, J. L. Wong, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Potent antitumor activity of a tumor-specific soluble TCR/IL-2 fusion protein. *Clin Immunol* 121: 29-39.
6. Card, K. F., S. A. Price-Schiavi, B. Liu, E. Thomson, E. Nieves, H. Belmont, J. Builes, J. A. Jiao, J. Hernandez, J. Weidanz, L. Sherman, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, y H. C. Wong. 2004. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunol Immunother* 53: 345-357.
7. Mosquera, L. A., K. F. Card, S. A. Price-Schiavi, H. J. Belmont, B. Liu, J. Builes, X. Zhu, P. A. Chavaillaz, H. I. Lee, J. A. Jiao, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, R. L. Wong, y H. C. Wong. 2005. In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgGI Fusion Protein. *J Immunol* 174: 4381-4388.
8. Penichet, M. L., E. T. Harvill, y S. L. Morrison. 1997. Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 8: 106-118.
9. Zhu, X., H. J. Belmont, S. Price-Schiavi, B. Liu, H. I. Lee, M. Fernandez, R. L. Wong, J. Builes, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Visualization of p53264-272/HLA-A*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor. *J Immunol* 176: 3223-3232.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de proteínas de fusión soluble que comprende al menos dos proteínas de fusión solubles, en donde
 - la primera proteína de fusión comprende (a) un primer receptor de células T de cadena sencilla (scTCR) unido covalentemente a (b) el polipéptido de interleuquina 15 (hIL-15) o un fragmento funcional del mismo; y
 - 5 la segunda proteína de fusión comprende (c) un segundo scTCR unido covalentemente a (d) un polipéptido receptor α de interleuquina 15 soluble (IL-15Ra) o un fragmento funcional del mismo;
 - en donde el dominio IL15 de la primera proteína de fusión se une al dominio IL-15Ra soluble de la segunda proteína de fusión para formar un complejo de proteínas de fusión soluble.
- 10 2. El complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 1, en donde el primer scTCR y el segundo scTCR son idénticos, creando de ese modo un complejo de proteínas de fusión de TCR multivalente con una mayor actividad de unión.
- 15 3. El complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 1, en donde el primer scTCR es específico para el reconocimiento de un antígeno concreto.
4. El complejo de proteínas de fusión soluble de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer o segundo scTCR comprenden una cadena V-a de TCR unida covalentemente a una cadena V-b de TCR por medio de una secuencia conectora peptídica.
5. El complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 4, en donde el scTCR comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Cb de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-b de TCR.
- 20 6. El complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 4 o 5, en donde el scTCR comprende adicionalmente un fragmento de la cadena Ca de TCR soluble unido covalentemente a una cadena V-a de TCR.
- 25 7. El complejo de proteínas de fusión soluble de la reivindicación 1, en donde el polipéptido IL-15 es una variante de IL-15 que comprende al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de IL-15 nativa, por ejemplo, una o más sustituciones o delecciones de aminoácidos en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura. (SEQ ID NO: 1), tal como la sustitución de D por N o A en la posición 8, D por A en la posición 61, N por A en la posición 65, N por D en la posición 72 de la secuencia de IL-15 humana madura, N por R en la posición 72 o Q por A en la posición 108 de la secuencia de IL-15 humana madura, o cualquier combinación de estas sustituciones.
8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión o la segunda proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 30 9. Un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. El complejo de proteínas de fusión soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método para estimular o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero.
11. Un vector de ADN que comprende:
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y
 - 35 una secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

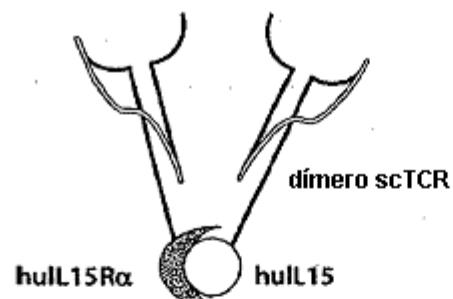


Fig. 1A

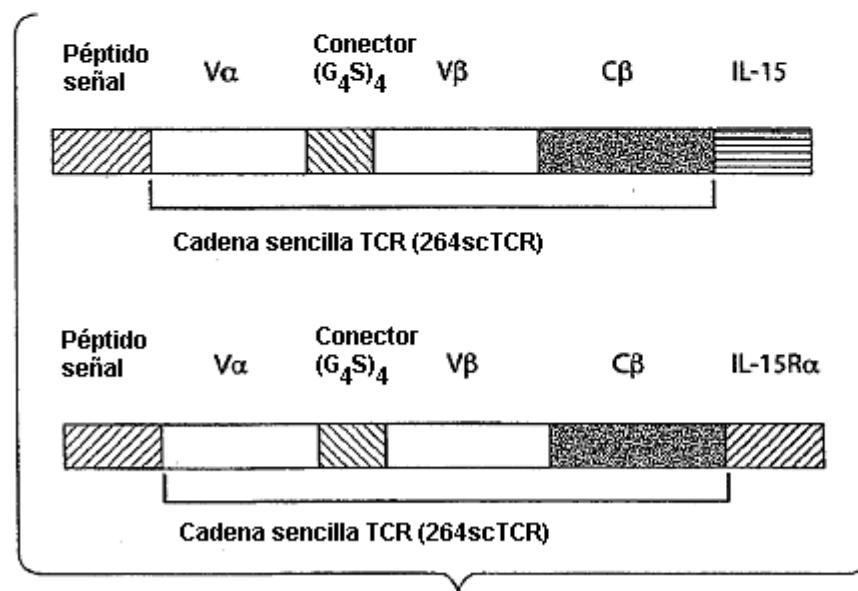


Fig. 1B

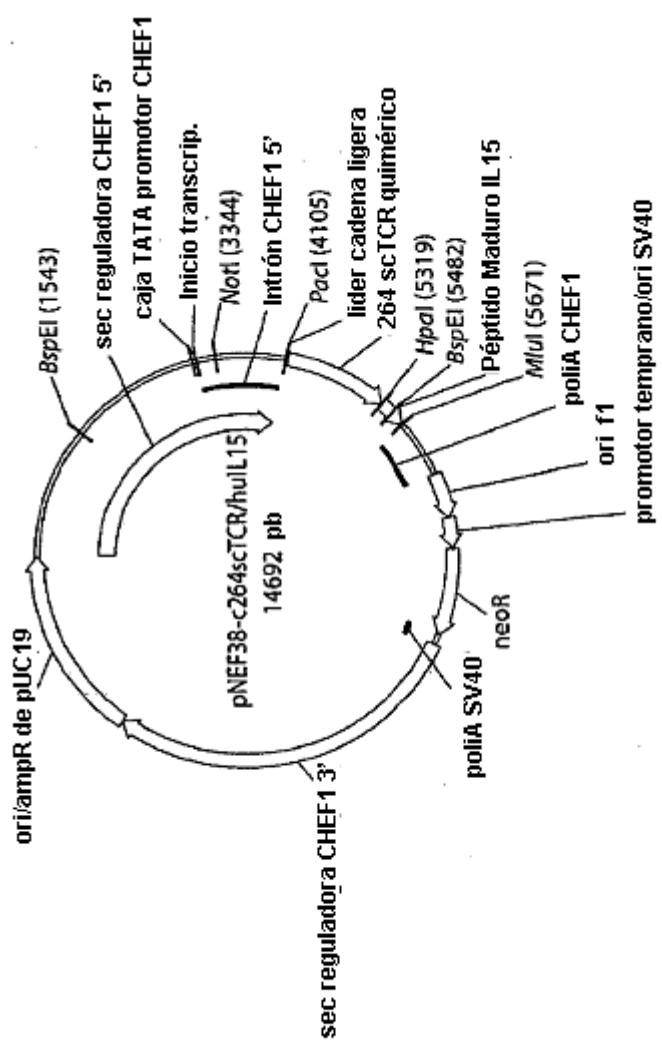


Fig. 2A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCTGGTATGGGTACTGGCTGGGTTCCACCGGTCA
 CAGTGACGGCAGCCGATGCTCGCGTCACTGTCCTGGTATGCTGGTCCAGTCAGCTGAGATGAAAGTATC
 CTACTCTGGGERCACCTTATCTGTCTGGTATGCTGGTCCAGTAACCGGGCTCCAGTCAGCTGCTCCCAAG
 TACTATICAAGGAGACCCAGTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGTGAGGTCAAGCAAGGTAACCTCT
 CCTTCACCTGGGAAAGCCTCTGGCACTGGCACTGGCAACTCTGCTGTACTCTGTTGAGCGAGGA
 TAGCAACTATCAGTGTGAACTCTGGGTCTGGGCAACAGCTAACTATAAGCCAGMCACTAGTGTGGGGT
 GGCAGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TTCAAGACTCCAGGATATCTGGTAAAGGGCAAGGACAAAAAGGAAAGGATGAGGTGATCCCTGAAAAGGG
 ACATCCAGTGTGATTCGTTCAACRATAAGACATGAGTTTAACTTTCAGAT
 CAAGAAGTTCAAGCATAAGCAGTAAAGCAGTAAAGCAGTAAAGCAGTAAAGCAGTAAAGCAGTAAAGCAG
 GCAGCCTAGBAAATTCAAGTCCCTCTGAGGGCAGGGAGCTCAGCACTGTGAACTCTGTAAGGGMCTGA
 GGGGGCACAGAGTTTCTTGGTAAGGAACCAAGACTCACAGTGTAGAGGAGCTGAACAAAGGTGT
 CCACCCGAGGTGCGCTGCGTTGAGGCCATCAGAAGGAGATCTCCACCCAAAGGCCAACACTGGGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCAAGCTGGTGGAGCTGGTGGTGGTGAATGGGAAGGGTGGCAG
 TGGGGTCAGCACGGACCCGGCAGGCCCTCAAGGGAGCCGGCAACCCCGGCAACCAACTTCCGGCTGTCAAG
 AGCCGCCCTGGGGCTCGGCCACCTCTGGCGAAGCCAGTAACTGGTGGTGAATGGTGGTGAATGGTGG
 AGGGGCTCTGGAGAATGACGAGTGGACCAAGGATGGCAAGGATGGGAAACCCGGTCAAGCTGGCGA
 GGCCTGGGGTAGAGGAGACGCTAACACTGGGTGAATGTAATAGTGAATGGTGGTGA
 ATCAATCTATGCAATATGCTACTTTATACTGGAAAGTGAATGTTCACCCAGTGCAGTAACAG
 CAATGAAGTGGCTTCTCTGGAGTCAAGTTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCA
 AGTAGAAATCTGATCATCTAGCAACACCTGCTTCAATGGGATATGTAACAGAACTCTGGGATGC
 AAAGAATGGAGGAACTGGAGGAAAGAAAGAAATTAAGAATTTGGAGGAGTTTGGAGATTTGTC
 TGTTCAACACTCTGATAA
 -3'

Fig. 2B

metdtlllwllwvpgstgqsvtqpdarvtysegaslqlrckysysgtptylfwtyqyprqglqllkkys
 < Péndido serial >< TCR Va

 gdppvvqgvngfeaeefsknsessfhirkasvhwsdssavyfcvlsedsnyqliwsgtktliikpdtsgggggg
 >< conector TCR Va

 ggsgggggggssssnskviqtprylvkqggqakmrcripekghpvyfwyqgnknnnefklinfqngevlq
 conector >< TCR V β

 qidmtekrfsaccpsnspcsleiqsseagsalsalylcasslsgggtevffgktrltvvvedlnkvppevav
 >< TCR C β

 TCR V β

 fepseaaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwngkevhscgvstdpqplkeeqpalndsryclesslrvsa
 fepseaaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwngkevhscgvstdpqplkeeqpalndsryclesslrvsa
 TCR C β

 tfwqgnqrnbhfrcgqyqfyqisendewtqdrakpvtqivsaawgradvnnvnnvisdlkkiodliqsmhida
 >< IL-15

 tlytesdvhpsckvtamkccffilelqvislesgdaesihdtvenliianusssngntesgckceeeleek
 IL-15

 nikelqsfvhivqmflnts
 IL-15 >

Fig. 2C

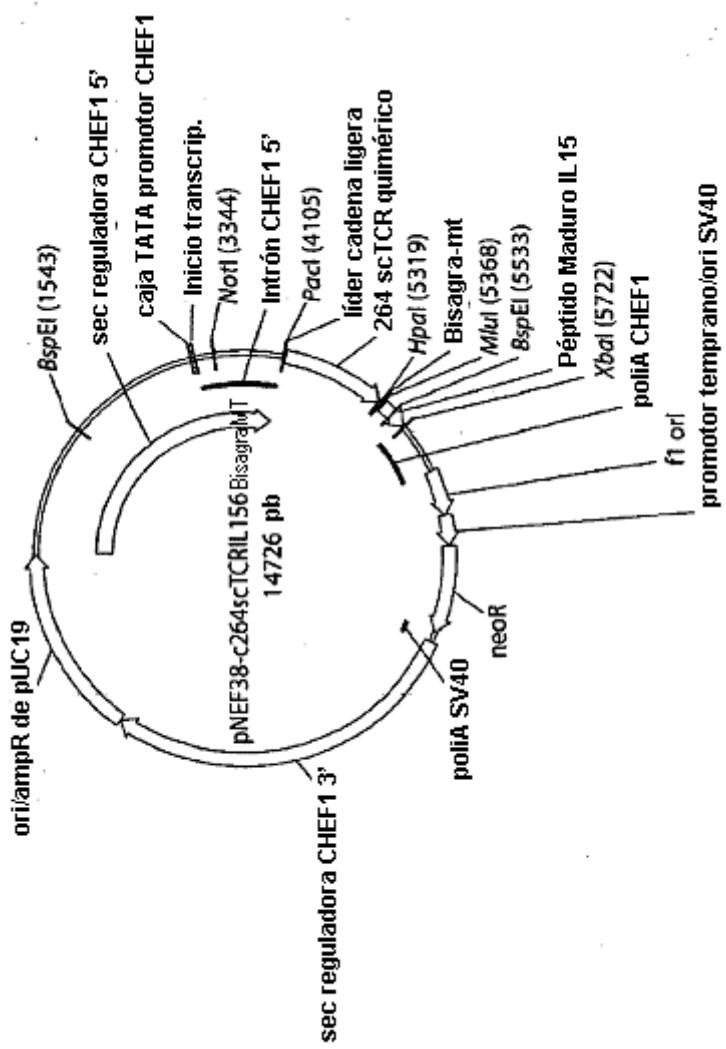


Fig. 3A

Fig. 3B

metdtlllwvlllwpgstgqsvtqpdarvttvsegasllqlrkysysgtgx1fwtrqyprqglql1likyys
 < Peptido señal >< TCR V α
 gdpvvvgvngfeaaefsksnsfsfh1rkassvhwsdsavyfcvlsedsnyqliwsgtktllkpdtsggssgg
 conector >< TCR V α >< conector
 gggggggggggssnskskviqtprylvkqgggkakmrcripekghpvvfvyqqnknnefkflinfqngcqlq
 conector >< TCR V β >< TCR V β
 qidmtekrfsaecdpsnspscsleiqsseagdsalylcasslsgggtevffgktrltvvedlinkvppevav
 TCR V β >< TCR C β
 fepseaeishtqkatlvclatgffffdhvellswwngkevhsgvstdpqplkeqpalndsryclsrrlvsa
 TCR C β >< TCR C β
 tfwqpnprnhfrcqyqfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradynepkssdkthtsppsptrnwvnyi
 TCR C β >< conector >< IL-15
 sdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvslsgdasihdtvenliiannalsnn
 IL-15
 gnvtesgckceeooleeknikkefqlqsfvhivqmfinns
 IL-15

Fig. 3C

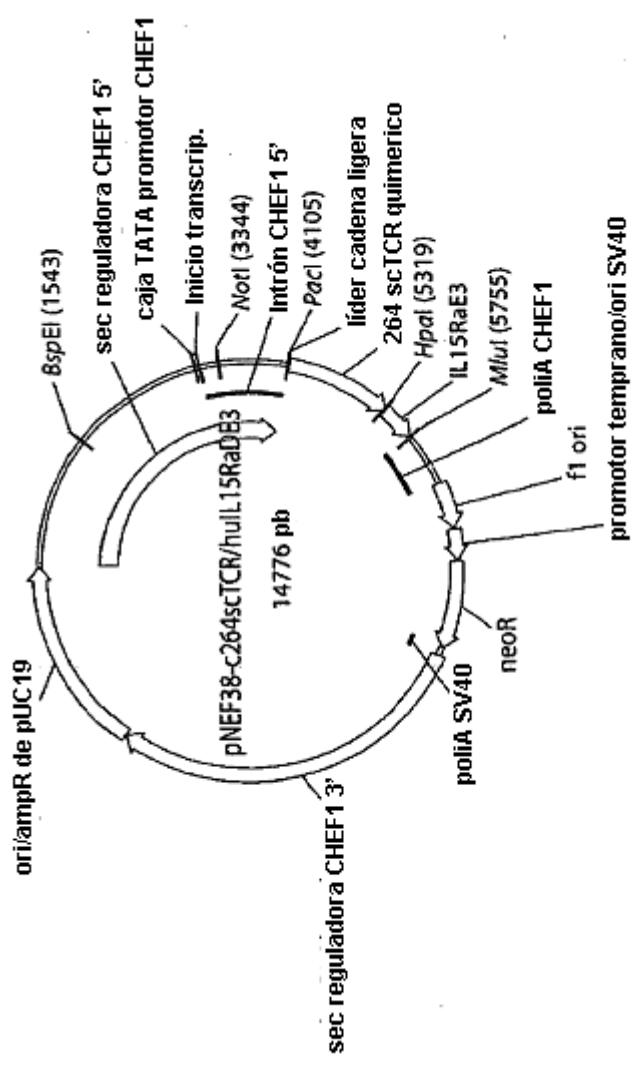


Fig. 4A

Fig. 4B

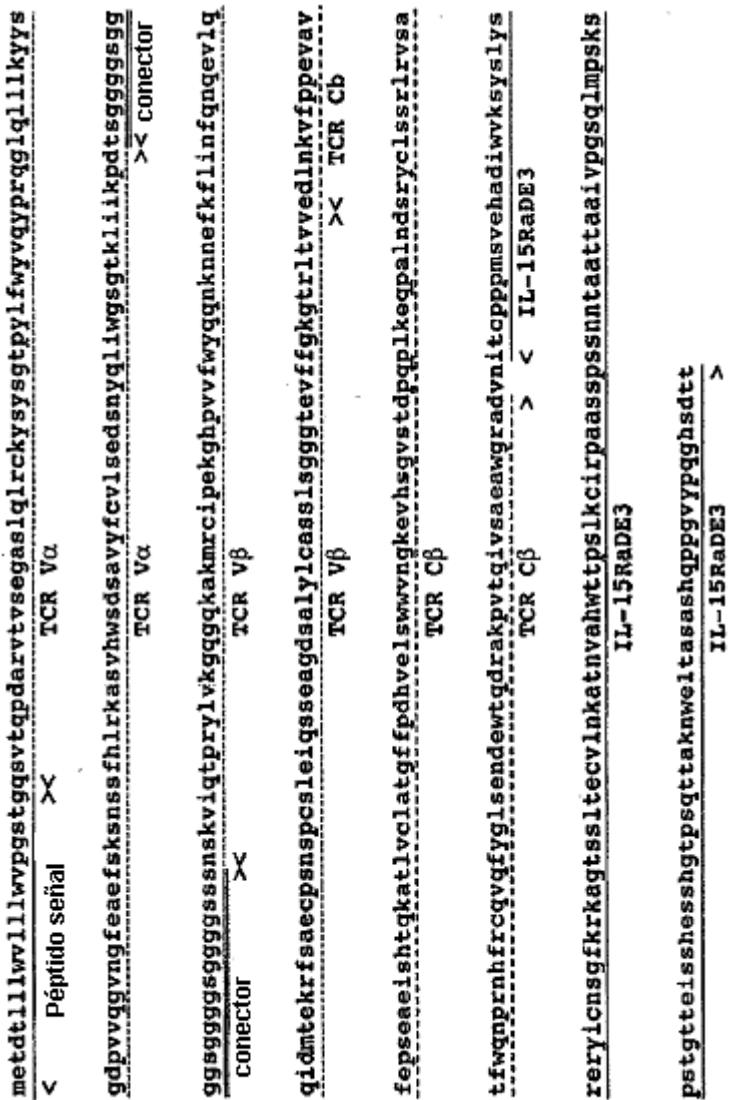


Fig. 4C

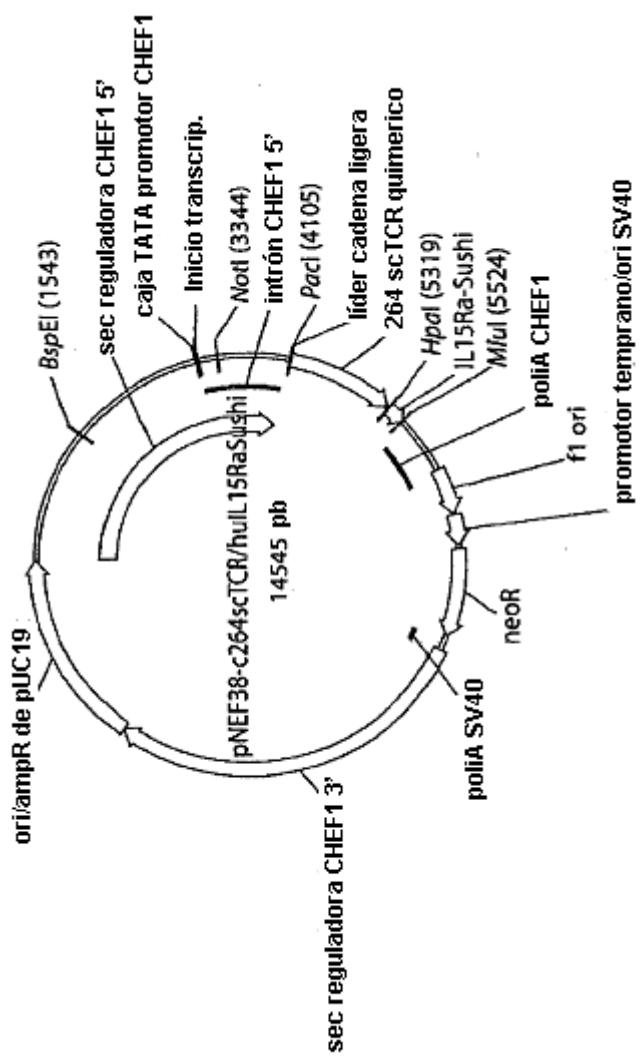


Fig. 5A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCCTGTTATGGGTACTGTGCTCTGGTCCAGGGTCCACGGGTCACT
 CAGTGACGGAGCCCCGATGCTGGCGTCACTGTCTGGTCAAGTCCAGTGCGTGAATGGCTCTGGTCAAGTGGTTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCCAGTGCGGCAAGGGCTGGAGGTCAAGTGTCTCTCAAG
 TACATTTCTGGAGACCCAGGGTCAAGGAGTCAGGTCAAGGAGTCAGGTCAAGGAGTCAGCAAGAGTAACTCTT
 CCTTCCACCTGGGAAAGCCTCTGTGCACTGGAGCAAGCAGCTGCTCTGTACTCTGTTGAGCTTGGGGGGT
 TAGCAACTATCAAGTTGATCTGGGCTCTGGGACCCAGCAAGCTAAATTAAAGCCAGACCTAGTGGTGGGGGT
 GGCAGGGGGCCTGGTTCCGGGGGGTCTGGGGGGTCAAGGACAAAGGAAAGTGGGGTCACTTCAAGAAGTCA
 TTCAGACTCCAGATATCTGGTGAAGGGCAGGGCAAAAGGAAAGTGGGGTCACTCTGGTCAAGTCACTTCAAGAT
 ACATCCAGCTGGTATTCGTGTTATCAACAAATAAGACATAGTGGTCAAGGAGTCAGCTGACCTGACCTCTGG
 CAAAGAGTTCTGCAAAATAGACATAGTGGTCAAGGAGTCAGCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTG
 GCAAGCTTAGAAATTCAAGTCTCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TTCAGACTCCAGATATCTGGTGAAGGGCAGGGCAAAAGGAAAGTGGGGTCACTCTGGTCAAGTCACTTCAAGA
 ACATCCAGCTGGTATTCGTGTTATCAACAAATAAGACATAGTGGTCAAGGAGTCAGCTGACCTGACCTCTGG
 CAAAGAGTTCTGCAAAATAGACATAGTGGTCAAGGAGTCAGCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTG
 GCAAGCTTAGAAATTCAAGTCTCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GGGGGGGCAGAGACTCAAGTTGGGAGGAGTCAGCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTG
 CCACCCGAGGGTCTGGTGTGGTGGCCATCAGAGGGAGATCTCCACACGGGAAAGTGGGAAAGGGGGGGGGGGGG
 GCCTGGGCCACAGGGTCTTCTGGTGTGGTGGCCATCAGAGGGAGATCTCCACACGGGAAAGTGGGAAAGGGGGGG
 TGGGGTCAAGGGGACCCGGAGGGGTCTGGGCAACCTCTGGGCAACCTCTGGGCAACCTCTGGGCAACCTCTGG
 AGGGGGCTCTGGGAAAGTGGGAGTGGGACCTAGGGGAAAGTGGGAGTGGGACCTAGGGGAAAGTGGGAGTGGG
 GGGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GTCAAGAGGCTACAGCTGGTGTACTCCAGGGAGGCGGTACATTGTGAACTCTGGGAAACGGGAACTGGGCA
 CGTCAGGCCTACAGCTGGTGTACTCCAGGGAGGCGGTACATTGTGAACTCTGGGAAACGGGAACTGGGCA
 ATGCAATTAGA-3'

Fig. 5B

metdtlllwvlllwvpgstqsvtqpdarvtvsegasllqlrckysysqtpylfwvqyprqqlql11kyy
 < Péptido señal >< TCR V α
 gdpvvqvgngfeaeefskenssffhrkasvhwsdssavvfcvlsedsnyqliwsgtkliikpdtsgggsg
 connector >< connector
 TCR V α
 gggggggggggssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssss
 connector >< connector
 TCR V β
 qidmtekrfssecpsnsposleiqsseagdsalycassssssssssssssssssssssssssssss
 TCR V β >< TCR C β
 fepseaeishtqkatlvclatgfffdhvelswwngkevhsgvstdpqqplkeqpalndsryc
 TCR C β
 ffwqnprnhfrccqvfyyglisendewtqdrakptqivsaewgradvnitc
 TCR C β >< IL-15RaSushi
 Reryicnsgffkrkagtsseiltecvlnkntnvahtwahwttpslkcir
 IL-15RaSushi
 >

Fig. 5C

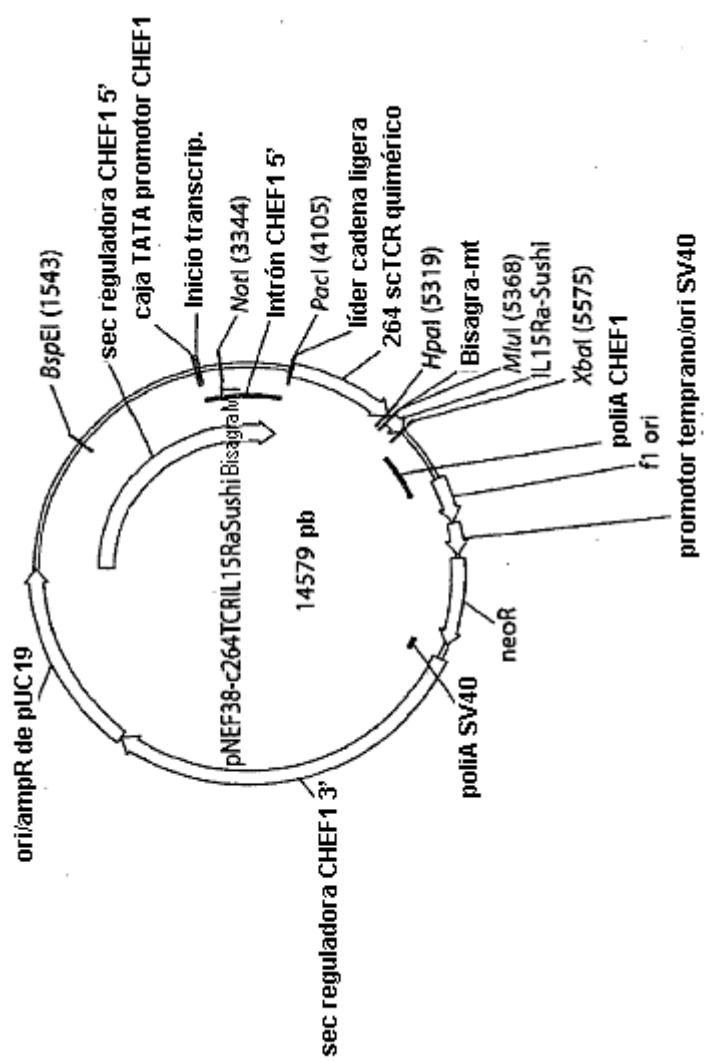


Fig. 6A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGTGCTCTGGTCCAGGTTCCACCGGTCA
 CAGTGACGCCGGCATGGCTGGTCACTGTCTCTGAGGGAGCCTCTGGTATGCTGAGATGTCAGTATTC
 CTACTCTGGACACCTTATCCTGTTCAAGGGTCAAGGAGTGAATGGCTCAGCTGCTCTCTCAG
 TACTATTCAGGAGACCCAGTGGTCAAGGGTCAAGGAGTGAATGGCTCAGCTGCTCTCTCAG
 CCTTTCACCTCCGGAAAGCCCTGCTGCTGCACTGGGCTGAGGCTGACTTCTGTTGAGGAGA
 TAGCAACTACAGTTGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTTAATTATAAGCCAGACACTAGTGGTGGGG
 GGCAGGGGGGGTGGGGTCCGGTGGGGGGTCTGGGGGGGGTCTGGGGGGGGTCTGGGGGGGG
 TTCAAGACTCAAGRTATCTGGTGAAGGCAAGGCAAAAGCAAGGAAAGGAAAGGAAAGG
 ACATCCAGTGTATTCGGTATCAACATAGAACATAGGTTTAAATTGATTAACCTTCAGAAT
 CAGAAGCTCTCAGGAAATAGACATGACTGAAAGGATCTCTGCTGAGGTCTCTCAACTCACCT
 GCAGCCTGAAATTAGTCCTCTGAGGGAGACTCAGCTGAACTCTGTCAGGAGCTGTCAGG
 GGGGGGCAGAGAGTGGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
 CCACCCGAGGTCTGGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCAACACCCCAACACTGGGT
 GGCCTGGCCACAGGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
 TGGGGTCAAGCACGGGACCCGCAGCCCCCTCAAGGAGCAAGCCCTGAGCTTCAAGTACTGCC
 AGCCGGCTGAGGGTCTGGCCACCCMTCGGCAACCAACTCCGGTCAAGTCCAGTCTGCTG
 AGGGGCTCTGGGAGAATGAGGAGCTGGGACCACTGGTCAAGGAGTAACTCTCTGACA
 GGCCTGGGGTAGGGAGGAGCTAACGGGCAACACTCACACATCTCCACCGTCTCA
 ACGCGTATACTACGGCTCCCTCCCCATGTCGGTGAACACGGAGACATCTGGTCAAGAGCTACAGCTGT
 ACTCCAGGGGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGGGTAAGCCGGCACGTCAGGCTGACGGAGT
 CTGGTGAACAAAGGGCACGAAATGTCGGCCACTGGACAAATGCTCAATTAGATGATAA -3'

Fig. 6B

metdtlllwvlllwvpgstqsvtqpdarvtvsegasllqlrckysqsgtpylftrvqyprqrglqlkkys
 < Péptido señal > TCR V α
 gdpvvgvngfeafsknsffhrkasvhwsdavycfcvlsedsnyqliwsgsgtkliikpdtsgggsg
 < connector > TCR V α
 connector < connector > TCR V β
 gggggggggssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssssss
 qidmtekrfsaepnspcsleiqssseagsdsalyccasslsgggtevfgkgrllyvedlnkvppeav
 < TCR V β > TCR C β
 fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvselswrrngkevhsgsvstdppqplkeqqpalndsrclssrlrvsa
 TCR C β
 tfwqnpnprnhfrccqyqfyglsendewtqdrakptqivsaawgradvnepkssdkthtsppsptritcffff
 < connector > < connector > < connector >
 msvehadiwvksyslysrservicnsgfkrkagttssltcvlnktnvahwtpsllkcir
 IL-15Rasushi

Fig. 6C

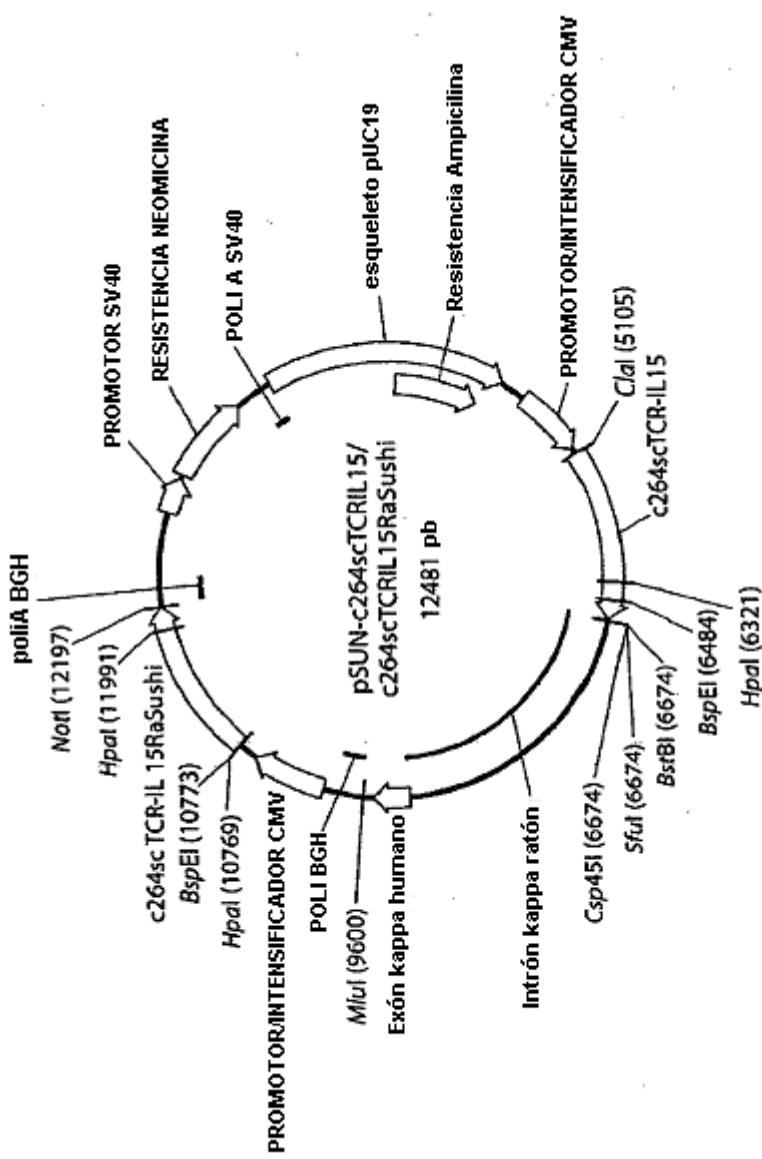


Fig. 7

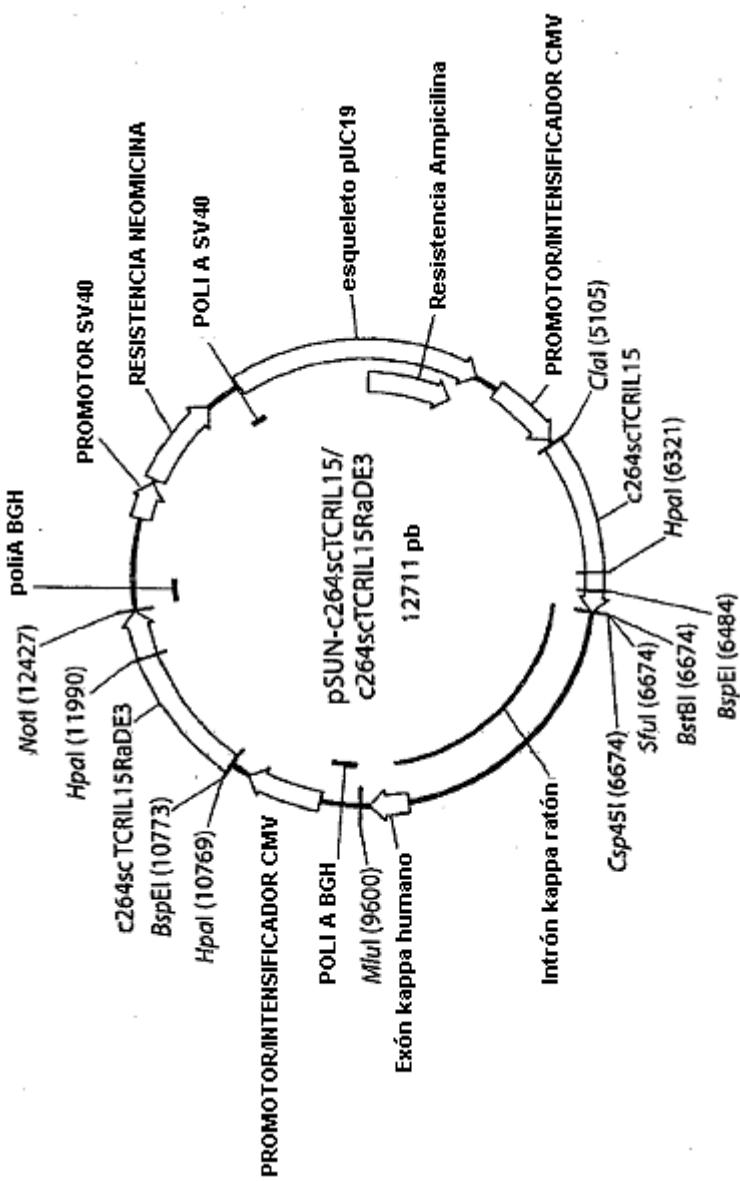


Fig. 8

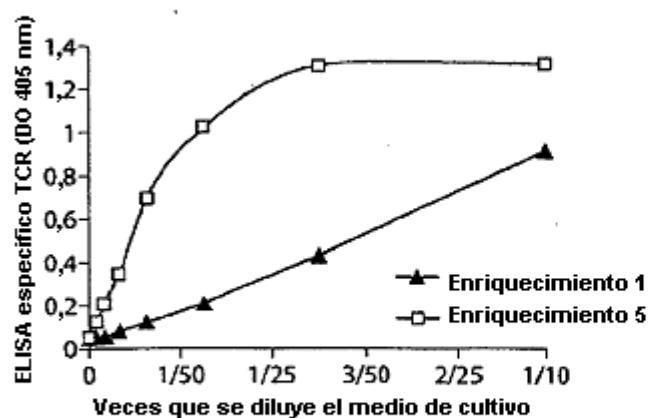
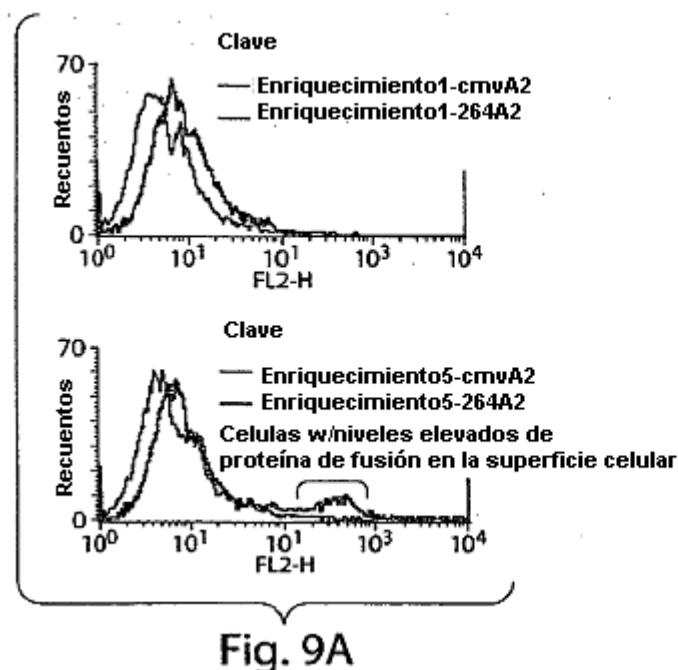


Fig. 9B

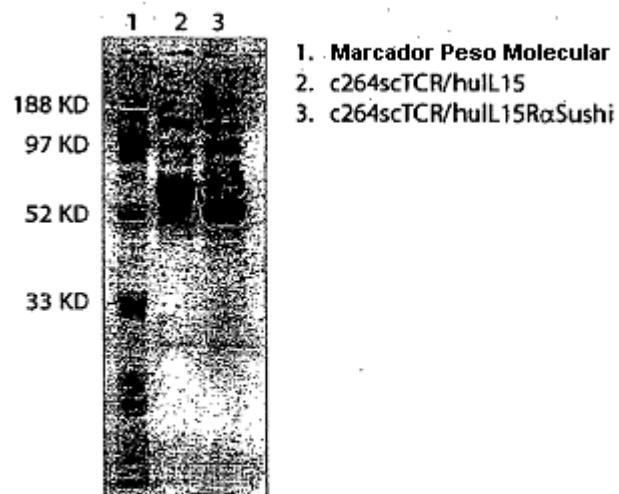


Fig. 10A

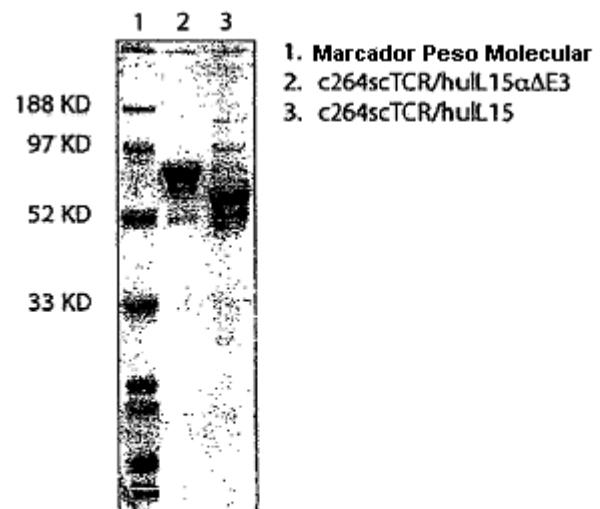


Fig. 10B

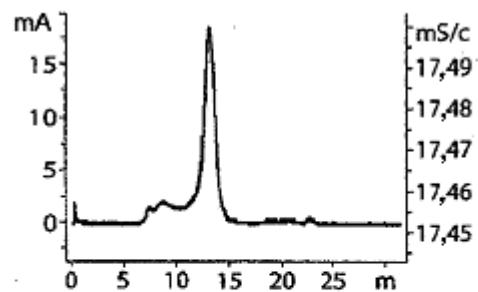


Fig. 11A

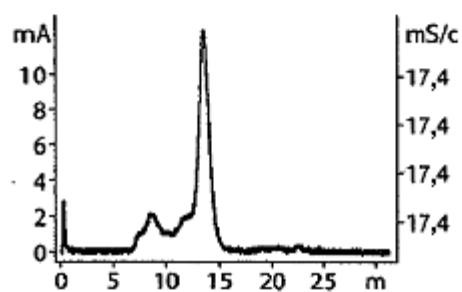


Fig. 11B

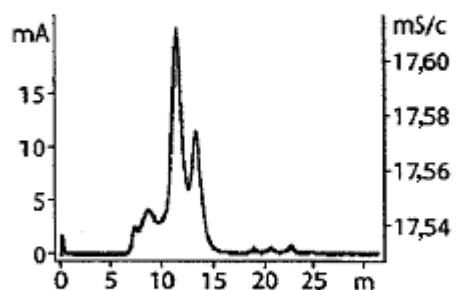


Fig. 11C

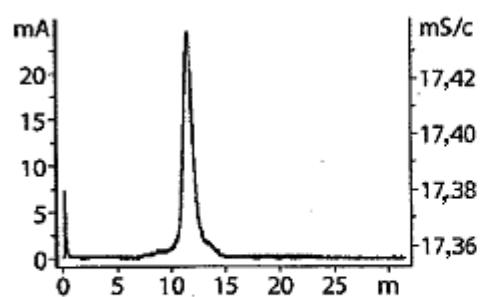


Fig. 12A

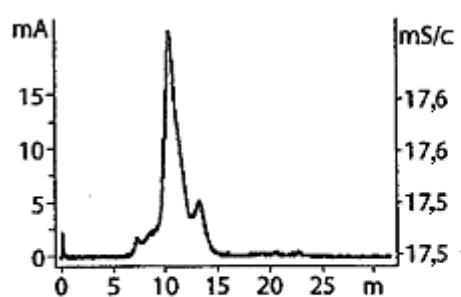


Fig. 12B

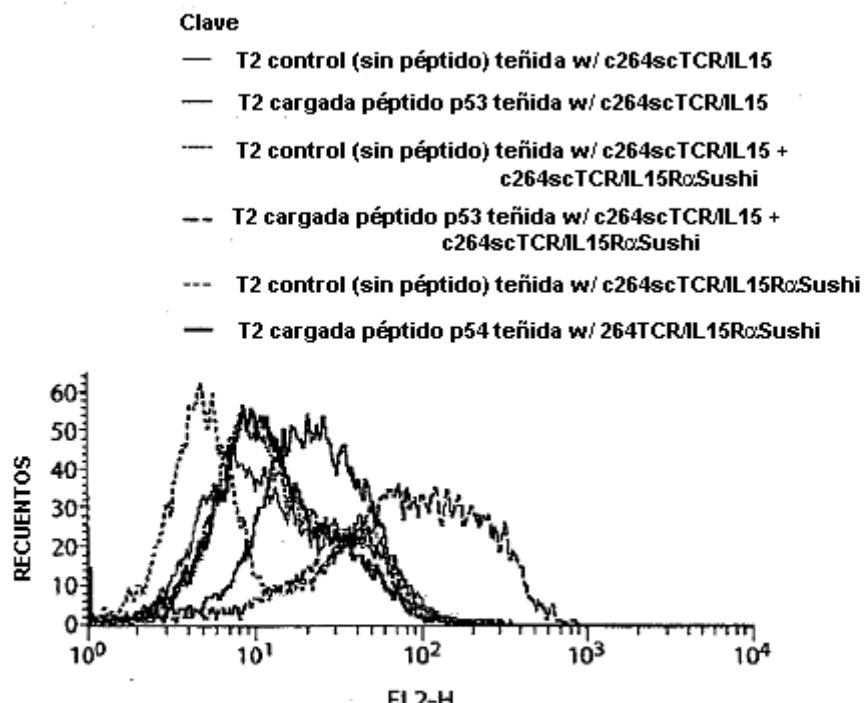


Fig. 13

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI
HDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Fig. 14A

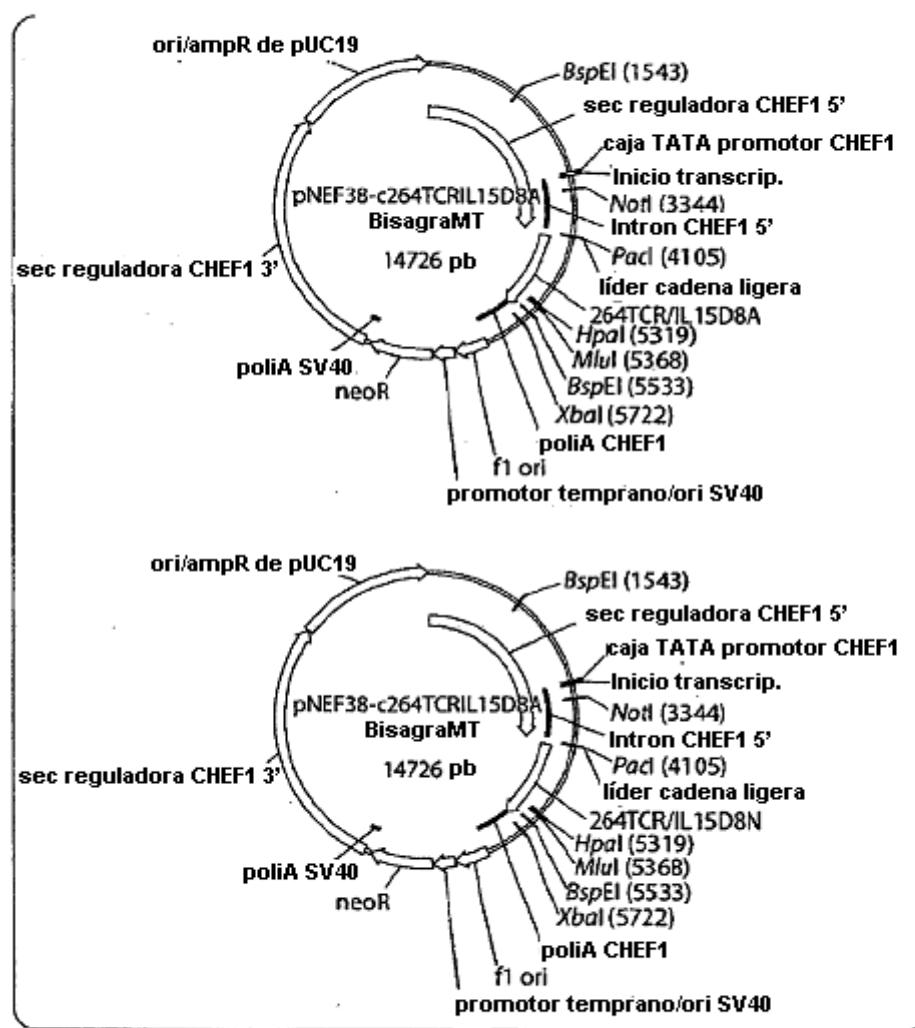


Fig. 14B

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAAGTCAGTGACGCGAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTGAAGGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCCTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCAGTACCCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAGTACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTCAGCAAGAGTAACCTCTCCCTCCACCTGCAGGAAAGCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTGACTCTGTGTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGTTGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGGGGGTGGTCCGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGCGGTTCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAAGACTCCAAGATACTGGTGAAAGGCCAAGGACAAAAGCAAAAGATGAGGTGATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACATGAGTTAAATTGGTATTAACCTTCAAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAACGATTCTCTGCTGAGGTGTCCTCAAAACTCACCTTGAGCCTAGAAATTCAAGTCCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGCTGTCAAGGGGGCGGCACAAGAGTTCTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGGACCTGAACAAAGTGTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAACAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCCTGGCACAGGCTTCTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTCAGCACGGGACCCGCAGCCCCCTCAAGGAGCAGCCGCCACCTCTGGCAGAACCCCCGCACACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGTCTCGGAGAAATGACGAGTGGACCCAGGATAAGGCCAAACCCGTCAACAGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCAAATCTCTGACAAAACACTCACACATCTCCACCGTCTCCAACCGCTAAGTGGGTGAAATGTAATAAGTGCTTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCAACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCGGAGATGCAAGTATTGATGATAACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACACAGTTGCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAAATATTAAGAAATTTGAGGTGGTACATATTGTCAAATGTTCATCACACTTCTGATAA - 3'

Fig. 14C-1

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8N

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTGGGTTCA
 CAGGTTCCACCGGTCAAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC
 TGAAGGAGCCTCTCTGCAAGCTGAGATGCAAGTATTCTACTCTGGACACCT
 TATCTGTTCTGGTATGTCAGTACCCGGCAGGGCTGCGAGCTGCTCCCTCA
 AGTACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTCAAGGAGTGAATGGCTCGAGGCTGA
 GTTCAGCAAGAGTAACTCTCCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
 AGCGACTCTGCTGTACTTCTGTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
 TGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAGCCAGACACTAGGGTGG
 CGGTGGCAGCGGCGGTGGTCCGGTGGCGGCGTTCTGGCGTGGCGGT
 TCCCTGAGCAATTCAAAAGTCATTCAAGACTCCAAGATATCTGGTAAAGGGC
 AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGATCCCTGAAAGGGACATCCAGTTG
 ATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAAATGAGTTAAATTGGTATTAACCTT
 CAGAACATCAAGAAGTTCTCAGCAAATAGACATGACTGAAAACGATTCTG
 CTGAGTGCTTCAAAACTCACCTGCAAGCCTAGAAATTCACTGCTCTGAGGC
 AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGCCCCAGCAGTCTGTCAGGGGGCGGCACA
 GAAGTTTCTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGAGGGACCTGAACA
 AGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTC
 CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGCCACAGGCTTCTCCCTGAC
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTCA
 GCACGGACCCGCAAGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATA
 CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGCTCGGCCACCTCTGGCAGAACCCCCGC
 AACCACTTCCGCTGTCAGTCCAGTTCTACGGGCTCTGGAGAATGACGAGT
 GGACCCAGGATAGGGCAAACCCGTCAACCGAGATCGTCAGCGCGAGGCCTG
 GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCAAATCTCTGACAAAACACACATCT
 CCACCGTCTCCAACCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTAATTGAAAAAAA
 TTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG
 TGATGTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCCTTCTCTGGAG
 TTACAAGTTATTCACTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTGATGATACAGTAG
 AAAATCTGATCATCCTAGCAAAACACAGTTGCTTCTAATGGGAATGTAAC
 AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAAATTTAAAGAA
 TTTTGCAAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTTCATCAACACTTCTGAT
 AA -3'

Fig. 14C-2

Proteína c264scTCR-hmt-IL15D8A

metdtlllwvlllwpgsttqsvtdarvtvsegasltqlrlckysysgtptylfwryqyprggqqlkkyy
 < Peptido señal >< TCR Va

gdppvvggvngfieaefsksnsffhrlkasvhwsdssavyfcvlsedsnyqliwsgtktliikpdtsggggg
 >< conector TCR Va

ggggggggggggssnskvigtprylvkqgggkakmrcipekghpvrwqgnknnnefkflinfgqnqevlq
 conector >< TCR V β

qidmtekrfsaecpsnsppcsleiqsseagqdsalylcasslqggtevffqkqtrltvvedlnkvfppevay
 TCR V β >< TCR C β

fepseaeihtqkatlvclatgfffpdhvewngkeyhsqvsdpqplkeqpalndsryclessrlrvsa
 TCR C β

tfwgnpnrhfrcqvgfyglsendewtqdrakpvtqivsaaewgradvnepkssdkthtsppsptrnwvnvi
 TCR C β > < conector > <

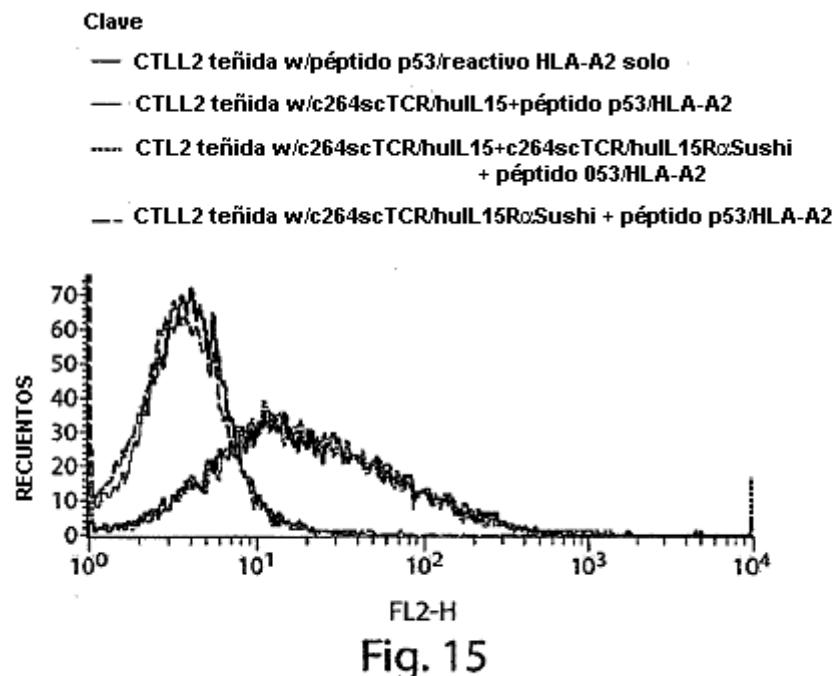
sAlkkiedliqsmhidaatlytesdvhpsckvtamkcfillelqvvislesgdasihdtnenliannsllsn
 * IL-15 D8A

gnvtesgckceeeleeknikeflqsfvhivqmfints
 IL-15 D8A >

Fig. 14D-1

Proteína c264sc TCR-hmt-IL15D8N
 metdtlllwvllwypgstgqsvtqpdarvttvsegaslg1rckyssgtptylfwyvqyprqglqlkkys
 gdpvvgvngfeaeefksnsfsflrkasvhwsdsavyfcvlsedsnyqliwsgtktliikpdtsgggggg
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR V α TCR V α TCR V α TCR V α
 ggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR V β TCR V β TCR V β TCR V β
 qidmtekrfsaecpsnspcsleqssseagsdalsalyccasslsgggtevffqkgtrltvvedlnkvppeav
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR C β TCR C β TCR C β TCR C β
 fepsseaeishtqkatlvclatggffpdhvewwwngkevhsgqvstdppplkeqpalndsrvcclssrlrvsa
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR C β TCR C β TCR C β TCR C β
 fwqnpnrhfrcqvgfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgradvnepkssdkthtsppsptrnwvni
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR C β TCR C β TCR C β TCR C β
 sNlkiedliqsmnidatlytesdvhpsckvtamkcfllelgvislesgdasihdtvenliilannsllsn
 connector < Peptido serial > < connector > < connector > < connector >
 TCR C β TCR C β TCR C β TCR C β
 IL-15 D8N

Fig. 14D-2



Analisis de Proliferacion de Células CTLL-2 de Actividad IL15

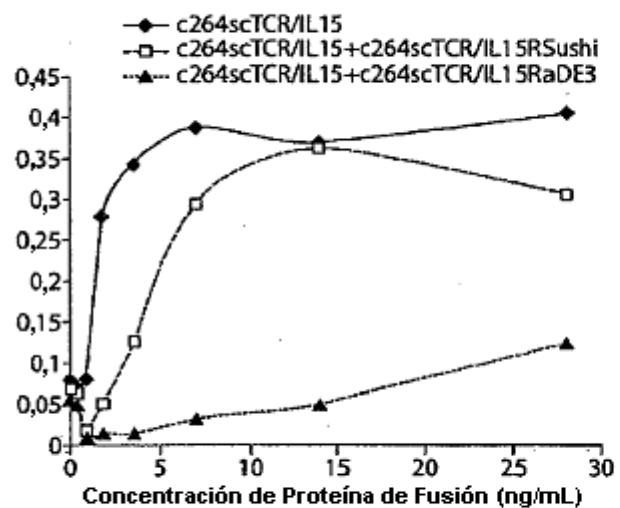


Fig. 16

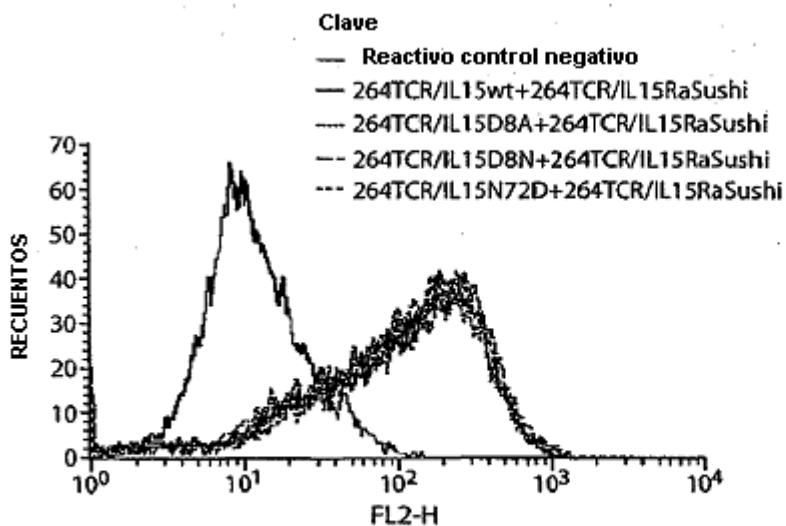


Fig. 17A

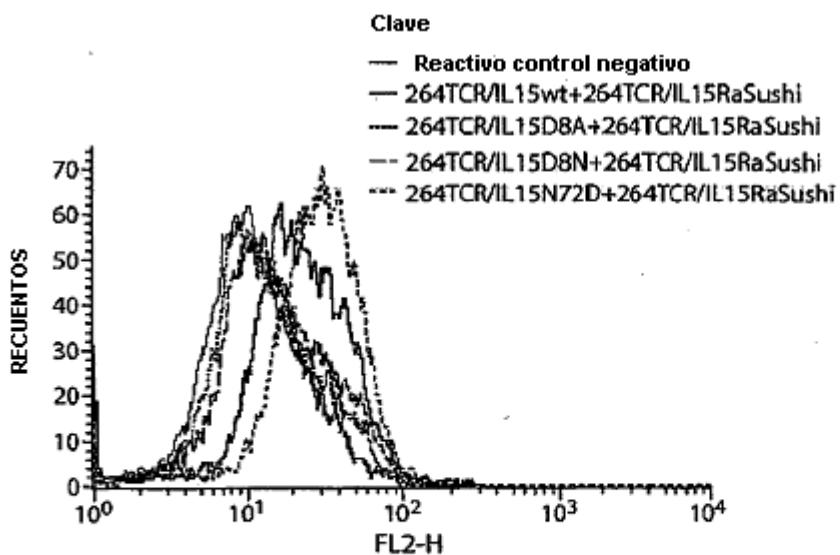
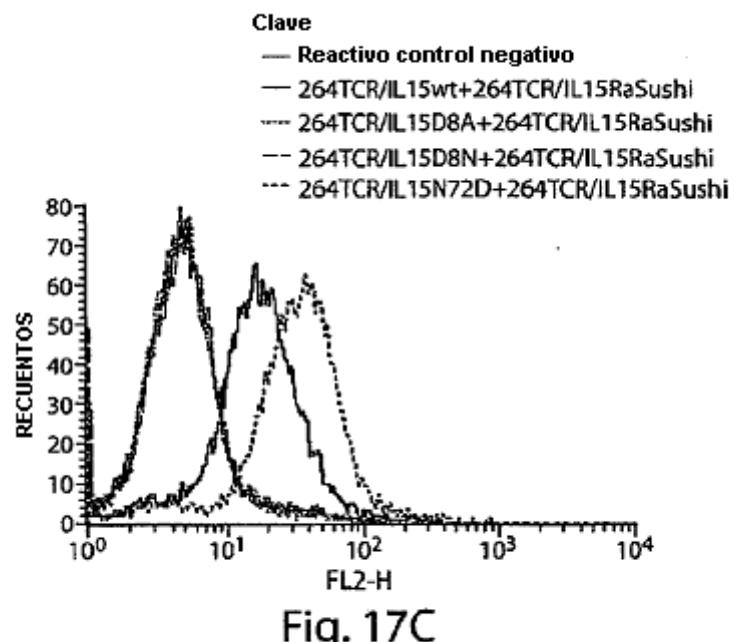


Fig. 17B



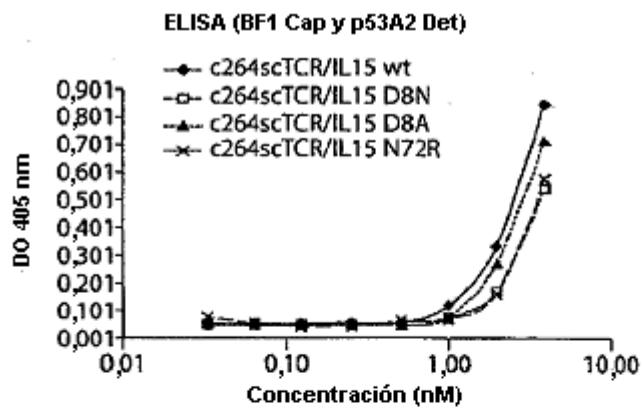


Fig. 18A

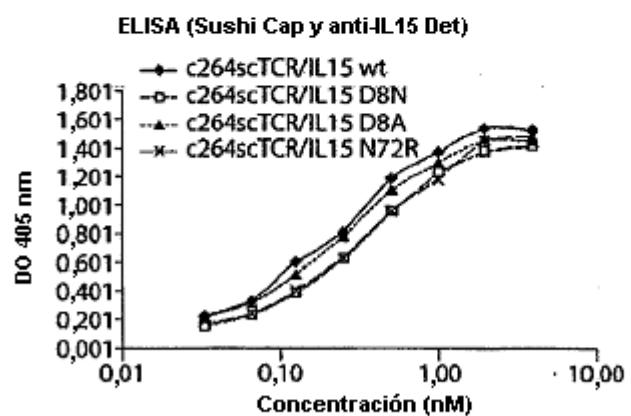


Fig. 18B

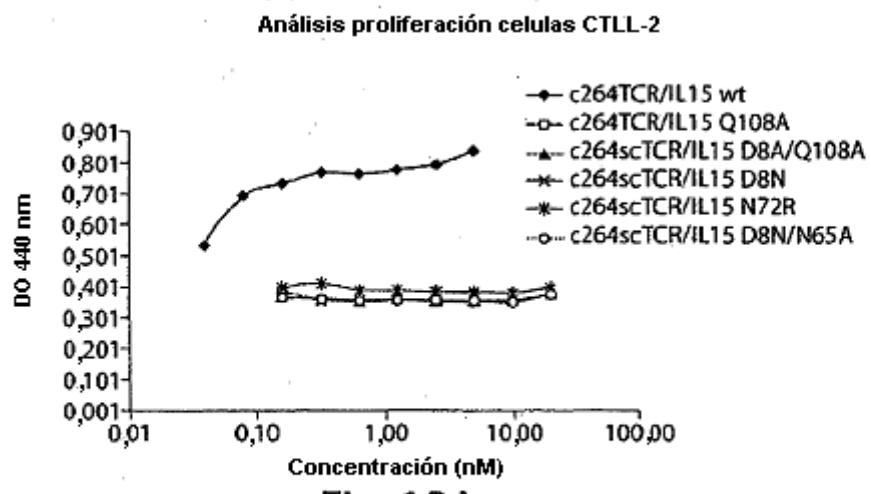


Fig. 19A

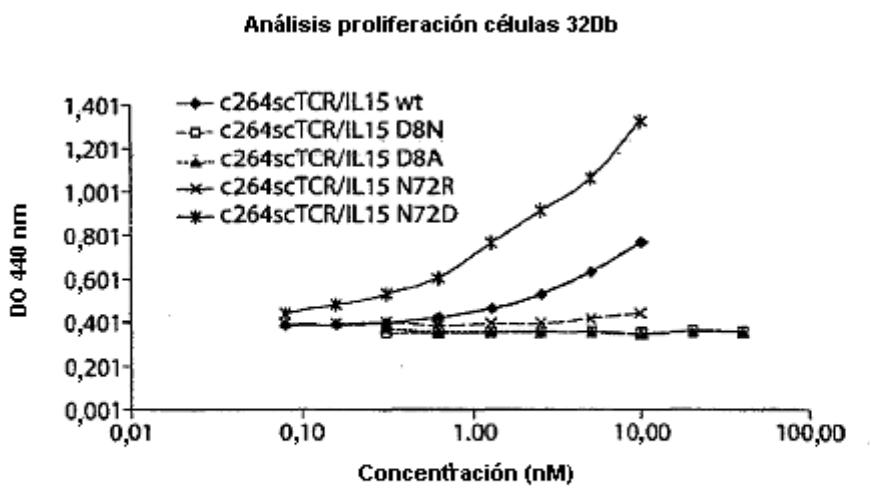


Fig. 19B

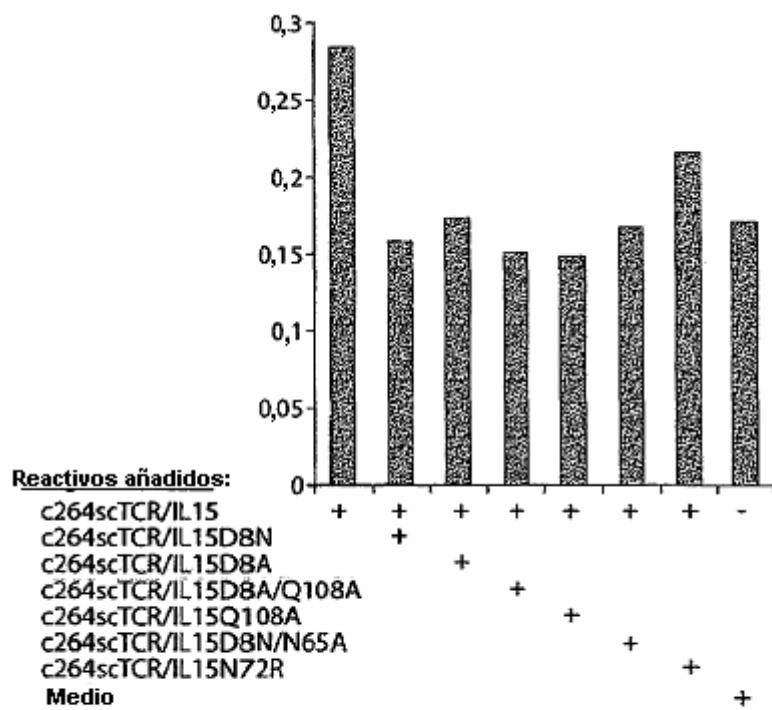


Fig. 19C

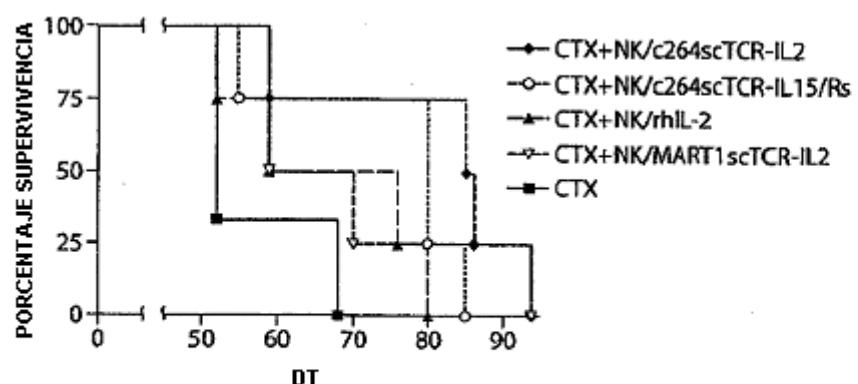


Fig. 20

Tabla 1

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

Fig. 21

NWVNVIISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLIIILANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMPINTS

Fig. 22A

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAT
ATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATG
AAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTGAT
GATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAAACAGTTGTCTTCTAATGGGAATGTA
ACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACCTGGAGGGAAAAAAATTAAAGAATTTTG
CAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGA

Fig. 22B