

Célula CHO que expresa heterodímeros IL-15

CAMPO

[0001] La presente descripción se refiere a un complejo polipeptídico que comprende un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) humana y un polipéptido del receptor alfa de interleucina 15 humana (IL-15R α) que tiene un perfil de glicosilación único, y métodos para producir dicho polipéptido.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 27 de enero de 2021, se denomina PAT058680-WO-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 37.833 bytes.

ANTECEDENTES

[0003] La citocina, interleucina-15 (IL-15), es un miembro de la familia de linfocinas de cuatro haces de hélice alfa producidas por muchas células del cuerpo. La IL-15 juega un papel fundamental en la modulación de la actividad del sistema inmunológico innato y adaptativo, por ejemplo, el mantenimiento de la respuesta de las células T de memoria a los patógenos invasores, la inhibición de la apoptosis, la activación de las células dendríticas y la inducción de la proliferación celular de Natural Killer (NK) y actividad citotóxica.

[0004] El receptor de IL-15 consta de tres polipéptidos, el receptor alfa específico de tipo IL-15 ("IL-15R α "), el receptor beta de IL-2/IL-15 (o CD122) (" β "), y la cadena gamma común (o CD132) (" γ ") que es compartida por múltiples receptores de citocinas. Se cree que IL-15R α se expresa en una amplia variedad de tipos de células, pero no necesariamente junto con β y γ . Se ha demostrado que la señalización de IL-15 se produce a través del complejo heterodimérico de IL-15R α , β y γ ; a través del complejo heterodimérico de β y γ , o a través de una subunidad, IL-15RX, que se encuentra en los mastocitos.

[0005] La IL-15 es una proteína soluble, pero la IL-15 endógena no se detecta fácilmente en suero o fluidos corporales, dado que se presenta predominantemente como una forma unida a la membrana que se expresa o adquiere por varios tipos de células accesorias. Por ejemplo, aunque el ARNm de IL-15 se detecta en células tanto de linaje hematopoyético como no hematopoyético, las células T no producen IL-15. En cambio, IL-15 se une a la IL-15R α , formando complejos de superficie celular en las células T. IL-15 se une

específicamente a IL-15R α con alta afinidad a través del "dominio sushi" en el exón 2 del dominio extracelular del receptor. Después del reciclaje transendosómico y la migración de regreso a la superficie celular, estos complejos de IL-15 adquieren la propiedad de activar las células espectadoras que expresan el complejo receptor de baja afinidad IL-15R $\beta\gamma$, induciendo la señalización mediada por IL-15 a través de la vía Jak/Stat. Se ha observado una forma soluble de tipo salvaje de IL-15R α ("sIL-15R α "), que se escinde en un sitio de escisión en el dominio extracelular inmediatamente distal al dominio transmembrana del receptor. La enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TACE/ADAM17) se ha implicado como una proteasa involucrada en este proceso.

[0006] En base a su papel multifacético en el sistema inmunológico, se han explorado diversas terapias diseñadas para modular la función mediada por IL-15. Informes recientes sugieren que IL-15, cuando forma un complejo con sIL-15R α , o el dominio sushi, mantiene su función de mejora inmunológica. Se ha demostrado que los complejos de IL-15 e IL-15/IL-15R α recombinantes promueven en diferentes grados la expansión de las células T CD8 de memoria y las células NK y mejoran el rechazo de tumores en varios modelos preclínicos. Además, el direccionamiento tumoral de los constructos que contienen el complejo IL-15 o IL-15/IL-15R α en modelos de ratón, dio como resultado respuestas antitumorales mejoradas en animales inmunocompetentes trasplantados con tumores singénicos o en ratones SCID deficientes en células T y B (que retienen células NK) inyectados con líneas de células tumorales humanas. Se cree que el aumento de la actividad antitumoral depende del aumento de la vida media del resto que contiene IL-15, así como de la trans-presentación de IL-15 en la superficie de las células tumorales, que conduce a una mayor expansión de células T citotóxicas NK y / o CD8 dentro del tumor. Como tal, también se informó que las células tumorales diseñadas para expresar IL-15 promueven el rechazo de tumores establecidos al mejorar el reclutamiento, la proliferación y la función de células T y NK (Zhang et al, (2009) PNAS USA. 106:7513–7518; Munger et al, (1995) Cell Immunol. 165(2):289–293; Evans et al, (1997) Cell Immunol. 179(1):66–73; Klebanoff et al, (2004) PNAS USA. 101(7):1969–74; Sneller et al, (2011) Blood.118(26):6845–6848; Zhang et al, (2012) J. Immunol. 188(12):6156–6164).

[0007] Es bien conocido que la actividad biológica de una proteína que contiene cadenas de oligosacáridos, conocida como glicoproteína, depende no sólo de la estructura integral de la proteína, sino también de las propiedades del oligosacárido unido covalentemente a la proteína. La glicosilación puede afectar la solubilidad, la resistencia al

ataque proteolítico y la inactivación térmica, la estructura cuaternaria, la actividad, el direccionamiento, la antigenicidad, la actividad funcional y la vida media de la proteína. Los patrones de glicosilación de mamíferos en general se describen en Fukuda et al. (1994), *Molecular Glycobiology*, IRL Press, Nueva York, que se incorpora en el presente documento como referencia. El ácido siálico ácido N-acetilneuramínico (NANA) es un componente principal de los glicanos ligados a N y O. Se ha demostrado que el ácido siálico es importante para mantener la vida media de las terapias proteicas. Se sabe que las glicoproteínas desialiladas o sub-sialiladas tienen una vida media significativamente reducida en plasma. Por tanto, es ventajoso producir un complejo IL-15/IL-15R α con un perfil de glicosilación único.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0008] En el presente documento se describen composiciones de heterodímero de IL-15/IL-15R α con perfil de glicosilación único. El ácido N-acetilneuramínico (NANA) es un componente principal de los glicanos ligados a N y O. NANA es la forma predominante de ácidos neuramínicos dentro de los eventos de glicosilación de proteínas en humanos, mientras que otros mamíferos también pueden incluir otros derivados tales como el ácido N-glicolilneuramínico (NGNA). NANA se puede unir de varias formas a las estructuras centrales de los N- y O-glicanos. De manera predominante, se pueden encontrar enlaces $\alpha(2, 3)$ y $\alpha(2, 6)$ al sacárido posterior, aunque existen otros enlaces tales como $\alpha(2, 8)$. Las células humanas, por ejemplo las células de riñón embrionario humano (HEK) producen principalmente la sialilación ligada a $\alpha(2, 6)$, mientras que muchas líneas celulares de producción, por ejemplo las líneas celulares de mamíferos, tales como la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), producen la sialilación ligada a $\alpha(2, 3)$.

[0009] En las células CHO, se ha informado que la enzima responsable de producir extensiones NANA unidas a alfa(2, 6) a las estructuras centrales de glicano (alfa-2,6-sialiltransferasa 1 beta-galactósido) es inactiva o no se expresa en células CHO (véase, por ejemplo, Chung et al. (2017) *Biotechnol. J.* 12: 1600502), aunque el gen de la enzima en sí está presente en *C. griseus*. La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que el complejo IL-15/IL-15R α producido por células CHO tiene patrones de glicosilación diferentes en comparación con el complejo IL-15/IL-15R α producido por líneas celulares humanas. Además, se observó el glicano de tipo de enlace alfa(2, 6) en el complejo IL-15/IL-15R α producido en células CHO. Este patrón de glicosilación es único y sorprendente dado que generalmente se observa en proteínas expresadas en líneas celulares humanas.

Proporciona beneficios directos, por ejemplo, menos inmunogenicidad, en comparación con el patrón CHO esperado al estar más cerca de las formas de glicosilación humana. Por ejemplo, los glucoepítos potencialmente inmunogénicos no humanos, tales como el ácido N-glicolilneuramínico, están esencialmente ausentes en la IL-15/IL-15R α producida por células CHO. Además, la glicosilación puede afectar la vida media de las citocinas *in vivo* y su distribución. y, por tanto, afectan la eficacia terapéutica del complejo IL-15/IL-15R α glicosilado.

[0010] Por otro lado, los complejos IL-15/IL-15R α derivados de células HEK no se consideran óptimos para un mayor desarrollo debido a la baja robustez del proceso, bajos rendimientos, uso de materias primas de origen animal en el proceso de producción, caracterización analítica compleja con resolución limitada, y existencia de una variante de empalme en IL-15R α detectada recientemente. La variante de empalme de IL-15R α puede causar toxicidad. Además, la presencia de especies adicionales dificulta la determinación de la cantidad exacta de complejo IL-15/IL-15R α activo que se administra al paciente y afecta la potencia del fármaco. La susceptibilidad a la contaminación viral también se considera un riesgo potencial cuando se utilizan células HEK para producir biofármacos recombinantes. Por tanto, las células CHO se consideran más óptimas para producir complejos de IL-15/IL-15R α porque son más seguras, no son tan susceptibles a la contaminación viral y tienen un rendimiento mucho mayor.

[0011] Por consiguiente, la presente descripción se refiere a un complejo polipeptídico que comprende un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) humana y un polipéptido del receptor alfa de interleucina 15 humana (IL-15R α). En algunas formas de realización, el complejo polipeptídico comprende glicanos unidos a N que comprenden FA2G2, FA2G2S1, FA2G2S2, FA3G3S1, FA2F1G2S2, FA3G2S2, y FA3G3S3. En algunas formas de realización, el polipéptido de IL-15 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 5, e IL-15R α tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6, 7, 10, 12, 14 o 21.

[0012] En algunas formas de realización, los glicanos ligados a N comprenden al menos aproximadamente 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% o 22,5% de FA2G2S1. En algunas formas de realización, los glicanos ligados a N comprenden al menos aproximadamente 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% o 25% de FA2G2S1.

[0013] En algunas formas de realización, los glicanos unidos a N comprenden al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30% o 40% de FA2G2S2. En algunas formas de

realización, los glicanos unidos a N comprenden al menos aproximadamente 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%, 27,5%, 30%, 32,5%, 35%, 37,5% o 40% de FA2G2S2.

[0014] En algunas formas de realización, el complejo polipeptídico comprende glicanos unidos a O. En algunas formas de realización, al menos el 80%, 85%, 90% o 95% de los glicanos es glicano unido a O del núcleo 1.

[0015] En algunas formas de realización, el glicano unido O del núcleo 1 está predominantemente monosialilado y/o disialilado.

[0016] Adicionalmente, se describen en el presente documento complejos polipeptídicos que comprenden un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) humana y un polipéptido del receptor alfa de interleucina 15 humana (IL-15R α) que tiene tanto glicanos unidos a O como glicanos unidos a N. En algunas formas de realización, los glicanos unidos a O del complejo polipeptídico tienen al menos aproximadamente 80%, 85%, 90% o 95% de los glicanos tienen estructuras de glicanos unidos a O del núcleo 1; y el complejo polipeptídico comprende glicanos unidos a N que comprenden FA2G2, FA2G2S1, FA2G2S2, FA3G3S1, FA2F1G2S2, FA3G2S2, y FA3G3S3. En algunas formas de realización, el polipéptido de IL-15 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 5, e IL-15R α tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6, 7, 10, 12, 14 o 21.

[0017] En algunas formas de realización, los glicanos unidos a N comprenden al menos aproximadamente 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20% o 22,5% de FA2G2S1. En algunas formas de realización, los glicanos unidos a N comprenden al menos el 10%, 20%, 30% o 40% de FA2G2S2. En algunas formas de realización, el glicano unido a O del núcleo 1 está predominantemente monosialilado y/o disialilado.

[0018] Además, se describen en el presente documento heterodímeros de IL-15/IL-15R α aislados producidos en una célula no humana, en donde el heterodímero de IL-15/IL-15R α comprende α (2,6) sialilación unida a O. En algunas formas de realización, la célula no humana es una célula recombinante de ovario de hámster chino (CHO). En algunas formas de realización, la célula CHO se altera para deteriorar la función de la matriptasa.

[0019] En algunas formas de realización, el heterodímero de IL-15/IL-15R α aislado comprende glicanos unidos a O, y en donde al menos el 90% o el 95% de los glicanos es glicano unido a O del núcleo 1. En algunas formas de realización, aproximadamente el 15% de los O-glicanos tiene sialilación unida a α (2,6).

[0020] Además, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los complejos polipeptídicos o cualquiera de los heterodímeros

IL-15/IL-15R α aislados descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

[0021] Adicionalmente, se describen en el presente documento células no humanas que comprenden ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) humana y un polipéptido del receptor alfa de interleucina 15 humana (IL-15R α), en donde la IL-15 y la IL-15R α expresadas por la célula forma un heterodímero, y en donde el heterodímero comprende sialilación unida a $\alpha(2,6)$.

[0022] Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar a un sujeto que necesite la composición farmacéutica que se describe en el presente documento.

[0023] Además, en el presente documento se describen métodos para producir células que expresan heterodímero IL-15/IL-15 α , que comprenden (a) proporcionar células no humanas; (b) transfectar las células no humanas con dos vectores al mismo tiempo, en donde los dos vectores comprenden un primer vector que codifica tanto IL-15R α como IL-15, y un segundo vector que codifica una porción de IL-15R α y cultivar las células transfectadas; (c) transfectar las células del paso b) con un tercer vector que codifica IL-15 y cultivar las células transfectadas; y (d) aislar clones individuales que expresan el heterodímero IL-15/IL-15 α .

[0024] En algunas formas de realización, la célula no humana es una célula recombinante de ovario de hámster chino (CHO). En algunas formas de realización, la célula CHO se modifica para alterar la función del gen de la matriptasa. En algunas formas de realización, la IL-15R α tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, la IL-15 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, la porción de IL-15 R α es soluble porción de IL-15R α . En algunas formas de realización, la porción soluble de IL-15R α tiene la secuencia de SEQ ID NO: 10.

[0025] Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos para producir heterodímero IL-15/IL-15 R α , que comprenden (a) cultivar las células producidas anteriormente en una condición que permita la expresión de un heterodímero IL-15/IL-15R α y la secreción del heterodímero IL-15/IL-15R α , y (b) aislar el heterodímero IL-15/IL-15 α del cultivo celular.

[0026] También se describen en este documento complejos polipeptídicos que comprenden un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) humana y un polipéptido del receptor alfa de interleucina 15 humana (IL-15R α), en donde el complejo polipeptídico se produce por

una célula de ovario de hámster chino (CHO) recombinante. y en donde el complejo polipeptídico no tiene una variante de corte y empalme de cadena de IL-15R α .

[0027] En algunas formas de realización, la variante de corte y empalme de la cadena de IL-15R α comprende 159 residuos que se extienden desde I1 a G159. En algunas formas de realización, la célula CHO se altera para deteriorar la función de la matriptasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] Las **Figuras 1A-1C** muestran mapas de vectores de pBW1697, pBW1703 y pBW1916. El vector pBW1697 (A) incluye genes para la expresión de IL-15 e IL-15R α ; pBW1703 (B) incluye genes para la expresión de IL-15R α y (C) pBW1916 incluye genes para la expresión de IL-15. Los tres plásmidos incluyen el sitio SmaI utilizado para la linealización del vector.

[0029] Las **Figuras 2A-2C** muestran el análisis de transferencia Northern de células que producen IL-15/IL-15R α (C009) al comienzo y al final del estudio de estabilidad. La expresión de ARNm de IL-15 (A), IL-15 propia con propéptido (B) e IL-15R α (C) de la célula se analizó mediante transferencia Northern. Se cargó una escalera de ARN de 0,5 – 10 kb en el carril M, y el ARN de control de las células CHO–MaKo parentales en el carril P. (A) Se detectó el tamaño de banda de 1 kb esperado del ARNm de IL-15. (B) Se detectó el tamaño de banda esperado de 1 kb de SP propia de IL-15 con ARNm del propéptido. (C) Se detectó el tamaño de banda esperado de 1 kb del ARNm de IL-15R α . No se detectó señal para las células parentales.

[0030] Las **Figuras 3A-3C** muestran el análisis de transferencia Southern de células que producen IL-15/IL-15R α (C009) al comienzo y al final del estudio de estabilidad. El ADN genómico de la célula se digirió con la enzima de restricción *MfeI* y se analizó mediante transferencia Southern, utilizando una sonda So465 dirigida a la secuencia del gen IL-15 (A), la sonda So466 dirigida a la secuencia del propéptido + SP propia de IL-15 (B) y la sonda So467 que se dirige a la secuencia del gen IL-15R α (C). Se cargó una escalera de ADN (marcador de ADN molecular VII, Roche) en el carril M. Los carriles 1–3 contenían ADN genómico digerido con *MfeI* de células CHO–MaKo parentales, sin (carril 4) o con pBW1697 digerido con *MfeI* enriquecido (carril 1), ADN del vector pBW1703 (carril 2) y pBW1916 (carril 3) a 5 copias por genoma. (A) El tamaño de banda esperado de 1,9 kb para el fragmento de IL-15 se detecta en pBW1697 (carril 1), en pBW1916 (carril 3) y al principio y al final de la estabilidad (carriles 5 y 6). (B) El tamaño de banda esperado de 1,9 kb para el fragmento del propéptido + SP propio de IL-15 se detecta a partir de pBW1697 (carril 1), no

se detecta banda al comienzo y al final de la estabilidad (carriles 5 y 6). (C) El tamaño de banda esperado de 2,5 kb para el fragmento IL-15R α (IL-15R α FL) se detecta de pBW1697 (carril 1), el tamaño de banda de 2 kb (IL-15R α sol) se detecta de pBW1703 (carril 2) y al principio y al final de la estabilidad (carriles 5 y 6). No se pudo detectar ninguna señal para las células parentales.

[0031] La **Figura 4** muestra el número de copias transgénicas de células que producen IL-15/IL-15R α (C009) al comienzo y al final de la estabilidad. IL-15/propio SP (columnas negras), IL-15R α /UTR12SP (columnas de color gris oscuro) e IL-15/UTR12SP (columnas de color gris claro) se midieron los números de copias de genes (por genoma haploide) mediante qPCR para las células que producen IL-15/IL-15R α y células parentales de CHO-MaKo.

[0032] Las **Figuras 5A y 5B** muestran la discriminación de ácido siálico con enlaces α 2,3 y α 2,6. El panel A representa la etil-esterificatina de la 6-dialilactosa, el panel B representa la formación de una lactona para la 3'-sialilactosa.

[0033] La **Figura 6** muestra la distribución de O-glicanos de het IL-15.

[0034] La **Figura 7** muestra una estructura de tipo núcleo 1.

[0035] La **Figura 8** muestra una estructura de tipo núcleo 2.

[0036] La **Figura 9** muestra el espectro de MS de het IL-15.

[0037] La **Figura 10** muestra perfiles de N-glicanos de het IL-15 que se producen por HEK y CHO.

[0038] La **Figura 11** muestra perfiles de N-glicanos de het IL-15 que se producen por HEK.

[0039] La **Figura 12** muestra perfiles de N-glicanos de het IL-15 que se producen por CHO.

[0040] La **Figura 13** muestra la nomenclatura de los bloques de construcción individuales de glicanos.

[0041] La **Figura 14** muestra el diseño del estudio de expansión y escalada de dosis.

[0042] La **Figura 15** muestra perfiles cromatográficos de lotes HEK293 y lotes CHO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Temas Generales

[0043] Para que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen ciertos términos a lo largo de la descripción detallada. A menos que se defina lo contrario, todos los

términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0044] *Terminología*

[0045] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases, tal como se utilizan en el presente documento, pretenden tener los siguientes significados:

[0046] Como se utiliza en el presente documento, los artículos "un" y "uno/una" se refieren a uno o más de uno (por ejemplo, al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

[0047] El término "o" se utiliza en este documento con el significado y se utiliza indistintamente con el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0048] "Alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), típicamente dentro del 10% y más típicamente dentro del 5% de un valor o rango de valores dado.

[0049] Los términos "enfermedad" y "trastorno" se utilizan indistintamente para referirse a una afección, en particular, una afección patológica. En determinadas formas de realización, los términos "enfermedad" y "trastorno" se utilizan indistintamente para referirse a una enfermedad afectada por la transducción de señales de IL-15 y/o una enfermedad afectada por la promoción de una respuesta efectora inmunitaria.

[0050] Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo, o la mejora de uno o más síntomas (de modo preferente, uno o más síntomas discernibles) del trastorno resultante de la administración de una o más terapias. En formas de realización específicas, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico medible de un trastorno proliferativo, tal como el crecimiento de un tumor, no necesariamente discernible por el paciente. En otras formas de realización, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la inhibición de la progresión de un trastorno proliferativo, ya sea físicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un trastorno físico. parámetro, o ambos. En otras formas de realización, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la reducción o estabilización del tamaño del tumor o el recuento de células cancerosas.

[0051] Como se utiliza en este documento, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier protocolo(s), método(s), composición, formulaciones y/o agente(s) que se pueden utilizar en la prevención, el tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, linfopenia e inmunodeficiencias, o un síntoma asociado con las mismas. En ciertas formas de realización, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención o mejora de una enfermedad o un síntoma asociado con la misma conocido por un experto en el arte.

[0052] Como se utiliza en este documento, los términos "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos en el contexto de un receptor (por ejemplo, IL-15R α nativo o receptor $\beta\gamma$ de IL-15) y una interacción de ligando (por ejemplo, IL-15 nativa) se refiere a la unión o asociación específica entre el ligando y el receptor. De modo preferente, el ligando tiene mayor afinidad por el receptor que por otras moléculas. En una forma de realización específica, el ligando es IL-15 nativa y el receptor nativo es IL-15R α . En otra forma de realización específica, el ligando es el complejo IL-15/IL-15R α nativo y el receptor nativo es el complejo receptor $\beta\gamma$. En una forma de realización adicional, el complejo IL-15/IL-15R α se une al complejo del receptor $\beta\gamma$ y activa la transducción de señales mediada por IL-15. Los ligandos que se unen específicamente a un receptor se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcoreTM u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

[0053] Como se utiliza en este documento, el término "se une inmunoespecíficamente" y "se une específicamente" en el contexto de los anticuerpos se refiere a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, un epítipo o un complejo inmune) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros antígenos con una afinidad más baja determinada por, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcoreTM u otros ensayos conocidos en la técnica. En una forma de realización específica, las moléculas que se unen a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos.

[0054] Por "una combinación" o "en combinación con", no se pretende implicar que la terapia o los agentes terapéuticos deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración juntos, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance descrito en este documento. Los agentes terapéuticos en la combinación se pueden administrar al mismo tiempo, antes o después de una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales.

Los agentes terapéuticos o el protocolo terapéutico se pueden administrar en cualquier orden. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. Además, se apreciará que el agente terapéutico adicional utilizado en esta combinación puede administrarse junto en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes terapéuticos adicionales utilizados en combinación se utilicen a niveles que no superen los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunas formas de realización, los niveles utilizados en combinación serán más bajos que los utilizados individualmente.

[0055] El término "efecto anticancerígeno" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, que incluyen, pero no se limitan a, una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células cancerosas, una disminución en el número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida, una disminución de la proliferación de células cancerosas, una disminución de la supervivencia de las células cancerosas o una mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto anticancerígeno" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos para prevenir la aparición de cáncer en primer lugar.

[0056] El término "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por varios medios, que incluyen, pero no se limitan a, una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución de la proliferación de células tumorales o una disminución de la supervivencia de las células tumorales.

[0057] El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido y descontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Los ejemplos de varios cánceres se describen en este documento e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente en el presente documento, por ejemplo, ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, por ejemplo, tumores difusos o circulantes. Como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores premalignos, así como malignos.

[0058] "Efector inmunológico" o "función" o "respuesta" "efectora", como se utiliza ese término en este documento, se refiere a la función o respuesta, por ejemplo, de una célula efectora inmunitaria, que mejora o promueve un ataque inmunológico de una célula objetivo. Por ejemplo, una función o respuesta efectora inmunitaria se refiere a una propiedad de una célula T o NK que promueve la muerte o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula objetivo. En el caso de una célula T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de función o respuesta efectora inmunitaria.

[0059] El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas.

[0060] Las composiciones y métodos de la presente invención abarcan polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen las secuencias especificadas, o secuencias sustancialmente idénticas o similares a las mismas, por ejemplo, secuencias al menos 85%, 90%, 95% idénticas o superiores a la secuencia especificada. En el contexto de una secuencia de aminoácidos, el término "sustancialmente idéntico" se utiliza en este documento para referirse a un primer aminoácido que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácidos que son i) idénticos o ii) sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos alineados en una segunda secuencia de aminoácidos de manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos pueden tener un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que tiene al menos aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia proporcionada en este documento.

[0061] En el contexto de la secuencia de nucleótidos, el término "sustancialmente idéntico" se utiliza en este documento para referirse a una primera secuencia de ácido nucleico que contiene un número suficiente o mínimo de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos alineados en una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que la primera y segunda secuencias de nucleótidos codifican un polipéptido que tiene una actividad funcional común, o codifican un dominio polipeptídico estructural común o una actividad polipeptídica funcional común. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que tienen al menos aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de

identidad con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia proporcionada en el presente documento.

[0062] El término "variante funcional" se refiere a polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia natural o de tipo salvaje, o están codificados por una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica, y son capaces de tener una o más actividades de la secuencia natural o de tipo salvaje.

[0063] Los cálculos de homología o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se utilizan indistintamente en el presente documento) se realizan como sigue.

[0064] Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para una alineación óptima y secuencias no homólogas pueden descartarse para fines de comparación). En una forma de realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos 70%, de modo preferente al menos 80%, de modo más preferente al menos 90%, 95% e incluso de modo más preferente al menos 100% de la longitud del secuencia de referencia. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en el presente documento, la "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico).

[0065] El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

[0066] La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. En una forma de realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48: 444–453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG. (disponible en

NCBI), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En incluso otra forma de realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que se debe utilizar a menos que se especifique lo contrario) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de cambio de marco de 5.

[0067] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller ((1989) CABIOS, 4: 11–17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

[0068] Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en el presente documento se pueden utilizar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Estas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403–10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogos a moléculas de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2) de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogos a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (disponibles en NCBI).

[0069] Como se utiliza en este documento, el término "hibrida en condiciones de restricción baja, restricción media, alta o muy alta" describe las condiciones para la hibridación y el lavado. Puede encontrarse orientación para realizar reacciones de hibridación

en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6. Los métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y se pueden utilizar. Las condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en este documento son las siguientes: 1) condiciones de hibridación de baja restricción en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados pueden aumentarse a 55°C para condiciones de baja restricción); 2) condiciones de hibridación de restricción media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación de alta restricción en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y de modo preferente 4) condiciones de hibridación de muy alta restricción son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a SSC 0,2X, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de restricción muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que se deben utilizar a menos que se especifique lo contrario.

[0070] Se entiende que las moléculas de la presente invención pueden tener sustituciones de aminoácidos no esenciales o conservativas adicionales, que no tienen un efecto sustancial sobre sus funciones.

[0071] Se pretende que el término "aminoácido" abarque todas las moléculas, naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida y que pueden incluirse en un polímero de aminoácidos naturales. Los aminoácidos ejemplares incluyen aminoácidos de origen natural; análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. Como se utiliza en este documento, el término "aminoácido" incluye tanto los isómeros ópticos D o L como los peptidomiméticos.

[0072] Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas

laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

[0073] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" (si es de cadena sencilla) se utilizan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no-aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, como la conjugación con un componente de marcaje. El polipéptido se puede aislar de fuentes naturales, puede producirse mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota o procariota, o puede ser un producto de procedimientos sintéticos.

[0074] Los términos "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de polinucleótidos" y "polinucleótido" se utilizan de forma intercambiable. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. El polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario y, si es monocatenario, puede ser la cadena codificante o no codificante (antisentido). Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, como por conjugación con un componente de marcaje. El ácido nucleico puede ser un polinucleótido recombinante o un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que no se encuentra en la naturaleza o está unido a otro polinucleótido en una disposición no natural.

[0075] El término "aislado", como se utiliza en el presente documento, se refiere a material que se elimina de su entorno original o nativo (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no se aísla, pero se aísla el mismo polinucleótido o polipéptido, separado por intervención humana de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, e incluso así estar aislados en el sentido de que dicho vector o composición no es parte del entorno en el que se encuentra en la naturaleza.

[0076] Como se utiliza en este documento, el término "glicano" es un azúcar, que puede ser monómeros o polímeros de residuos de azúcar, tales como al menos tres azúcares, y puede ser lineal o ramificado (por ejemplo, tener un brazo α 1,3 y un brazo α 1,6). Un "glicano" puede incluir residuos de azúcares naturales (por ejemplo, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetil neuramínico, galactosa, manosa, fucosa, hexosa, arabinosa, ribosa, xilosa, etc.) y/o azúcares modificados (por ejemplo, 2'-Fluorribosa, 2'-desoxirribosa, fosfomanosa, 6'sulfo N-acetilglucosamina, etc.). El término "glicano" incluye homo y heteropolímeros de residuos de azúcar. El término "glicano" también incluye un componente glicano de un glicoconjugado (por ejemplo, de una glicoproteína, glicolípido, proteoglicano, etc.). El término también abarca glicanos libres, incluidos gliucanos que se han escindido o liberado de otro modo de un glicoconjugado.

[0077] Como se utiliza en el presente documento, el término "glicoproteína" se refiere a una proteína que contiene una estructura peptídica unida covalentemente a uno o más restos de azúcar (es decir, glicanos). El(los) resto(s) de azúcar pueden estar en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos. El(los) resto(s) de azúcar pueden comprender una única cadena no ramificada de residuos de azúcar o pueden comprender una o más cadenas ramificadas. Las glicoproteínas pueden contener restos de azúcar ligados a O y/o restos de azúcar ligados a N. El polisacárido se une mediante el grupo OH de la serina o treonina (polipéptido O-glicosilado) o mediante el grupo amida (NH₂) de la asparagina (polipéptido N-glicosilado). La glicoproteína puede ser homóloga a la célula huésped o de modo preferente heteróloga a la célula huésped que la expresa, es decir, extraña, por ejemplo, una proteína humana producida por células CHO.

[0078] El término "glicoconjugado", como se utiliza en este documento, abarca todas las moléculas en las que al menos un resto de azúcar está unido covalentemente al menos a otro resto. El término engloba específicamente todas las biomoléculas con restos de azúcar unidos covalentemente, incluidas, por ejemplo, glicoproteínas ligadas a N, glicoproteínas ligadas a O, glicolípidos, proteoglicanos, etc.

[0079] Como se utiliza en este documento, el término "patrón de glicosilación" se refiere al conjunto de estructuras de glicanos presentes en una muestra particular. Por ejemplo, un glicoconjugado particular (por ejemplo, glicoproteína) o un conjunto de glicoconjugados (por ejemplo, un conjunto de glicoproteínas) tendrá un patrón de glicosilación. En algunas formas de realización, se hace referencia al patrón de glicosilación

de los glicanos de la superficie celular. Un patrón de glicosilación puede caracterizarse por, por ejemplo, las identidades de los glicanos, cantidades (absolutas o relativas) de glicanos individuales o glicanos de tipos particulares, grado de ocupación de los sitios de glicosilación, etc., o combinaciones de dichos parámetros.

[0080] Varios aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la memoria descriptiva.

[0081] *Glicosilación*

[0082] El término "glicosilación" se refiere a la unión de un polisacárido a un polipéptido. De modo preferente, el polisacárido consta de 2–12 monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Las glicoproteínas pueden contener restos de azúcar ligados a O y/o restos de azúcar ligados a N. La estructura y el número de restos de azúcar unidos a un sitio de glicosilatoína particular pueden ser variables. Dichos restos de azúcar pueden ser, por ejemplo, N–acetilglucosamina, N–acetilgalactosamina, manosa, galactosa, glucosa, fucosa, xilosa, ácido glucurónico, ácido idurónico y/o ácido siálico.

[0083] El término "glicosilación ligada a N" se refiere a la unión de un polisacárido a un residuo de asparagina de una cadena de aminoácidos.

[0084] El término "glicosilación ligada a O" se refiere a la unión de un resto de carbohidrato a un residuo de serina o treonina de una cadena de aminoácidos.

[0085] Los términos "perfil de azúcar" o "perfil de glicosilación", utilizados indistintamente en esta solicitud, describen la naturaleza de glicano de un polipéptido glicosilado. Estas propiedades son de modo preferente el sitio de glicosilación, o la ocupación del sitio de glicosilación, o la identidad, estructura, composición o cantidad del glicano y/o porción sin azúcar del polipéptido, o la identidad y cantidad de una glicoforma específica.

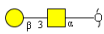
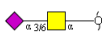
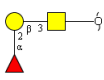
[0086] El ácido N–acetilneuramínico (NANA) es un constituyente principal de los glicanos con enlaces N y O. NANA es la forma predominante de ácidos neuramínicos dentro de los eventos de glicosilación de proteínas en humanos, mientras que otros mamíferos también pueden incluir otros derivados tales como el ácido N–glicolilneuramínico (NGNA). NANA se puede unir de varias formas a las estructuras centrales de los N– y O–glicanos. De manera predominante, se pueden encontrar enlaces $\alpha(2, 3)$ y $\alpha(2, 6)$ con el sacárido posterior, aunque existen otros enlaces tales como $\alpha(2, 8)$. Las células humanas, por ejemplo las células de riñón embrionario humano (HEK) producen principalmente la sialilación ligada $\alpha(2, 6)$,

mientras que muchas líneas celulares de producción, como la línea celular CHO, producen la sialilación ligada $\alpha(2, 3)$.

[0087] En las células CHO, se ha informado que la enzima responsable de producir extensiones NANA unidas alfa(2–6) a estructuras de glicanos centrales (beta–galactósido alfa–2,6–sialiltransferasa 1) es inactiva o no se expresa en células CHO (véase, por ejemplo, Chung et al. (2017) *Biotechnol. J.* 12: 1600502), aunque el gen de la enzima en sí está presente en *C. griseus*. La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que el complejo IL–15/IL–15R α producido por células CHO tiene patrones de glicosilación diferentes en comparación con el complejo IL–15/IL–15R α producido por líneas celulares humanas. Además, se observó glicano de tipo de enlace alfa (2–6) en el complejo IL–15/IL–15R α producido en células CHO. Este patrón de glicosilación es único. Potencialmente, puede proporcionar beneficios directos en comparación con el patrón CHO esperado al estar más cerca de las formas de glicosilación humana.

[0088] En algunas formas de realización, el heterodímero IL–15/IL–15R α de la presente divulgación tiene una o más de las especies de glicanos como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

[0089] **Tabla 1** estructura y nomenclatura de especies conocidas de glicanos.

Nomenclatura	m/z teor. [M+Na] ⁺	Estructura
H1	289.1622	
N1 (o T)	330.1887	
C1 (o Tn)	534.2885	
H1S1	650.3358	
N1S1 (o TS1)	691.3624	
C1F1 (o TnF1)	708.3777	
C2 o C1N1	779.4148	
C1S1 (o TnS1)	895.4621	
C1N1F1 o C2F1	953.5040	

Nomenclatura	m/z teor. [M+Na] ⁺	Estructura
C1Lac1o C2G	983.5146	
C1F1S1	1069.5514	
(C1H1S1) o H2N1S1	1099.5619	
C1N1S1 o C2S1	1140.5885	
C1Lac1F1 o C2GF1	1157.6038	
C1S2 o N1H1S2	1256.6358	
C1N1F1S1 o C2F1S1 o C3H1F1S1	1314.6777	
C1Lac1S1 o C2GS1	1344.6882	
C1Lac1F1S1 o C2GF1S1	1518.7775	

Nomenclatura	m/z teor. [M+Na] ⁺	Estructura
C1S3	1617.8095	
C2GN2F1	1647.8564	
C1Lac2N1 o C1N1Lac1S1 o C2GLac1N1 o (N);A2	1677.8670	
C1Lac1S2 o C2GS2	1705.8619	
C2GN1F1S1 o C4Ga2F1S1	1763.9038	
C2GLac1S1	1793.9143	
C2GN1Lac1F1 o (N);FA2	1851.9562	
C1Lac3 o C2GLac2 o (N);A2G1	1881.9668	

Nomenclatura	m/z teor. [M+Na] ⁺	Estructura
C1Lac1N1S2 o C2GN1S2 o C3Ga1Lac1S2 o C4Ga2S2	1950.9882	
C1Lac1S3 o C2GS3	2067.0356	
C2Lac2N1F1 o C3Ga1Lac2N1F1 o (N);FA3 o (N);FA2B	2097.0825	
C2GLac1S2	2155.0880	
C2Lac3F1 o (N);FA3G1 o (N);FA2BG1	2301.1823	

[0090] IL-15

[0091] Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15" e "interleucina-15" se refieren a una IL-15 nativa o un derivado de IL-15. Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15 nativa" e "interleucina-15 nativa" en el contexto de proteínas o polipéptidos

se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos de interleucina 15 de mamífero natural y de tipo salvaje, incluyendo formas inmaduras o precursoras y maduras. Los ejemplos no limitantes de números de acceso de GeneBank para la secuencia de aminoácidos de varias especies de interleucina-15 de mamíferos nativa incluyen NP_000576 (forma humana, inmadura), CAA62616 (forma humana, inmadura), NP_001009207 (*Felis catus*, forma inmadura), AAB94536 (*Rattus norvegicus*, forma inmadura), AAB41697 (*Rattus norvegicus*, forma inmadura), NP_032383 (*Mus musculus*, forma inmadura), AAR19080 (canino), AAB60398 (*Macaca mulatta*, forma inmadura), AAI00964 (humana, forma inmadura), AAH23698 (*Mus musculus*, forma inmadura) y AAH18149 (humana). La secuencia de aminoácidos de la forma inmadura/precursora de IL-15 humana nativa, que comprende el péptido de señal larga (subrayado) y la IL-15 nativa humana madura (en cursiva), como se proporciona en la SEQ ID NO: 1 en la Tabla 2. En algunas formas de realización, la IL-15 nativa es la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero natural o de tipo salvaje. En otras formas de realización, la IL-15 nativa es la forma madura de una IL-15 de mamífero natural o de tipo salvaje. En una forma de realización específica, la IL-15 nativa es la forma precursora de la IL-15 humana de origen natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, la IL-15 nativa es la forma madura de la IL-15 humana de origen natural o de tipo salvaje. En una forma de realización, la proteína/polipéptido IL-15 nativa se aísla o se purifica.

[0092] Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15 nativa" e "interleucina-15 nativa" en el contexto de ácidos nucleicos se refieren a cualquier secuencia de ácido nucleico de origen natural o secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje que codifica la interleucina-15 de mamífero, incluyendo las formas inmadura o precursora y madura. Los ejemplos no limitantes de números de acceso de GeneBank para la secuencia de nucleótidos de varias especies de IL-15 de mamífero nativo incluyen NM_000585 (humano), NM_008357 (*Mus musculus*) y RNU69272 (*Rattus norvegicus*). La secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal larga (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica la IL-15 nativa humana madura (en cursiva), como se indica en la SEQ ID NO: 2 en la Tabla 2. En una forma de realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos codifican la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero natural o de tipo salvaje.

En otras formas de realización, los ácidos nucleicos codifican la forma madura de una IL-15 de mamífero natural o de tipo salvaje. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa codifican la forma precursora de la IL-15 humana de origen natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos que codifican la IL-15 nativa codifican la forma madura de la IL-15 humana de origen natural o de tipo salvaje.

[0093] Como se utiliza en este documento, los términos "derivado de IL-15" y "derivado de interleucina-15" en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a: (a) un polipéptido que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) relativas a un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (d) un polipéptido codificado por ácidos nucleicos puede hibridar en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con ácidos nucleicos que codifican un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos o al menos 150 aminoácidos contiguos; y/o (f) un fragmento de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo. Los derivados de IL-15 también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura natural o de tipo salvaje de un polipéptido de IL-15 de mamífero y una secuencia de aminoácidos de péptido señal heteróloga. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15 es un derivado de un polipéptido de IL-15 humano nativo. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma inmadura o precursora del polipéptido de IL-15 humano natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma madura de polipéptido de IL-15 humana natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es la IL-15N72D descrita en, por ejemplo, Zhu et al., (2009), J. Immunol.

183: 3598 o la Patente de EE.UU. N° 8.163.879. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 es una de las variantes de IL-15 descritas en la Patente de Estados Unidos N° 8.163.879. En una forma de realización, se aísla o purifica un derivado de IL-15.

[0094] En una forma de realización preferida, los derivados de IL-15 retienen al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 de mamífero nativo para unirse a IL-15R α polipéptido, medido mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcoreTM, co-inmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, los derivados de IL-15 retienen al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 nativo de mamífero para inducir la transducción de señal mediada por IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de electromovilidad, ELISA y otros inmunoensayos. En una forma de realización específica, los derivados de IL-15 se unen a IL-15R α y/o IL-15R $\beta\gamma$ según se evalúa, por ejemplo, mediante ensayos de unión de ligando/receptor bien conocidos en la técnica. El porcentaje de identidad se puede determinar utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica y como se describió anteriormente.

[0095] Como se utiliza en este documento, los términos "derivado de IL-15" y "derivado de interleucina-15" en el contexto de ácidos nucleicos se refieren a: (a) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero; (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (c) una secuencia de ácido nucleico que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de bases de ácidos nucleicos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero; (d) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero; (e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero; y/o (f) una

secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de una secuencia de ácido nucleico natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15 de mamífero. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido de IL-15 humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico natural o de tipo salvaje que codifica una forma inmadura o precursora de un polipéptido IL-15 humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica una forma madura de un polipéptido de IL-15 humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15N72D descrita, por ejemplo, en Zhu et al., (2009; supra), o en la Patente de Estados Unidos No. 8.163.879. En otra forma de realización, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es la secuencia de ácido nucleico que codifica una de las variantes de IL-15 descritas en la Patente de Estados Unidos N° 8.163.879.

[0096] Las secuencias de ácidos nucleicos derivados de IL-15 incluyen secuencias de ácidos nucleicos con codones optimizados que codifican el polipéptido de IL-15 nativo de mamífero, incluidas las formas maduras e inmaduras del polipéptido de IL-15. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos derivados de IL-15 incluyen ácidos nucleicos que codifican transcritos de ARN de IL-15 de mamíferos que contienen mutaciones que eliminan los sitios de empalme potenciales y los elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U) sin afectar la secuencia de aminoácidos. para aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15 de mamíferos. En una forma de realización, las secuencias de ácidos nucleicos derivados de IL-15 incluyen las secuencias de ácidos nucleicos con codones optimizados descritas en el documento WO2007/084342. En ciertas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico derivada de IL-15 es la secuencia de codones optimizados en la SEQ ID NO: 4 en la Tabla 2 (la secuencia de aminoácidos codificada por dicha secuencia de ácidos nucleicos se proporciona en la SEQ ID NO: 5 en la Tabla 2).

[0097] En una forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivados de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativo

para unir IL-15R α , según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcoreTM, co-inmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivados de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativo para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de electromovilidad, ELISA y otros inmunoensayos. En una forma de realización específica, las secuencias de ácido nucleico derivadas de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que se unen a IL-15R α y/o IL-15R $\beta\gamma$ según se evalúa, por ejemplo, mediante ensayos de ligando/receptor bien conocidos en la técnica.

[0098] *IL-15R α*

[0099] Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15R α " y "receptor alfa de interleucina-15" se refieren a un IL-15R α nativo, un derivado de IL-15R α o un IL-15R α nativo y un derivado de IL-15R α . Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15R α nativo" y "receptor alfa de interleucina-15 nativo" en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a cualquier secuencia aminoácidos del receptor alfa de interleucina-15 de mamífero de origen natural o de tipo salvaje ("IL-15R α "), incluidas formas inmaduras o precursoras y maduras e isoformas de origen natural. Los ejemplos no limitantes de números de acceso de GeneBank para la secuencia de aminoácidos de varios IL-15R α de mamíferos nativos incluyen NP_002180 (humano), ABK41438 (*Macaca mulatta*), NP_032384 (*Mus musculus*), Q60819 (*Mus musculus*), CAI41082 (humano). La secuencia de aminoácidos de la forma inmadura del IL-15R α humano de longitud completa nativa, que comprende el péptido señal (subrayado) y el IL-15R α nativo humano maduro (en cursiva), como se proporciona en la SEQ ID NO: 6 en la Tabla 2. La secuencia de aminoácidos de la forma inmadura del IL-15R α humano soluble nativo, que comprende el péptido señal (subrayado) y el IL-15R α soluble nativo humano maduro (en cursiva), como se proporciona en SEQ ID NO: 7 en la Tabla 2. En algunas formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma inmadura de un polipéptido de IL-15R α de mamífero natural o de tipo salvaje. En otras formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma madura de un polipéptido de IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En determinadas formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma soluble de origen natural o de tipo salvaje del polipéptido IL-15R α de mamífero. En otras formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma de longitud completa de un polipéptido de IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En una forma de

realización específica, el IL-15R α nativo es la forma inmadura de un polipéptido de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, el IL-15R α nativo es la forma madura de un polipéptido de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje. En determinadas formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma soluble de origen natural o de tipo salvaje del polipéptido IL-15R α humano. En otras formas de realización, el IL-15R α nativo es la forma completa de un polipéptido de IL-15R α humano natural o de tipo salvaje. En una forma de realización, se aísla o purifica una proteína o polipéptido de IL-15R α nativo.

[00100] Como se utiliza en este documento, los términos "IL-15R α nativo" y "receptor alfa de interleucina-15 nativo" en el contexto de ácidos nucleicos se refieren a cualquier secuencia de ácido nucleico natural o secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje que codifica el receptor alfa de interleucina-15 de mamífero, incluidas las formas inmadura o precursora y madura. Los ejemplos no limitantes de números de acceso de GeneBank para la secuencia de nucleótidos de diversas especies de IL-15R α de mamífero nativo incluyen NM_002189 (humano), EF033114 (*Macaca mulatta*) y NM_008358 (*Mus musculus*). La secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura de IL-15R α humano nativo, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica el IL-15R α nativo humano maduro (en cursiva), como se indica en la SEQ ID NO: 8 en la Tabla 2. La secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura de la proteína o polipéptido IL-15R α humano soluble nativo, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica el IL-15R α nativo soluble humano maduro (en cursiva), como se proporciona en la SEQ ID NO: 9 en la Tabla 2). En una forma de realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma inmadura de un polipéptido IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma madura de un polipéptido IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma soluble de un polipéptido IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma de longitud completa de un polipéptido IL-15R α de mamífero de origen natural o de tipo salvaje. En una forma de realización específica, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma precursora del polipéptido IL-15 humano de origen natural o de tipo

salvaje. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican el polipéptido IL-15 humano maduro de origen natural o de tipo salvaje. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma soluble de un polipéptido de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje. En otras formas de realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma de longitud completa de un polipéptido de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje.

[00101] Como se utiliza en este documento, los términos "derivado de IL-15R α " y "derivado alfa del receptor de interleucina-15" en el contexto de una proteína o polipéptido se refieren a: (a) un polipéptido que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) relativas a un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo; (d) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar bajo condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con secuencias de ácido nucleico que codifican un fragmento de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 contiguos aminoácidos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos o al menos 150 aminoácidos contiguos; (f) un fragmento de un polipéptido IL-15R α de mamífero nativo; y/o (g) un derivado de IL-15R α específico descrito en el presente documento. Los derivados de IL-15R α también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura natural o de tipo salvaje del polipéptido IL-15R α de mamífero y una secuencia de aminoácidos de péptido señal heterólogo. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15R α es un derivado de un polipéptido de IL-15R α humano nativo. En otra forma de realización, un derivado de IL-15R α es un derivado de una forma inmadura de polipéptido de IL-15 humano natural o de tipo salvaje. En otra forma de realización, un derivado de IL-15R α es un derivado de una forma madura de polipéptido de IL-15 humano natural o de tipo salvaje. En una forma de realización, un derivado de IL-15R α es una forma

soluble de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo. En otras palabras, en determinadas formas de realización, un derivado de IL-15R α incluye formas solubles de IL-15R α de mamífero nativo, en donde esas formas solubles no se encuentran de forma natural. Otros ejemplos de derivados de IL-15R α incluyen las formas solubles truncadas de IL-15R α humano nativo que se describen en el presente documento. En una forma de realización específica, se purifica o aísla un derivado de IL-15R α .

[00102] En una forma de realización preferida, los derivados de IL-15R α retienen al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo para unirse a un polipéptido IL-15, medido mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcoreTM, co-inmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, los derivados de IL-15R α retienen al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, medida mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de electromovilidad, ELISA y otros inmunoensayos. En una forma de realización específica, los derivados de IL-15R α se unen a IL-15 según se evalúa mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, ELISA.

[00103] Como se utiliza en el presente documento, los términos "derivado de IL-15R α " y "derivado alfa del receptor de interleucina-15" en el contexto de ácidos nucleicos se refieren a: (a) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15R α de mamífero; (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo; (c) una secuencia de ácido nucleico que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de ácido nucleico (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a la secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido de IL-15R α de mamífero; (d) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15R α de mamífero; (e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación de restricción alta, moderada o típica con un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15R α de mamífero; (f) una secuencia de ácido

nucleico que codifica un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido IL-15R α de mamífero; y/o (g) una secuencia de ácido nucleico que codifica un derivado de IL-15R α específico descrito en el presente documento. En una forma de realización específica, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica un polipéptido de IL-15R α humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico natural o de tipo salvaje que codifica una forma inmadura de un polipéptido de IL-15R α humano. En otra forma de realización, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural o de tipo salvaje que codifica una forma madura de un polipéptido de IL-15R α humano. En una forma de realización, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un derivado del polipéptido de IL-15R α de mamífero que es soluble. En determinadas formas de realización, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una forma soluble de IL-15R α de mamífero nativo, en donde la forma soluble no es de origen natural. En algunas formas de realización, un derivado de IL-15R α en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un derivado de IL-15R α humano, en donde el derivado de IL-15R α humano es una forma soluble de IL-15R α que no es de forma natural. En formas de realización específicas, se aísla o purifica una secuencia de ácido nucleico derivada de IL-15R α .

[00104] Las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15R α incluyen secuencias de ácidos nucleicos con codones optimizados que codifican el polipéptido IL-15R α nativo, incluidas las formas maduras e inmaduras del polipéptido IL-15R α . En otras formas de realización, los ácidos nucleicos derivados de IL-15R α incluyen ácidos nucleicos que codifican transcritos de ARN de IL-15R α que contienen mutaciones que eliminan los sitios de empalme potenciales y los elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U) sin afectar la secuencia de aminoácidos para aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15R α . En determinadas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico derivadas de IL-15R α es la secuencia de codones optimizados en las SEQ ID NO: 11, 13 en la Tabla 2 (las secuencias de aminoácidos codificadas por dichas secuencias de ácido nucleico se proporcionan en las SEQ ID NO: 12, 14 en la Tabla 2, respectivamente).

[00105] En formas de realización específicas, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15R α codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 98% o 99% de la función de un polipéptido de IL-15R α de mamífero nativo para unirse a IL-15, según se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcoreTM, co-inmunoprecipitación. En otra forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos derivadas de IL-15R α codifican proteínas o polipéptidos que retienen al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99% de la función de un IL-15R α de mamífero nativo para inducir la transducción de señales mediada por IL-15, que se mide mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de electromovilidad, ELISA y otros inmunoensayos. En una forma de realización específica, las secuencias de ácido nucleico derivadas de IL-15R α codifican proteínas o polipéptidos que se unen a IL-15 según se evalúa mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, ELISA.

[00106] En el presente documento se describe la forma soluble de origen natural o de tipo salvaje de IL-15R α humano. También se describen en el presente documento derivados de IL-15R α específicos que son formas solubles truncadas de IL-15R α humano. Estos derivados de IL-15R α específicos y la forma soluble natural o de tipo salvaje de IL-15R α humano se basan, en parte, en la identificación del sitio de escisión proteolítica del IL-15R α humano. Se describen adicionalmente en el presente documento formas solubles de IL-15R α que se caracterizan basándose en la glicosilación del IL-15R α .

[00107] La escisión proteolítica del IL-15R α humano tiene lugar entre los residuos (es decir, Gly170 y His171) que se muestran en negrita y subrayados en la secuencia de aminoácidos proporcionada de la forma inmadura del IL-15R α humano de longitud completa nativo: MAPRRARGCR TLGLPALLLL LLLRPPATRG ITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTTPS LKCIRDPALV HQRPAAPPSTV TTAGVTPQPE SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAAIVPGS QLMPSKSPST GTTEISSHES SHGTPSQT TA KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTTVAIST STVLLCGLSA VSLLACYLKS RQTPPLASVE MEAMEALPVT WGTSSRDEDL ENCSHHL (SEQ ID NO: 6 en la Tabla 2).

[00108] Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona en el presente documento una forma soluble de IL-15Ra humano (por ejemplo, una forma soluble purificada de IL-15Ra humano), en donde la secuencia de aminoácidos de la forma soluble de IL-15Ra humano termina en el sitio de la escisión proteolítica del IL-15R α humano unido a la membrana

nativo. En particular, en el presente documento se proporciona una forma soluble de IL-15R α humano (por ejemplo, una forma soluble purificada de IL-15R α humano), en donde la secuencia de aminoácidos de la forma soluble de IL-15R α humano termina con PQG (SEQ ID NO: 20 en la Tabla 2), en donde G es Gly170. En una forma de realización particular, se proporciona en el presente documento una forma soluble de IL-15R α humano (por ejemplo, una forma soluble purificada de IL-15R α humano) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 7 en la Tabla 2. En algunas formas de realización, proporcionado en el presente documento es un derivado de IL-15R α (por ejemplo, una forma purificada y/o soluble del derivado de IL-15R α), que es un polipéptido que: (i) es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 7 en la Tabla 2; y (ii) termina con la secuencia de aminoácidos PQG (SEQ ID NO: 20 en la Tabla 2). En otras formas de realización particulares, se proporciona en el presente documento una forma soluble de IL-15R α humano (por ejemplo, una forma soluble purificada de IL-15R α humano) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 en la Tabla 2). En algunas formas de realización, en el presente documento se proporciona un derivado de IL-15R α (por ejemplo, una forma purificada y/o soluble de un derivado de IL-15R α), que es un polipéptido que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 10 en la Tabla 2 y, opcionalmente, en donde la secuencia de aminoácidos de la forma soluble del derivado de IL-15R α termina con PQG (SEQ ID NO: 20 en la Tabla 2).

[00109] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporciona un derivado de IL-15R α de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje, en donde el derivado de IL-15R α es soluble y: (a) los últimos aminoácidos en el extremo C-terminal del derivado de IL-15R α consiste en residuos de aminoácidos PQGHSDTT (SEQ ID NO: 15 en la Tabla 2); (b) los últimos aminoácidos en el extremo C-terminal del derivado de IL-15R α consisten en residuos de aminoácidos PQGHSDT (SEQ ID NO: 16 en la Tabla 2); (c) los últimos aminoácidos en el extremo C-terminal del derivado de IL-15R α consisten en residuos de aminoácidos PQGHSD (SEQ ID NO: 17 en la Tabla 2); (d) los últimos aminoácidos en el extremo C-terminal del derivado de IL-15R α consisten en residuos de aminoácidos PQGHS (SEQ ID NO: 18 en la Tabla 2); o (e) los últimos aminoácidos en el extremo C-terminal del derivado de IL-15R α consisten en residuos de aminoácidos PQGH (SEQ ID NO: 19 en la Tabla 2). En ciertas formas de realización, las secuencias de aminoácidos de estos derivados de IL-15R α son al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 21 en la Tabla 2. En algunas formas de realización, estos derivados de IL-15R α se purifican.

[00110] En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento formas glicosiladas de IL-15R α (por ejemplo, formas glicosiladas purificadas de IL-15R α), en donde la glicosilación de IL-15R α representa al menos el 20%, al menos el 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, o 20% a 25%, 20% a 30%, 25% a 30%, 25% a 35%, 30% a 35%, 30% a 40%, 35% a 40%, 35% a 45%, 40% a 50%, 45% a 50%, 20% a 40% o 25% a 50% de la masa (peso molecular) del IL-15R α evaluado mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica. El porcentaje de la masa (peso molecular) de IL-15R α (por ejemplo, IL-15R α purificado) que representa la glicosilación de IL-15R α se puede determinar utilizando, por ejemplo y sin limitación, electroforesis en gel y densitometría cuantitativa de los geles, y comparación de la masa promedio (peso molecular) de una forma glicosilada de IL-15R α (por ejemplo, una forma glicosilada purificada de IL-15R α) con la forma no glicosilada de IL-15R α (por ejemplo, una forma no glicosilada purificada de IL-15R α). En una forma de realización, la masa promedio (peso molecular) de IL-15R α (por ejemplo, IL-15R α purificado) se puede determinar utilizando el espectro de MALDI-TOF MS en Voyager De-Pro equipado con detector de alta masa CovalX HM-1 utilizando ácido sinápico como matriz, y la masa de una forma glicosilada de IL-15R α (por ejemplo, forma glicosilada purificada de IL-15R α) puede compararse con la masa de la forma no glicosilada de IL-15R α (por ejemplo, forma no glicosilada purificada de IL-15R α) para determinar el porcentaje de masa que representa la glicosilación.

[00111] En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento formas glicosiladas de IL-15R α , en donde IL-15R α está glicosilado (N- u O-glicosilado) en ciertos residuos de aminoácidos. En determinadas formas de realización, se proporciona en el presente documento un IL-15R α humano que está glicosilado en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los siguientes sitios de glicosilación: (i) O-glicosilación en treonina en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos NWELTASASHQPPGVYPQG (SEQ ID NO: 22 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; (ii) O-glicosilación en serina en la posición 7 de la secuencia de aminoácidos NWELTASASHQPPGVYPQG (SEQ ID NO: 22 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; (iii) N-glicosilación en serina en la posición 8 de la secuencia de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVK (SEQ ID NO: 22 en la Tabla 2) en IL-15R α , o serina en la posición 8 de la secuencia de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS (SEQ ID NO: 23 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; (iv) N-glicosilación en Ser 18 de la secuencia

de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS (SEQ ID NO: 24 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; (v) N-glicosilación en serina en la posición 20 de la secuencia de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS (SEQ ID NO: 24 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; (vi) N-glicosilación en serina en la posición 23 de la secuencia de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS (SEQ ID NO: 24 en la Tabla 2) en el IL-15R α ; y/o (vii) N-glicosilación en serina en la posición 31 de la secuencia de aminoácidos ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS (SEQ ID NO: 24 en la Tabla 2) en el IL-15R α . En formas de realización específicas, el IL-15R α glicosilado es un IL-15R α humano nativo. En otras formas de realización específicas, el IL-15R α glicosilado es un derivado de IL-15R α de IL-15R α humano de origen natural o de tipo salvaje. En algunas formas de realización, el IL-15R α glicosilado es un IL-15R α humano soluble nativo, tal como SEQ ID NO: 7 o 10 en la Tabla 2. En otras formas de realización, el IL-15R α glicosilado es un derivado de IL-15R α que es una forma soluble de IL-15R α humano. En determinadas formas de realización, el IL-15R α glicosilado se purifica o aísla.

[00112] *Complejo IL-15/IL-15R α*

[00113] Como se utiliza en este documento, el término "complejo IL-15/IL-15R α " se refiere a un complejo que comprende IL-15 e IL-15R α unidos covalentemente o no covalentemente entre sí. En una forma de realización preferida, el IL-15R α tiene una afinidad relativamente alta por IL-15, por ejemplo, KD de 10 a 50 pM según se mide mediante una técnica conocida en la técnica, por ejemplo, ensayo KinEx A, resonancia de la superficie del plasma (por ejemplo, ensayo BIAcore). En otra forma de realización preferida, el complejo IL-15/IL-15R α induce la transducción de señales mediada por IL-15, medida mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de desplazamiento de electromovilidad, ELISA y otros inmunoensayos. En algunas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α conserva la capacidad de unirse específicamente a la cadena $\beta\gamma$. En una forma de realización específica, el complejo IL-15/IL-15R α se aísla de una célula.

[00114] En el presente documento se proporcionan complejos que se unen a las subunidades $\beta\gamma$ del receptor de IL-15, inducen la transducción de señales de IL-15 (por ejemplo, transducción de señales de Jak/Stat) y mejoran la función inmunitaria mediada por IL-15, en donde los complejos comprenden IL-15 unido covalente o no covalentemente al receptor alfa de interleucina-15 ("IL-15R α ") (un "complejo IL-15/IL-15R α "). El complejo IL-15/IL-15R α puede unirse al complejo receptor $\beta\gamma$.

[00115] Los complejos IL-15/IL-15R α pueden estar compuestos de IL-15 nativa o un derivado de IL-15 e IL-15R α nativo o un derivado de IL-15R α . En determinadas formas de realización, un complejo IL-15/IL-15R α comprende IL-15 nativa o un derivado de IL-15 y un IL-15R α descritos anteriormente. En una forma de realización específica, un complejo IL-15/IL-15R α comprende IL-15 nativa o un derivado de IL-15 e IL-15R α con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 en la Tabla 2. En otra forma de realización, un complejo IL-15/IL-15R α comprende IL-15 nativa o un derivado de IL-15 y una forma glicosilada de IL-15R α descrita anteriormente.

[00116] En una forma de realización específica, un complejo IL-15/IL-15R α comprende IL-15 nativa o un derivado de IL-15R α e IL-15R α soluble nativo (por ejemplo, IL-15R α humana soluble nativo). En otra forma de realización específica, un complejo IL-15/IL-15R α está compuesto por un derivado de IL-15 y un derivado de IL-15R α . En otra forma de realización, un complejo IL-15/IL-15R α está compuesto de IL-15 nativa y un derivado de IL-15R α . En una forma de realización, el derivado de IL-15R α es una forma soluble de IL-15R α . Los ejemplos específicos de formas solubles de IL-15R α se describen anteriormente. En una forma de realización específica, la forma soluble de IL-15R α carece del dominio transmembrana de IL-15R α nativo y, opcionalmente, el dominio intracelular de IL-15R α nativo. En otra forma de realización, el derivado de IL-15R α es el dominio extracelular de IL-15R α nativo o un fragmento del mismo. En determinadas formas de realización, el derivado de IL-15R α es un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o exón 2 del IL-15R α nativo. En algunas formas de realización, el derivado de IL-15R α comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o exón 2 del IL-15R α nativo y al menos un aminoácido que está codificado por el exón 3. En ciertas formas de realización, el derivado de IL-15R α comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o exón 2 de IL-15R α nativo y una región de bisagra de IL-15R α o su fragmento. En determinadas formas de realización, el IL-15R α comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 en la Tabla 2.

[00117] En otra forma de realización, el derivado de IL-15R α comprende una mutación en el sitio de escisión del dominio extracelular que inhibe la escisión por una proteasa endógena que escinde el IL-15R α nativo. En una forma de realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15R α se reemplaza con un sitio de escisión que es reconocido y escindido por una proteasa heteróloga conocida. Los ejemplos no limitantes de tales sitios de escisión de proteasa heterólogos incluyen Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 25 en la

Tabla 2), que se reconoce y escinde por la proteasa de furina; y A–B–Pro–Arg–X–Y (SEQ ID NO: 26 en la Tabla 2) (A y B son aminoácidos hidrófobos y X e Y son aminoácidos no ácidos) y Gly–Arg–Gly, que son reconocidos y escindidos por proteasa de trombina.

[00118] En otra forma de realización, la IL–15 está codificada por una secuencia de ácido nucleico optimizada para mejorar la expresión de IL–15, por ejemplo, utilizando métodos como se describe en los documentos WO 2007/084342 y WO 2010/020047; y Patentes de Estados Unidos N° 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498.

[00119] En determinadas formas de realización, se proporciona en el presente documento un complejo de IL–15/IL–15R α que comprende IL–15R α humano que está glicosilado en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los sitios de glicosilación como se describió anteriormente y con referencia a las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 en la Tabla 2. En formas de realización específicas, el IL–15R α glicosilado es un IL–15R α humano nativo. En otras formas de realización específicas, el IL–15R α glicosilado es un derivado de IL–15R α de IL–15R α humano de origen natural o de tipo salvaje. En algunas formas de realización, el IL–15R α glicosilado es un IL–15R α humano soluble nativo, tal como SEQ ID NO: 7 o 10 en la Tabla 2. En otras formas de realización, el IL–15R α glicosilado es un derivado de IL–15R α que es una forma soluble de IL–15R α humano. En determinadas formas de realización, el complejo IL–15/IL–15R α se purifica o aísla.

[00120] Además de IL–15 e IL–15R α , los complejos IL–15/IL–15R α pueden comprender una molécula heteróloga. En algunas formas de realización, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. Los ejemplos no limitantes de tales moléculas incluyen polietilenglicol (PEG), dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o su fragmento, o albúmina que aumentan la vida media de IL–15 o IL–15R α in vivo. En determinadas formas de realización, IL–15R α se conjuga/fusiona con el dominio Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, una IgG1) o un fragmento de la misma. En una forma de realización específica, la proteína de fusión IL–15R α Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o 28 en la Tabla 2. En otra forma de realización, la proteína de fusión IL–15R α Fc es la proteína de fusión IL–15R α /Fc descrita en Han et al., (2011), Cytokine 56: 804–810, Patente de Estados Unidos N° 8.507.222 o Patente de Estados Unidos N° 8.124.084. En aquellos complejos de IL–15/IL–15R α que comprenden una molécula heteróloga, la molécula heteróloga puede conjugarse con IL–15 y/o IL–15R α . En

una forma de realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15R α . En otra realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15.

[00121] Los componentes de un complejo de IL-15/IL-15R α pueden fusionarse directamente, utilizando enlaces no covalentes o enlaces covalentes (por ejemplo, combinando secuencias de aminoácidos mediante enlaces peptídicos), y/o pueden combinarse utilizando uno o más ligadores. Los ligadores adecuados para preparar los complejos IL-15/IL-15R α comprenden péptidos, grupos alquilo, grupos alquilo químicamente sustituidos, polímeros o cualquier otra sustancia química unida covalentemente o no covalentemente capaz de unir dos o más componentes. Los ligadores de polímero comprenden cualquier polímero conocido en la técnica, incluido el polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el ligador es un péptido que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos de largo. En una forma de realización específica, el ligador es lo suficientemente largo para preservar la capacidad de IL-15 para unirse al IL-15R α . En otras formas de realización, el ligador es suficientemente largo para preservar la capacidad del complejo IL-15/IL-15R α de unirse al complejo receptor $\beta\gamma$ y actuar como agonista para mediar en la transducción de señales de IL-15.

[00122] En formas de realización particulares, los complejos de IL-15/IL-15R α se acoplan previamente antes de su uso en los métodos descritos en este documento (por ejemplo, antes de poner en contacto las células con los complejos de IL-15/IL-15R α o antes de administrar los complejos IL-15/IL-15R α a un sujeto). En otras formas de realización, los complejos IL-15/IL-15R α no se acoplan previamente antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento.

[00123] En una forma de realización específica, un complejo de IL-15/IL-15R α potencia o induce la función inmune en un sujeto en al menos un 99%, al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% en relación con la función inmune en un sujeto al que no se le administró el complejo IL-15/IL-15R α utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISPOT, ELISA y ensayos de proliferación celular. En una forma de realización específica, la función inmune es la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón-gamma, IL-2, IL-5, IL-10, IL-12 o factor de crecimiento transformante (TGF) β). En una forma de realización, la función inmunitaria mediada por IL-15 es la

proliferación de células NK, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (por ejemplo, CD56). En otra forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la producción de anticuerpos, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante ELISA. En algunas formas de realización, la función inmunitaria mediada por IL-15 es la función efectora, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad u otros ensayos bien conocidos en la técnica.

[00124] En formas de realización específicas, ejemplos de función inmune mejorada por el complejo IL-15/IL-15R α incluyen la proliferación/expansión de linfocitos (por ejemplo, aumento en el número de linfocitos), inhibición de la apoptosis de linfocitos, activación de células dendríticas (o células presentadoras de antígenos) y presentación de antígenos. En formas de realización particulares, una función inmune mejorada por el complejo IL-15/IL-15R α es la proliferación/expansión en el número o activación de células T CD4 + (por ejemplo, células T colaboradoras Th1 y Th2), células T CD8 + (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes en el tumor, células T CD122 + o células asesinas naturales (células NK). En una forma de realización, el complejo IL-15/IL-15R α potencia la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos. En algunas formas de realización, un complejo IL-15/IL-15R α aumenta el número de células T CD4 + (por ejemplo, células T colaboradoras Th1 y Th2), células T CD8 + (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes tumorales, células T CD122 + o células asesinas naturales (células NK) en aproximadamente 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o un control más relativo negativo (por ejemplo, número de las células respectivas no tratadas, cultivadas o puestas en contacto con un complejo IL-15/IL-15R α).

[00125] En una forma de realización específica, el complejo IL-15/IL-15R α aumenta la expresión de IL-2 en sangre completa activada por enterotoxina B estafilocócica (SEB). Por ejemplo, el complejo IL-15/IL-15R α aumenta la expresión de IL-2 en al menos

aproximadamente 2, 3, 4 o 5 veces, en comparación con la expresión de IL-2 cuando se utiliza SEB sola.

[00126] *Producción del complejo IL-15/IL-15R α*

[00127] Los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15R α pueden insertarse en constructos de ácidos nucleicos para su expresión en células de mamíferos, bacterias, levaduras y virus. IL-15 e IL-15R α pueden expresarse de forma recombinante a partir del mismo constructo de ácido nucleico (por ejemplo, utilizando un constructo de ácido nucleico bicistrónico) o de diferentes constructos de ácido nucleico (por ejemplo, utilizando constructos de ácido nucleico monocistrónico). En una forma de realización, IL-15 e IL-15R α pueden expresarse de manera recombinante a partir de un único constructo de ácido nucleico que comprende un único marco de lectura abierto (ORF) de IL-15 e IL-15R α .

[00128] Los constructos de ácido nucleico pueden comprender uno o más elementos reguladores de la transcripción unidos operativamente a la secuencia codificante de IL-15 y/o IL-15R α . Los elementos reguladores de la transcripción se encuentran típicamente en 5' con respecto a la secuencia codificante y dirigen la transcripción de los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15R α . En algunas formas de realización, uno o más de los elementos reguladores de la transcripción que se encuentran en la naturaleza para regular la transcripción del gen IL-15 nativo y/o IL-15R α nativo se utilizan para controlar la transcripción. En otras formas de realización, uno o más elementos reguladores de la transcripción que son heterólogos del gen de IL-15 nativo y/o IL-15R α nativo se utilizan para controlar la transcripción. Se puede utilizar cualquier elemento o elementos reguladores de la transcripción conocidos por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los tipos de elementos reguladores de la transcripción incluyen un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido y un promotor inducible. En una forma de realización específica, la transcripción está controlada, al menos en parte, por un elemento o elementos reguladores de la transcripción de mamífero (en algunas formas de realización, humano). En una forma de realización específica, la transcripción está controlada, al menos en parte, por un promotor fuerte, por ejemplo, CMV. En otros aspectos, se puede utilizar un promotor inducible.

[00129] Los constructos de ácido nucleico también pueden comprender uno o más elementos reguladores postranscripcionales unidos operativamente a la secuencia codificante de IL-15 y/o IL-15R α . Los elementos reguladores postranscripcionales pueden estar en 5' y/o 3' con respecto a la secuencia codificante y dirigir la regulación postranscripcional de la traducción de los transcritos de ARN que codifican IL-15 y/o IL-15R α .

[00130] En otro aspecto, el constructo de ácido nucleico puede ser un vector de direccionamiento génico que reemplaza la región reguladora existente de un gen con una secuencia reguladora aislada de un gen diferente o una secuencia reguladora nueva como se describe, por ejemplo, en las publicaciones internacionales N° WO1994/12650 y WO2001/68882. En determinadas formas de realización, una célula huésped puede modificarse por ingeniería genética para aumentar la producción de IL-15 y/o IL-15R α endógenos, por ejemplo, alterando la región reguladora de los genes de IL-15 y/o IL-15R α endógenos.

[00131] El constructo de ácido nucleico elegido dependerá de una variedad de factores, que incluyen, sin limitación, la fuerza de los elementos reguladores de la transcripción y la célula huésped que se utilizará para expresar IL-15 y/o IL-15R α . Los constructos de ácido nucleico pueden ser un plásmido, fagémido, cósmido, vector viral, fago, cromosoma artificial y similares. En un aspecto, los vectores pueden ser vectores de integración episomal o no homóloga, que pueden introducirse en las células huésped apropiadas por cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, etc.) para transformarlas.

[00132] Los constructos de ácido nucleico pueden ser un plásmido o un vector de integración estable para la expresión transitoria o estable de IL-15 y/o IL-15R α en células huésped. Para una expresión estable, el vector puede mediar la integración cromosómica en un sitio objetivo o un sitio cromosómico aleatorio. Los ejemplos no limitantes de sistemas de vectores de células huésped que se pueden utilizar para expresar IL-15 y/o IL-15R α incluyen sistemas de células de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, retrovirus, lentivirus, etc.); sistemas de células de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido o ADN cósmido; y líneas celulares estables generadas por transformación utilizando un marcador seleccionable. En algunas formas de realización, los constructos de ácido nucleico incluyen un gen marcador seleccionable que incluye, pero no se limita a, neomicina (neo), dihidrofolato reductasa (dhfr) e higromicina (hyg).

[00133] Las constructos de ácido nucleico pueden ser monocistrónicos o multicistrónicos. Un constructo de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o en el intervalo de 2-5, 5-10 o 10-20 genes/secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico bicistrónico puede comprender en el siguiente orden

un promotor, un primer gen (por ejemplo, IL-15) y un segundo gen y (por ejemplo, IL-15R α). En un constructo de ácido nucleico de este tipo, la transcripción de ambos genes es impulsada por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen se realiza mediante un mecanismo de escaneo dependiente de cap y la traducción del mRNA del segundo gen se realiza mediante un mecanismo independiente de cap, por ejemplo, por un IRES.

[00134] Las técnicas para practicar estos aspectos emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y manipulación y producción de ADN recombinante, que son practicadas rutinariamente por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition; DNA Cloning, Volumes I and II (Glover, Ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, Ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames & Higgins, Eds. 1984); *Transcription and Translation* (Hames & Higgins, Eds. 1984); *Animal Cell Culture* (Freshney, Ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos, Eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology*, Volumes 154 and 155 (Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente), (Mayer & Walker, Eds., 1987); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London, Scopes, 1987), *Expression of Proteins in Mammalian Cells Using Vaccinia Viral Vectors in Current Protocols in Molecular Biology*, Volume 2 (Ausubel *et al.*, Eds., 1991).

[00135] En una forma de realización específica, los constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 o IL-15R α pueden cotransfectarse o transfectarse en las mismas células huésped o en diferentes células huésped. Opcionalmente, un constructo de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican un gen marcador seleccionable también se puede transfectar en las mismas células para seleccionar células transfectadas. Si los constructos de ácido nucleico que comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15R α se transfectan en diferentes células, IL-15 e IL-15R α expresados por las diferentes células pueden aislarse y ponerse en contacto entre sí en condiciones adecuadas para formar los complejos IL-15/IL-15R α descritos anteriormente. Se puede utilizar cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para transfectar o transducir células huésped con ácidos nucleicos que incluyen, por ejemplo, transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa e infección con virus. incluyendo pero no limitado a adenovirus, lentivirus y retrovirus.

[00136] Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de polipéptidos de IL-15 e IL-15R α recombinantes, se pueden generar líneas celulares estables. Por ejemplo, las líneas celulares se pueden transformar utilizando los constructos de ácido nucleico descritos en el presente documento que pueden contener un gen marcador seleccionable en el mismo o en un constructo de ácido nucleico separado. El gen marcador seleccionable se puede introducir en la misma célula mediante cotransfección. Después de la introducción del vector, las células se dejan crecer durante 1–2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo para permitir el crecimiento y la recuperación de las células que expresan con éxito los ácidos nucleicos introducidos. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos bien conocidas en la técnica que son apropiadas para el tipo de célula. En una forma de realización particular, la línea celular se ha adaptado para crecer en medio sin suero. En una forma de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en medio libre de suero en matraces agitadores. En una forma de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en matraces rotatorios o con agitación. En determinadas formas de realización, la línea celular se cultiva en suspensión. En formas de realización particulares, la línea celular no es adherente o se ha adaptado para crecer como células no adherentes. En determinadas formas de realización, la línea celular se ha adaptado para crecer en condiciones de bajo contenido de calcio. En algunas formas de realización, la línea celular se cultiva o se adapta para crecer en medio con bajo contenido de suero.

[00137] En una forma de realización específica, un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención es mediante el uso de amplificación de dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR, mediante el uso de aumento sucesivo niveles de metotrexato como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.889.803. El polipéptido obtenido de tales células puede estar en forma glicosilada.

[00138] En una forma de realización, las líneas celulares se diseñan para expresar el heterodímero estable de IL-15 humana nativa e IL-15R α humana soluble nativa, que luego pueden purificarse y administrarse a un ser humano. En una forma de realización, la estabilidad del heterodímero IL-15/IL-15R α aumenta cuando se produce a partir de líneas celulares que expresan de manera recombinante tanto IL-15 como IL-15R α .

[00139] En una forma de realización específica, la célula huésped expresa de forma recombinante IL-15 y el IL-15R α de longitud completa. En otra forma de realización

específica, la célula huésped expresa de manera recombinante IL-15 y la forma soluble de IL-15R α . En otra forma de realización específica, la célula huésped expresa de manera recombinante IL-15 y una forma unida a la membrana de IL-15R α que no se escinde de la superficie de la célula y permanece asociada a la célula. En algunas formas de realización, la célula huésped que expresa de forma recombinante IL-15 y/o IL-15R α (forma completa o soluble) también expresa de forma recombinante otro polipéptido (por ejemplo, una citoquina o un fragmento de la misma).

[00140] En determinadas formas de realización, dicha célula huésped expresa de forma recombinante un polipéptido de IL-15 además de un polipéptido de IL-15R α . Los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15R α se pueden utilizar para generar células de mamíferos que expresan de manera recombinante IL-15 e IL-15R α en altas cantidades para el aislamiento y purificación de IL-15 e IL-15R α , de modo preferente la IL-15 y el IL-15R α están asociados como complejos. En una forma de realización, altas cantidades de complejos IL-15/IL-15R α se refieren a cantidades de complejos IL-15/IL-15R α expresados por células que son al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o más de 20 veces más altas que las cantidades de complejos IL-15/IL-15R α que se expresan endógenamente por células de control (por ejemplo, células que no se han diseñado genéticamente para expresan de forma recombinante IL-15, IL-15R α , o IL-15 e IL-15R α , o células que comprenden un vector vacío). En algunas formas de realización, una célula huésped descrita en el presente documento expresa aproximadamente 0,1 pg a 25 pg, 0,1 pg a 20 pg, 0,1 pg a 15 pg, 0,1 pg a 10 pg, 0,1 pg a 5 pg, 0,1 pg a 2 pg, 2 pg a 10 pg, o 5 a 20 pg de IL-15 medido mediante una técnica conocida por un experto en la técnica (por ejemplo, un ELISA). En ciertas formas de realización, una célula huésped descrita en el presente documento expresa aproximadamente 0,1 a 0,25 pg por día, 0,25 a 0,5 pg por día, 0,5 a 1 pg por día, 1 a 2 pg por día, 2 a 5 pg por día o 5 a 10 pg por día de IL-15 medido mediante una técnica conocida por un experto en la técnica (por ejemplo, un ELISA). En una forma de realización específica, IL-15R α es la forma soluble de IL-15R α . En una forma de realización específica, IL-15R α es la forma soluble de IL-15R α asociado con IL-15 en un heterodímero estable, que aumenta los rendimientos y simplifica la producción y purificación del heterodímero bioactivo IL-15/citoquina IL-15R α soluble.

[00141] La IL-15 e IL-15R α recombinantes se pueden purificar utilizando métodos de producción y purificación de proteínas recombinantes que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la Publicación Internacional N° WO 2007/070488. Brevemente, el

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

[00142] En algunas formas de realización, IL-15 e IL-15R α se sintetizan o expresan de manera recombinante por diferentes células y posteriormente se aíslan y combinan para formar un complejo IL-15/IL-15R α , *in vitro*, antes de la administración a un sujeto. En otras formas de realización, IL-15 e IL-15R α se sintetizan o expresan de forma recombinante por diferentes células y posteriormente se aíslan y administran simultáneamente a un sujeto un complejo de IL-15/IL-15R α *in situ* o *in vivo*. En incluso otras formas de realización, IL-15 e IL-15R α se sintetizan o expresan juntas por la misma célula, y se aísla el complejo IL-15/IL-15R α formado.

[00143] Las células huésped elegidas para la expresión de ácidos nucleicos dependerán del uso pretendido de las células. Factores tales como si una célula se glicosila de manera similar a las células que expresan endógenamente, por ejemplo, IL-15 y/o IL-15R α , pueden considerarse al seleccionar las células huésped.

[00144] Los ejemplos no limitantes de células huésped que se pueden utilizar para expresar la proteína o proteínas codificadas por los constructos de ácido nucleico de la presente incluyen células de mamífero, células bacterianas, células de levadura, células primarias, células inmortalizadas, células vegetales y células de insectos. En una forma de realización específica, las células huésped son una línea celular de mamífero. Ejemplos de líneas de células de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, COS, CHO, HeLa, NIH3T3, HepG2, MCF7, HEK 293, HEK 293T, RD, PC12, hibridomas, células pre-B, 293, 293H, K562, SkBr3, BT474, A204, M07Sb, TF β 1, Raji, Jurkat, MOLT-4, CTLL-2, MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SY5Y, C127, N0, y células BE (2)-C. En la técnica se conocen otras líneas de células de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

[00145] *Célula CHO*

[00146] Las células de ovario de hámster chino (CHO) se utilizan más comúnmente para la producción de polipéptidos glicosilados para uso terapéutico. Estas células producen un perfil de glicosilación definido y permiten la creación de líneas celulares genéticamente estables y de alta productividad. Además, las células CHO se pueden cultivar a alta densidad celular en medios sin suero para desarrollar procesos biológicos seguros y reproducibles. Un problema importante que se encuentra cuando se utilizan células CHO como células huésped para la expresión recombinante es la degradación proteolítica del polipéptido de interés expresado y secretado en el medio de cultivo celular, también denominado "escisión" ("*clipping*").

[00147] En algunas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se produce por una línea celular CHO que se ha alterado para deteriorar la función de matriptasa, por ejemplo reduciendo o eliminando la expresión funcional del gen de la matriptasa, disminuyendo significativamente la degradación proteolítica ("escisión") de un polipéptido recombinante de interés que se expresa y secreta por dicha célula en el medio de cultivo celular. Por tanto, la alteración del efecto de la matriptasa en dicha célula reduce la escisión del complejo IL-15/IL-15R α recombinante secretado, en comparación con una célula de vertebrado correspondiente en la que el efecto de la matriptasa no está alterado. Con la matriptasa, se identificó una proteasa clave responsable de la escisión de polipéptidos secretados y expresados de forma recombinante. La alteración de la célula de vertebrado para alterar el efecto de la matriptasa permite mejorar significativamente la producción recombinante de un polipéptido de interés reduciendo o eliminando la escisión del polipéptido de interés expresado y secretado recombinantemente en el medio de cultivo celular. De ese modo, aumenta el rendimiento del complejo IL-15/IL-15R α .

[00148] En las células CHO, se ha informado que la enzima responsable de producir extensiones NANA unidas a alfa(2-6) a estructuras de glicanos centrales (beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1) es inactiva o no se expresa en células CHO (véase, por ejemplo, Chung et al 2017), aunque el gen de la enzima en sí está presente en *C. griseus*. Sin embargo, se descubrió inesperadamente que el complejo IL-15/IL-15R α producido por células CHO de la presente divulgación tiene patrones de glicosilación diferentes en comparación con el complejo IL-15/IL-15R α producido por líneas celulares humanas. Además, se observó el glicano de tipo de enlace alfa(2-6) en el complejo IL-15/IL-15R α producido por células CHO. Este patrón de glicosilación es único. Potencialmente, puede proporcionar beneficios

directos en comparación con el patrón CHO esperado al estar más cerca de las formas de glicosilación humana. Los detalles de la línea celular CHO se pueden encontrar en el documento WO2015/166427, que se incorpora en el presente documento como referencia.

[00149] *Composición Farmacéutica*

[00150] En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden un complejo IL-15/IL-15R α . Las composiciones incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que se pueden utilizar en la preparación de formas de dosificación unitarias. Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) comprenden una cantidad eficaz de un complejo IL-15/IL-15R α , o una combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y un portador farmacéuticamente aceptable. En formas de realización específicas, las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) comprenden una cantidad eficaz de uno o más complejos de IL-15/IL-15R α y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición comprende además un agente terapéutico adicional, por ejemplo, agente anticanceroso, agente antivírico, agente antiinflamatorio, adyuvante. A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de tales agentes terapéuticos.

[00151] En una forma de realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto) o, de modo más preferente, adyuvante MF59C.1), excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En una forma de realización, el agua es un portador cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol,

propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

[00152] Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de cualquier manera convencional utilizando uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización específica, un complejo de IL-15/IL-15R α administrado a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en este documento se administra como una composición farmacéutica.

[00153] Generalmente, los componentes de las composiciones farmacéuticas que comprenden un complejo de IL-15/IL-15R α se suministran en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando el complejo IL-15/IL-15R α se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica (por ejemplo, PBS). Cuando el complejo IL-15/IL-15R α se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

[00154] En algunas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α puede formularse para su administración mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intratumoral o intramuscular). En una forma de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se formula para administración parenteral local o sistémica, por ejemplo, administración intratumoral. En una forma de realización específica, el complejo IL-15/IL-15R α se formula para administración subcutánea o intravenosa, respectivamente. En una forma de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se formula en una solución farmacéuticamente compatible.

[00155] El complejo IL-15/IL-15R α se puede formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en

vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[00156] *Tratamiento y régimen de dosis*

[00157] En un aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos para potenciar la función inmunitaria mediada por IL-15, que comprenden administrar a los sujetos complejos IL-15/IL-15R α en un régimen de dosis específico. Dado que la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de ciertos trastornos, en el presente documento se proporcionan métodos para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de tales trastornos que comprenden la administración a un sujeto que lo necesite complejos IL-15/IL-15R α . Los ejemplos no limitantes de trastornos en los que es beneficioso potenciar la función inmunitaria mediada por IL-15 incluyen cáncer, linfopenia, inmunodeficiencias, enfermedades infecciosas y heridas.

[00158] En una forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, en el que la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de dichos trastornos, comprendiendo el método administrar la misma dosis de un complejo IL-15/IL-15R α a un sujeto durante la duración del ciclo de tratamiento. En una forma de realización, la dosis se encuentra en el intervalo de 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y 0,5 $\mu\text{g/kg}$. En una forma de realización, la dosis se encuentra en el intervalo de 0,25 $\mu\text{g/kg}$ y 1 $\mu\text{g/kg}$. En una forma de realización específica, la dosis se encuentra en el intervalo de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ y 2 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis se encuentra entre 1 $\mu\text{g/kg}$ y 4 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis se encuentra entre 2 $\mu\text{g/kg}$ y 8 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis es 0,1 $\mu\text{g/kg}$, 0,25 $\mu\text{g/kg}$, 0,5 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$, 2 $\mu\text{g/kg}$, 4 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$, 6 $\mu\text{g/kg}$, 8 $\mu\text{g/kg}$. En una forma de realización específica, la dosis es de 1 $\mu\text{g/kg}$. En determinadas formas de realización, la dosis se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 2 a 4, 2 a 5, 2 a 6, 3 a 6, 4 a 6, 6 a 8, 5 a 8 o 5 a 10 veces. En algunas formas de realización, la dosis se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 2 a 4, 2 a 5, 1 a 5, 2 a 6, 3 a 6, 4 a 6 o 6 a 8 veces durante un período de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o 14 a 21 días de tiempo. En formas de realización específicas, cada dosis se administra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más veces durante un período de tiempo de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o 14 a 21 días. En otra forma de realización

específica, cada dosis se administra al menos una vez y al sujeto se le administra una dosis una vez por semana durante un período de tres semanas.

[00159] En otra forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, en donde la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, tratamiento y/o manejo de tales trastornos, comprendiendo el método administrar un complejo de IL-15/IL-15R α al sujeto en un régimen de dosificación al menos una, dos, cuatro o seis veces en un ciclo de dosificación antes de un período de no administración. En una forma de realización específica, el complejo IL-15/IL-15R α se administra una vez a la semana durante tres semanas sin administración en la cuarta semana. Luego se repite el ciclo de dosificación.

[00160] En una forma de realización alternativa, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, en donde la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, tratamiento y/o manejo de tales trastornos, comprendiendo el método (a) administrar al menos una dosis baja inicial de un complejo IL-15/IL-15R α a un sujeto; y (b) administrar dosis sucesivamente mayores del complejo IL-15/IL-15R α al sujeto durante la duración del ciclo de tratamiento. En una forma de realización específica, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar el cáncer en un sujeto, método que comprende (a) administrar una dosis inicial de un complejo IL-15/IL-15R α al sujeto durante la duración de la ciclo de tratamiento; y (b) administrar dosis sucesivamente mayores del complejo IL-15/IL-15R α al sujeto durante la duración del ciclo de tratamiento. En una forma de realización específica, la dosis inicial se encuentra en el rango de 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y 0,5 $\mu\text{g/kg}$. En una forma de realización específica, la dosis inicial se encuentra en el rango de 0,25 $\mu\text{g/kg}$ y 1 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial se encuentra en el intervalo de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ y 2 $\mu\text{g/kg}$. En una forma de realización específica, la dosis inicial se encuentra entre 1 $\mu\text{g/kg}$ y 4 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial se encuentra entre 2 $\mu\text{g/kg}$ y 8 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial es de aproximadamente 0,25 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial es de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$. En otra forma de realización, la dosis inicial es de 0,1 $\mu\text{g/kg}$, 0,25 $\mu\text{g/kg}$, 0,5 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$, 2 $\mu\text{g/kg}$, 4 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$, 6 $\mu\text{g/kg}$, 8 $\mu\text{g/kg}$. En determinadas formas de realización, la dosis inicial se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 2 a 4, 2 a 5, 2 a 6, 3 a 6, 4 a 6, 6 a 8, 5 a 8 o 5 a 10 veces. En algunas formas de realización, la dosis inicial se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más

veces, o 1 a 3, 1 a 4, 2 a 4, 2 a 5, 1 a 5, 2 a 6, 3 a 6, 4 a 6 o 6 a 8 veces durante un período de tiempo de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o 14 a 21 días. En ciertas formas de realización, cada dosis sucesivamente más alta es 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 o 6 veces mayor que la dosis anterior, o 1,2 a 2, 2 a 3, 2 a 4, 1 a 5, 2 a 6, 3 a 4, 3 a 6 o 4 a 6 veces mayor que la dosis anterior, o 2 veces mayor que la dosis anterior. En algunas formas de realización, cada dosis sucesivamente más alta es 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175 %, 180%, 185%, 190%, 195% o 200% más alto que la dosis anterior. En formas de realización específicas, cada dosis se administra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más veces durante un período de tiempo de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o 14 a 21 días. En otra forma de realización específica, cada dosis se administra al menos una vez y al sujeto se le administra una dosis tres veces por semana de 7 días (por ejemplo, lunes, miércoles y viernes) durante un período de dos semanas.

[00161] En determinadas formas de realización, se monitoriza al sujeto para detectar los siguientes eventos adversos, como trombocitopenia de grado 3 o 4, granulocitopenia de grado 3 o 4, leucocitosis de grado 3 o 4 (glóbulos blancos (WBC) $> 100.000 \text{ mm}^3$), grado 3 o 4 disminuciones en WBC, recuento absoluto de linfocitos (ALC) y/o recuento absoluto de neutrófilos (ANC), linfocitosis y disfunción orgánica (por ejemplo, disfunción hepática o renal). En ciertas formas de realización, la dosis no aumenta y la dosis puede permanecer igual, detenerse o reducirse si el sujeto experimenta eventos adversos, como trombocitopenia de grado 3 o 4, granulocitopenia de grado 3 o 4, grado 3 o leucocitosis (glóbulos blancos $> 100.000 \text{ mm}^3$), disminución de grado 3 o 4 en WBC, recuento absoluto de linfocitos (ALC) y/o recuento absoluto de neutrófilos (ANC), linfocitosis y disfunción orgánica (por ejemplo, disfunción hepática o renal). De acuerdo con estas formas de realización, la dosis del complejo IL-15/IL-15R α administrada al sujeto puede reducirse o permanecer igual hasta que los eventos adversos disminuyan o desaparezcan.

[00162] En otra forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, en donde la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de tales trastornos, el método comprende administrar un complejo de IL-15/IL-15R α al sujeto humano en un régimen de dosis que comienza con un primer ciclo que comprende una dosis inicial de entre 0,25 $\mu\text{g/kg}$ y 4 $\mu\text{g/kg}$, y ciclos secuenciales en los que se aumenta la

dosis dos o tres veces más que la dosis anterior. Cada dosis se administra al menos una, dos, cuatro o seis veces antes de elevar la dosis al siguiente nivel y la concentración de IL-15 libre en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) obtenida del sujeto durante un cierto período de tiempo después de la administración de una dosis del complejo IL-15/IL-15R α (por ejemplo, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas, aproximadamente 36 horas a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 48 horas a 60 horas después de la administración de una dosis del complejo IL-15/IL-15R α y antes de la administración de otra dosis del complejo IL-15/IL-15R α) se controla antes de elevar la dosis al siguiente nivel.

[00163] En otra forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, en donde la mejora de la función inmune mediada por IL-15 es beneficiosa para la prevención, tratamiento y/o manejo de tales trastornos, comprendiendo el método administrar un complejo de IL-15/IL-15R α al sujeto en un régimen de dosis en las siguientes dosis secuenciales: (i) 0,25 $\mu\text{g/kg}$; (ii) 0,5 $\mu\text{g/kg}$; (iii) 1 $\mu\text{g/kg}$; (iv) 2 $\mu\text{g/kg}$; (v) 4 $\mu\text{g/kg}$; y (vi) 8 $\mu\text{g/kg}$. En una determinada forma de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se administra al sujeto en un régimen de dosis en las siguientes dosis secuenciales: (i) 1 $\mu\text{g/kg}$; (ii) 2 $\mu\text{g/kg}$; (iii) 4 $\mu\text{g/kg}$; y (iv) 8 $\mu\text{g/kg}$. Cada dosis se administra al menos una, dos, cuatro o seis veces en un ciclo de dosificación antes de elevar la dosis al siguiente nivel, y en donde la concentración de IL-15 libre en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) obtenida del sujeto un cierto período de tiempo después de la administración de una dosis del complejo IL-15/IL-15R α (por ejemplo, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas, aproximadamente 36 horas a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 48 horas a 60 horas después de la administración de una dosis del complejo IL-15/IL-15R α y antes de la administración de otra dosis del complejo IL-15/IL-15R α) se monitorea antes de elevar la dosis al siguiente nivel.

[00164] En otra forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un sujeto, método que comprende administrar un complejo IL-15/IL-15R α al sujeto en un régimen de dosis en las siguientes dosis secuenciales: (i) 1 $\mu\text{g/kg}$; (ii) 2 $\mu\text{g/kg}$; (iii) 4 $\mu\text{g/kg}$; y (iv) 8 $\mu\text{g/kg}$, en donde cada dosis se administra al menos una, dos, cuatro o seis veces en un ciclo de dosificación antes de

elevar la dosis al siguiente nivel. En una forma de realización específica, el método comprende administrar el complejo IL-15/IL-15Ra al sujeto utilizando un régimen de administración cíclica, en donde el régimen de administración cíclica comprende: (a) administrar por vía subcutánea al sujeto una dosis de 0,1 a 10 µg/kg del complejo IL-15/IL-15Ra cada 1, 2 o 3 días durante un primer período de 1 a 3 semanas; y (b) después de un segundo período de 1 semana a 2 meses en el que no se administra al sujeto el complejo IL-15/IL-15Ra, administrando al sujeto por vía subcutánea una dosis de 0,1 a 10 µg/kg del complejo IL-15/IL-15Ra cada 1, 2 o 3 días durante un tercer período de 1 a 3 semanas.

[00165] En una forma de realización particular, el sujeto es un sujeto humano. En ciertas formas de realización, la dosis en el ciclo de tratamiento se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 5, 1 a 6, 2 a 6, 1 a 6, 3 a 6, 4 a 6, 6 a 8, 5 a 8 o 5 a 10 veces. En algunas formas de realización, la dosis se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 5, 2 a 6, 1 a 6, 3 a 6, 4 a 6 o 6 a 8 veces durante un período de tiempo de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o 14 a 21 días. En ciertas formas de realización, cada dosis se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 5, 1 a 6, 2 a 6, 1 a 6, 3 a 6, 4 a 6, 6 a 8, 5 a 8 o 5 a 10 veces, por ciclo de dosificación. En formas de realización específicas, cada dosis se administra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más veces, o 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 5, 1 a 6, 2 a 6, 1 a 6, 3 a 6, 4 a 6, 6 a 8, 5 a 8 o 5 a 10 veces durante un período de tiempo de 5 a 7 días, 5 a 10 días, 7 a 12 días, 7 a 14 días, 7 a 21 días o de 14 a 21 días.

[00166] En otra forma de realización específica, al sujeto se le administra una dosis tres veces por semana de 7 días (por ejemplo, lunes, miércoles y viernes). En determinadas formas de realización, se monitoriza al sujeto para detectar los siguientes eventos adversos, como trombocitopenia de grado 3 o 4, granulocitopenia de grado 3 o 4, leucocitosis de grado 3 o 4 (glóbulos blancos (WBC) > 100.000 mm³), disminución de grado 3 o 4 en WBC, recuento absoluto de linfocitos (ALC) y/o recuento absoluto de neutrófilos (ANC), linfocitosis y disfunción orgánica (por ejemplo, disfunción hepática o renal). En ciertas formas de realización, la dosis no aumenta y la dosis puede permanecer igual, detenerse o reducirse si el sujeto experimenta eventos adversos, como trombocitopenia de grado 3 o 4, granulocitopenia de grado 3 o 4, grado 3 o leucocitosis (glóbulos blancos > 100.000 mm³), disminución de grado 3 o 4 en WBC, recuento absoluto de linfocitos (ALC) y/o recuento absoluto de neutrófilos (ANC), linfocitosis y disfunción orgánica (por ejemplo, disfunción hepática o renal). De acuerdo con estas formas de realización, la dosis del complejo IL-15/IL-15Ra

administrada al sujeto puede reducirse o permanecer igual hasta que los eventos adversos disminuyan o desaparezcan.

[00167] En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, cada dosis se administra una vez a la semana durante tres semanas. En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en este documento, cada dosis se administra una vez, tres veces por semana durante dos semanas. En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en este documento, cada dosis se administra una vez, tres veces por semana durante dos, tres o cuatro semanas. En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, cada dosis se administra una vez, seis veces por semana durante dos, tres o cuatro semanas. En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en este documento, cada dosis se administra una vez, cada dos días, durante dos, tres o cuatro semanas. En formas de realización específicas, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, cada dosis se administra una vez, todos los días, durante dos, tres o cuatro semanas.

[00168] En determinadas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se administra por vía subcutánea a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se administra por vía intravenosa o intramuscular a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en este documento. En determinadas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se administra por vía intratumoral a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, el complejo IL-15/IL-15R α se administra localmente a un sitio (por ejemplo, un sitio de infección) en un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

[00169] En ciertas formas de realización, una muestra obtenida de un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en este documento es una muestra de sangre. En una forma de realización específica, la muestra es una muestra de plasma. Los niveles plasmáticos basales de IL-15 son aproximadamente 1 pg/ml en seres humanos, aproximadamente 8–10 pg/ml en monos (como macacos) y aproximadamente 12 pg/m en roedores (como ratones). Se pueden utilizar técnicas conocidas por un experto en la técnica para obtener una muestra de un sujeto.

[00170] En formas de realización específicas, los ejemplos de función inmune mejorada por los métodos descritos en este documento incluyen la proliferación/expansión de linfocitos (por ejemplo, aumento en el número de linfocitos), inhibición de la apoptosis de linfocitos, activación de células dendríticas (o células presentadoras de antígenos) y

presentación de antígenos. En formas de realización particulares, una función inmune mejorada por los métodos descritos en este documento es la proliferación/expansión en el número o activación de células T CD4 + (por ejemplo, células T colaboradoras Th1 y Th2), células T CD8 + (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes en el tumor, células T CD122 + o células asesinas naturales (células NK). En una forma de realización, los métodos descritos en este documento mejoran la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos. En algunas formas de realización, los métodos descritos en este documento aumentan el número de células T CD4 + (por ejemplo, células T colaboradora Th1 y Th2), células T CD8 + (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta y células T gamma/delta), células B (por ejemplo, células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes en tumores, células T CD122 +, o células asesinas naturales (células NK) en aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces o más en relación con un control negativo.

[00171] En una forma de realización específica, los métodos descritos en el presente documento mejoran o inducen la función inmune en un sujeto en al menos 0,2 veces, 0,5 veces, 0,75 veces, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces 9 veces, o al menos 10 veces con respecto a la función inmune en un sujeto al que no se le administra la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISPOT, ELISA y ensayos de proliferación celular. En una forma de realización específica, los métodos descritos en este documento mejoran o inducen la función inmune en un sujeto en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20% o al menos 10% en relación con la función inmune en un sujeto al que no se le administró la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ELISPOT, ELISA y ensayos de proliferación celular. En una forma de realización específica, la función inmune es la liberación de citocinas (por ejemplo,

interferón- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-12 o factor de crecimiento transformante (TGF) – beta). En una forma de realización, la función inmunitaria mediada por IL-15 es la proliferación de células NK, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (por ejemplo, CD56). En una forma de realización, la función inmunitaria mediada por IL-15 es la proliferación de células T CD8 +, que puede ensayarse, por ejemplo, por flujo. En otra forma de realización, la función inmune mediada por IL-15 es la producción de anticuerpos, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante ELISA. En algunas formas de realización, la función inmunitaria mediada por IL-15 es la función efectora, que puede ensayarse, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad u otros ensayos bien conocidos en la técnica. El efecto de una o más dosis de una combinación de un complejo de IL-15/IL-15 α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 sobre los recuentos de linfocitos de sangre periférica se puede controlar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica. Los recuentos de linfocitos de sangre periférica en un mamífero se pueden determinar, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre periférica de dicho mamífero, separando los linfocitos de otros componentes de la sangre periférica como el plasma utilizando, por ejemplo, centrifugación en gradiente FicollHypaque (Pharmacia), y contando la cantidad de linfocitos con azul tripán. Los recuentos de células T en sangre periférica en mamíferos se pueden determinar, por ejemplo, separando los linfocitos de otros componentes de la sangre periférica como el plasma utilizando, por ejemplo, un uso de centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque (Pharmacia), marcando las células T con un anticuerpo dirigido a un antígeno de células T como CD3, CD4 y CD8 que está conjugado con FITC o ficoeritrina, y midiendo el número de células T mediante FACS. Además, el efecto sobre un subconjunto particular de células T (por ejemplo, CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺RO⁺, CD8⁺RO⁺, CD4⁺RA⁺, o CD8⁺RA⁺) o células NK se puede determinar utilizando técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica como FACS.

[00172] Los niveles plasmáticos de IL-15 y/o PD-1 se pueden evaluar utilizando técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener plasma a partir de una muestra de sangre obtenida de un sujeto y los niveles de IL-15 y/o PD-1 en el plasma se pueden medir mediante ELISA.

[00173] *Terapia de Combinación*

[00174] La presente divulgación también proporciona otras terapias que se pueden utilizar en combinación con IL-15/IL-15 α . En un aspecto, en el presente documento se

proporcionan métodos para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 o una composición que comprende un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto que lo necesite. Como se utiliza en este documento, el término "cáncer" pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasión. En una forma de realización específica, el complejo IL-15/IL-15R α se administra por vía subcutánea a la misma dosis repetida o alternativamente en un régimen de aumento de dosis. En una forma de realización específica, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra como una infusión intravenosa en un régimen de dosificación plana.

[00175] En formas de realización específicas, la administración de una combinación de un complejo de IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento logra uno, dos o tres o más resultados: (1) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (2) una reducción en la formación de un tumor; (3) una erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (4) una reducción en la diseminación metastásica; (5) una reducción de la mortalidad; (6) un aumento en la tasa de supervivencia; (7) un aumento en la duración de la supervivencia; (8) un aumento en el número de pacientes en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalización; (10) una disminución en la duración de las hospitalizaciones; y (11) el mantenimiento del tamaño del tumor para que no aumente en más del 10%, ni en más del 8%, ni en más del 6%, ni en más del 4%; de modo preferente, el tamaño del tumor no aumenta en más del 2%.

[00176] En una forma de realización específica, la administración de una combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, un modelo animal de cáncer) de acuerdo con los métodos descritos en este documento inhibe o reduce el crecimiento de un tumor en al menos 2 veces, de modo preferente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces en relación con el crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, en el mismo modelo animal para el cáncer) administrado un control negativo medido utilizando ensayos bien conocidos en la técnica. En otra forma de realización, la administración de una combinación de un complejo

IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, un modelo animal para cáncer) de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento inhibe o reduce el crecimiento de un tumor en al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% en relación con el crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas formas de realización, en el mismo modelo animal para el cáncer) administraron un control negativo, o un complejo IL-15/IL-15R α o una molécula de anticuerpo anti-PD-1 como agente único, medido utilizando ensayos bien conocidos en la técnica.

[00177] Los ejemplos de trastornos cancerosos incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, cánceres hematológicos, tumores de tejidos blandos y lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen malignidades, por ejemplo, sarcomas y carcinomas (incluidos adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas), de los diversos sistemas de órganos, como los que afectan al hígado, pulmón, mama, linfoides, gastrointestinal (por ejemplo, colon), tracto genitourinario (por ejemplo, células renales, uroteliales), próstata y faringe. Los adenocarcinomas incluyen tumores malignos como la mayoría de los cánceres de colon, cáncer de recto, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. Los carcinomas de células escamosas incluyen tumores malignos, por ejemplo, en el pulmón, el esófago, la piel, la región de la cabeza y el cuello, la cavidad oral, el ano y el cuello uterino. En una forma de realización, el cáncer es un melanoma, por ejemplo, un melanoma en estadio avanzado. Las lesiones metastásicas de los cánceres antes mencionados también se pueden tratar o prevenir utilizando los métodos y composiciones de la invención.

[00178] Los cánceres ejemplares cuyo crecimiento se puede inhibir utilizando la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 descritos en este documento incluyen cánceres que responden típicamente a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de

células no pequeñas). Además, las neoplasias malignas refractarias o recurrentes pueden tratarse utilizando la terapia de combinación descrita en este documento.

[00179] Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de ano, gastroesofágico, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de células de Merkel, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente que incluyen los inducidos por asbestos (por ejemplo, mesotelioma) y combinaciones de dichos cánceres.

[00180] En una forma de realización específica, el cáncer es melanoma, cáncer renal, cáncer de colon o cáncer de próstata. En otra forma de realización, el cáncer es metastásico. En otras formas de realización, el sujeto se ha tratado previamente con un inhibidor de puntos de control inmunológico (CPI), por ejemplo, anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4, y ha respondido y progresado.

[00181] La combinación de un complejo de IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse junto con una o más terapias, por ejemplo, agentes anticancerígenos, citocinas o agentes antihormonales, para tratar y/o controlar el cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes anticancerígenos se describen a continuación.

[00182] En una forma de realización, en el presente documento se proporciona un método para prevenir, tratar y/o manejar trastornos en un sujeto, por ejemplo, una condición o trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto que incluye administrar a un sujeto una molécula de anticuerpo anti-PD-1. En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra mediante inyección (por ejemplo, por vía subcutánea o

intravenosa) a una dosis (por ejemplo, una dosis plana) de aproximadamente 200 mg a 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 250 mg a 450 mg, aproximadamente 300 mg a 400 mg, aproximadamente 250 mg a 350 mg, aproximadamente 350 mg a 450 mg o aproximadamente 300 mg o aproximadamente 400 mg. El programa de dosificación (por ejemplo, un programa de dosificación plana) puede variar desde, por ejemplo, una vez a la semana a una vez cada 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 300 mg a 400 mg una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 300 mg una vez cada tres semanas. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 400 mg una vez cada cuatro semanas. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 300 mg una vez cada cuatro semanas. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 400 mg una vez cada tres semanas.

[00183] De acuerdo con los métodos descritos en este documento, el complejo IL-15/IL-15R α se puede administrar a un sujeto en una composición farmacéutica. En formas de realización específicas, el complejo IL-15/IL-15R α se administra en combinación con una o más de otras terapias, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-PD-1. La terapia de combinación incluye la administración simultánea y sucesiva de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1. Como se utiliza en este documento, se dice que el complejo IL-15/IL-15R α y la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administran simultáneamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo, simultáneamente, o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas de diferencia. Por el contrario, se dice que el complejo IL-15/IL-15R α y la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administran sucesivamente si se administran al paciente en los diferentes días, por ejemplo, el complejo IL-15/IL-15R α y la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar en un intervalo de 1 día, 2 días o 3 días. En los métodos descritos en el presente documento, la administración del complejo IL-15/IL-15R α puede preceder o seguir a la administración de la molécula de anticuerpo anti-PD-1. Cuando se administran simultáneamente, el complejo IL-15/IL-15R α y la molécula de anticuerpo anti-PD-1 pueden estar en la misma composición farmacéutica o en una composición farmacéutica diferente.

[00184] La combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 también se puede administrar junto con radioterapia que comprende, por ejemplo,

el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En formas de realización específicas, el tratamiento con radiación se administra como radiación de haz externo o teleterapia en donde la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras formas de realización, el tratamiento con radiación se administra como terapia interna o braquiterapia en la que se coloca una fuente radiactiva dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o una masa tumoral. También se pueden administrar un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 en combinación con quimioterapia. En una forma de realización, se pueden administrar un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento antes, durante o después de la radioterapia o quimioterapia. En una forma de realización, se puede administrar una combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 antes, durante o después de la cirugía.

[00185] En algunas formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a un sujeto que padece cáncer o se le ha diagnosticado cáncer. En otras formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a un sujeto predispuesto o susceptible a desarrollar cáncer.

[00186] En determinadas formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a un sujeto que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, 5 a 10 años, 10 a 15 años, 15 a 20 años, 20 a 25 años, 25 a 30 años, 30 a 35 años, 35 a 40 años, 40 a 45 años, 45 a 50 años, 50 a 55 años, 55 a 60 años, 60 a 65 años, 65 a 70 años, 70 a 75 años, 75 a 80 años, 80 a 85 años, 85 a 90 años, 90 a 95 años o 95 a 100 años. En otras formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a un adulto humano. En determinadas formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a un sujeto que se ha sometido, se someterá o se ha sometido a cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. En algunas formas de realización, la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a pacientes refractarios. En una determinada forma de realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia estándar contra el cáncer. En determinadas formas de realización, un paciente con cáncer es refractario a una terapia cuando el cáncer no se ha erradicado significativamente y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario puede realizarse *in vivo* o

in vitro mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia de un tratamiento, utilizando significados aceptados en la técnica de "refractario" en tal contexto. En varias formas de realización, un paciente con cáncer es refractario cuando un tumor canceroso no ha disminuido o aumentado.

[00187] Se utilizan otros métodos de la invención para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto una combinación como se describe en el presente documento, por ejemplo, una combinación que incluye un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1, de manera que el sujeto sea tratado por la enfermedad infecciosa.

[00188] En el tratamiento de la infección (por ejemplo, aguda y/o crónica), la administración de la combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se puede combinar con tratamientos convencionales además de o en lugar de estimular las defensas inmunitarias naturales del huésped frente a la infección. Las defensas inmunitarias naturales del huésped contra la infección incluyen, entre otras, inflamación, fiebre, defensa del huésped mediada por anticuerpos, defensas del huésped mediadas por linfocitos T, incluida la secreción de linfocinas y células T citotóxicas (especialmente durante una infección viral), lisis mediada por complemento y opsonización (fagocitosis facilitada) y fagocitosis. La capacidad de las moléculas de anticuerpo anti-PD-1 para reactivar las células T disfuncionales sería útil para tratar infecciones crónicas, en particular aquellas en las que la inmunidad mediada por células es importante para la recuperación completa.

[00189] El bloqueo de PD-1 mediado por anticuerpos puede actuar como un adyuvante para la administración del complejo IL-15/IL-15R α o en combinación con un complejo IL-15/IL-15R α y/o vacunas, para estimular la respuesta inmune a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que actualmente no existe una vacuna eficaz, o patógenos para los que las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Estos incluyen, pero no se limitan a VIH, Hepatitis (A, B y C), Influenza, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas Aeruginosa. La estimulación del sistema inmunológico por los complejos IL-15/IL-15R α y el bloqueo de PD-1 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes como el VIH que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos nuevos epítomos se reconocen

como extraños en el momento del tratamiento, provocando así una fuerte respuesta de células T que no se ve atenuada por señales negativas a través de PD-1, por ejemplo.

[00190] Otras terapias que se pueden utilizar en combinación con un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1, para la prevención, el tratamiento y/o el manejo de una enfermedad, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, linfopenia, inmunodeficiencia y heridas, incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos (incluidos péptidos cíclicos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos antisentido, triples hélices, ARNi y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Ejemplos específicos de tales terapias incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interferón), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, adrenocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenac e inhibidores de COX-2), analgésicos, antagonistas de leucotrienos (por ejemplo, montelukast, metilxantinas, zafirlukast y zileuton), beta2-agonistas (por ejemplo, albuterol, biterol, fenoterol, isoetharie, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina formoterol, salmeterol y salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, antihistaminas, agentes antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina), agentes antivirales (por ejemplo, análogos de nucleósidos (por ejemplo, zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir y AZT) y antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, eritromicina, penicilina, antramicina (AMC)).

[00191] Cualquier terapia que se sepa que es útil, o que se ha utilizado o se está utilizando actualmente para la prevención, el manejo y/o el tratamiento de una enfermedad que se ve afectada por la función/señalización de IL-15 y/o la modulación del punto de control inmunológico, se puede utilizar en combinación con una terapia de combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1. Véase, por ejemplo, Gilman *et al.*, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow,

M.D. *et al.* (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996, and Physicians' Desk Reference (66th ed. 2012) para obtener información sobre terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se han utilizado o se están utilizando actualmente para prevenir, tratar y/o controlar enfermedades o trastornos, por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, linfopenia, inmunodeficiencia y heridas.

[00192] Los ejemplos no limitantes de una o más terapias que se pueden utilizar además de una terapia de combinación de un complejo de IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluyen agentes inmunomoduladores, tales como pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos y agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen metotrexato, ciclosporina A, leflunomida, cisplatino, ifosfamida, taxanos tales como taxol y paclitaxol, inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT 11, topotecan, 9 AC y GG 211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluoruracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, citocalasina B, gramicidina D, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y homólogos de puromicina, y citoxano.

[00193] *Actividad Biológica*

[00194] En un aspecto, el complejo IL-15/IL-15R α y/o la molécula de anticuerpo anti-PD-1 aumenta una respuesta inmune que puede ser, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una respuesta inmune celular, por ejemplo, secreción de citocinas (por ejemplo, interferón-gamma), actividad auxiliar o citotoxicidad celular. En una forma de realización, el aumento de la respuesta inmune es un aumento de la secreción de citocinas, producción de anticuerpos, función efectora, proliferación de células T y/o proliferación de células NK. Varios ensayos para medir tales actividades son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA; véase, por ejemplo, en la Sección 2.1 de Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.* (eds.), John Wiley and Sons, Inc. 1997), un ensayo de "tinción de tetrámero" para identificar células T específicas de antígeno (véase Altman *et al.*, (1996), Science 274: 94-96), un ensayo de cultivo mixto de linfocitos objetivo (véase, por ejemplo, en Palladino *et al.*, (1987), Cancer Res. 47:5074-5079) y un ensayo ELISPOT que se puede utilizar para medir la liberación de

citocinas *in vitro* (véase, por ejemplo, Scheibenbogen *et al.*, (1997), *Int. J. Cancer* 71:932–936).

[00195] En algunos aspectos, la respuesta inmune inducida o mejorada por una combinación de un complejo IL–15/IL–15R α y una molécula de anticuerpo anti–PD–1 se mejora o aumenta en al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces o 12 veces en relación con una respuesta inmune provocada por un control negativo, o por un complejo IL–15/IL–15R α o una molécula de anticuerpo anti–PD–1 administrada como un solo agente, según se analiza mediante cualquier método conocido en la técnica. En ciertas formas de realización, la respuesta inmune inducida por la combinación de un complejo IL–15/IL–15R α y una molécula de anticuerpo anti–PD–1 se mejora al menos 0,5–2 veces, al menos 2–5 veces, al menos 5–10 veces, al menos 10–50 veces, al menos 50–100 veces, al menos 100–200 veces, al menos 200–300 veces, al menos 300–400 veces o al menos 400–500 veces en relación con la respuesta inmune inducida por un control negativo según se evalúa mediante cualquier método conocido en la técnica. En formas de realización específicas, el ensayo utilizado para evaluar la respuesta inmune mide el nivel de producción de anticuerpos, producción de citocinas o citotoxicidad celular, y tales ensayos son bien conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el ensayo utilizado para medir la respuesta inmune es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) que determina niveles de anticuerpos o citocinas, un ensayo ELISPOT que determina la liberación de citocinas o un ensayo de liberación de [⁵¹Cr] que determina la citotoxicidad celular.

[00196] En una forma de realización específica, la combinación de un complejo IL–15/IL–15R α y una molécula de anticuerpo anti–PD–1 aumenta la expresión de IL–2 en sangre completa activada por enterotoxina B estafilocócica (SEB). Por ejemplo, el complejo IL–15/IL–15R α y una molécula de anticuerpo anti–PD–1 aumentan la expresión de IL–2 en al menos aproximadamente 2, 3, 4 o 5 veces, en comparación con la expresión de IL–2 cuando se utiliza solo un complejo IL–15/IL–15R α , la molécula de anticuerpo anti–PD–1 o un control de isotipo (por ejemplo, IgG4). El efecto aditivo o sinérgico fue más pronunciado cuando el complejo IL–15/IL–15R α se administró el mismo día que el anticuerpo anti–PD–1, en lugar de cuando se administró el complejo IL–15/IL–15R α 72 horas después administración de la molécula de anticuerpo anti–PD–1.

[00197] En una forma de realización, la proliferación o viabilidad de las células cancerosas en contacto con una combinación de un complejo IL–15/IL–15R α y una molécula de anticuerpo anti–PD–1 se inhibe o reduce al menos 2 veces, de modo preferente al menos

2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces o al menos 10 veces en relación con la proliferación de las células cancerosas cuando se ponen en contacto con un control negativo o un complejo IL-15/IL-15R α o una molécula de anticuerpo anti-PD-1 como agente único, medido utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación celular utilizando CSFE, BrdU y la incorporación de timidina radiactiva. Alternativamente, la viabilidad celular puede medirse mediante ensayos que miden la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular, o mediante la liberación de [^{51}Cr] tras la lisis celular. En otra forma de realización, la proliferación de células cancerosas en contacto con una combinación de un complejo IL-15/IL-15R α y una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se inhibe o reduce en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos 35 %, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85 %, al menos 90% o al menos 95% en relación con las células cancerosas en contacto con un control negativo o un complejo IL-15/IL-15R α o una molécula de anticuerpo anti-PD-1 como agente único, medido utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación celular que utilizan CSFE, BrdU y la incorporación de timidina radiactiva.

[00198] Las líneas de células cancerosas en las que se pueden realizar tales ensayos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ensayos de necrosis, apoptosis y proliferación también se pueden realizar en células primarias, por ejemplo, un explante de tejido.

[00199] En una forma de realización, las células necróticas se miden por la capacidad o incapacidad de la célula para absorber un tinte tal como rojo neutro, azul tripán o azul ALAMARTM (Page *et al.*, (1993), Intl. J. of Oncology 3: 473–476). En tal ensayo, las células se incuban en un medio que contiene el tinte, las células se lavan y el tinte restante, que refleja la captación celular del tinte, se mide espectrofotométricamente. En otra forma de realización, el colorante es sulforrodamina B (SRB), cuya unión a proteínas se puede utilizar como medida de citotoxicidad (Skehan *et al.*, (1990), J. Natl Cancer Inst. 82: 1107–12). En incluso otra forma de realización, se utiliza una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamíferos mediante la detección de células vivas, pero no muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, (1983), J. Immunol. Métodos 65: 55–63).

[00200] En otras formas de realización, las células apoptóticas se miden tanto en el compartimento unido como en el "flotante" de los cultivos. Ambos compartimentos se recogen eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas y combinando ambas preparaciones tras una etapa de lavado por centrifugación (10 minutos, 2000 rpm). El protocolo para tratar cultivos de células tumorales con sulindac y compuestos relacionados para obtener una cantidad significativa de apoptosis se ha descrito en la bibliografía (véase, por ejemplo, Piazza *et al.*, (1995) Cancer Research 55: 3110–16). Las características de este método incluyen la recolección de células flotantes y adheridas, la identificación de los tiempos de tratamiento óptimos y el rango de dosis para observar la apoptosis y la identificación de las condiciones óptimas de cultivo celular. En otra forma de realización, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Ejemplos de tales ensayos, incluido TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, (1999), no. 2, págs. 34–37 (Roche Molecular Biochemicals). En incluso otra forma de realización, la apoptosis se puede observar morfológicamente.

[00201] Los detalles de una o más formas de realización de la descripción se establecen en la descripción adjunta anterior. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetivos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Todas las patentes y publicaciones citadas en esta memoria descriptiva se incorporan como referencia según corresponda, a menos que se indique lo contrario. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las formas de realización preferidas de la divulgación. Estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance del objetivo divulgado, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

[00202] Formas de Realización Específicas, Citas y Referencias.

[00203] La presente invención no debe limitarse en alcance a las formas de realización específicas descritas en el presente documento. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[00204] En el presente documento se citan varias referencias, incluidas solicitudes de patente, patentes y publicaciones científicas; la descripción de cada una de dichas referencias se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[00205] Tabla 2 – Tabla de Secuencia

SE Q ID NO	Descripción	Secuencia
Secuencias relacionadas con IL-15		
1	IL-15 humana (con péptido señal)	<i>MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVN VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS</i>
2	ADN de IL-15 humano (con péptido señal)	<i>atgagaattt cgaaaccaca ttgagaagt attccatcc agtgctactt gtgtttactt ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt gcagggttc ctaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgaatt gaaaaaatt gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac ccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc ttctcttg agttacaagt tatttccatt gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtgaaaaatc tgatcatcct agcaacaac agtttgtctt ctaattggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag gaaaaaata ttaagaatt ttgcagagt ttgtacata ttgccaat gtcatcaac acttcttga</i>
3	IL-15 humana con péptido señal GMCSF	<i>atgtggctcc agagcctgct actcctgggg acggtggcct gcagcatctc gaactgggtg aacgtgatct cggacctgaa gaagatcgag gacctcatcc agtcgatgca catcgacgcg acgctgtaca cggagtcgga cgtccaccg tcgtgcaagg tcacggcgat gaagtgttc ctctggagc tccaagtcac ctgcctcgag tcggggggacg cgtcgatcca cgacacgggt gagaacctga tcatcctggc gaacaactcg ctgctgcga acgggaacgt cacggagtcg ggctgcaagg agtgcgagga gctggaggag aagaacatca aggagttcct gcagtcgttc gtgcacatcg tccagatgtt catcaacacg tcgtga</i>
4	ADN optimizado para codón de IL-15	<i>cctggccatt gcatacgttg tatccatatac ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatatgaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg atggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttcttactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact</i>

		ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcttga gacgcatcc acgtgtttt gacctcata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgctc gacaagaaat gcgcatctcg aagccgcacc tgcggtcgat atcgatccag tgctacctgt gcctgctct gaactcgac ttctcacgg aggcgggtat acacgtctc atctgggct gcttctggc ggggctgccg aagacggagg cgaactgggt gaacgtgac tcggacctga agaagatcga ggacctcag cagtcgatgc acatcgacgc gacgtgtac acggagtcgg acgtccacc gtcgtgcaag gtcacggcga tgaagtgtt cctctggag ctccaagtca tctgctcga gtcgggggac gcgtcgatcc acgacacggg ggagaacctg atcatcctgg cgaacaactc gctgtcgtc aacgggaacg tcacggagtc gggctgcaag gagtgcgagg agctggagga gaagaacatc aaggagtcc tgcagtcgt cgtgcacatc gtccagatgt tcatcaacac gtcgtgaggg cccggcgcgc cgaattcgcg gatatcgggt aacggatcca gatctgctgt gccttctagt tgccagccat ctgtgtttg cccctcccc gtgcttct tgacctgga aggtgccact cccactgtcc ttcttaata aaataggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggatcggt gggctctatg ggtaccagg tctgaagaa ttgaccgggt tctctctggg ccagaagaa gcaggcacat ccccttctc gtgacacacc ctgtccacgc cctggttct tagttccagc cccactcata ggacactcat agtcaggag ggctccgct tcaatccac ccgctaaagt acttgagcg gtctctcct cccatcatg cccacaaac caaacctagc ctccaagagt gggaagaaat taaagcaaga taggctatta agtcagagg gagagaaaat gcctcaaca tgtgaggaag taatgagaga aatcata
5	Aminoácido optimizado con codón IL-15	MRISKPHLRISIQYLCLLNHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
6	IL-15R α humana con péptido señal	<u>MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYR</u> <i>ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRD PALVHQR PAPP S</i> <i>TVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMP SKSPSTGT</i> <i>TEISSHESSHGTPSQT TAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC</i> <i>GLSAV SLLACYLKS RQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDE DLENC SHHL</i>
7	IL-15R α soluble humana con péptido señal	<u>MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYR</u> <i>ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRD PALVHQR PAPP S</i> <i>TVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMP SKSPSTGT</i> <i>TEISSHESSHGTPSQT TAKNWELTASASHQPPGVYPQG</i>
8	IL-15R α humana con ADN de péptido señal	<u>atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tccggcgct gctactgctg ctgctgctcc</u> <u>ggccgcccgc gacgcggggc</u> atcacgtgcc ctcccccat gtccgtgga cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgaac tctggttca agcgtaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgctgtt gaacaaggcc acgaatgtc cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgcctggtt caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag agcctctccc cttctggaaa agagcccga gctcatctc ccagctcaaa caacacagcg gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc ctcaaaatc accttcaca ggaaccacag agataagcag tcatgagtc

		tcccacggca cccctctca gacaacagcc aagaactggg aactcacagc atccgctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc cacagcgaca ccaactgtggc tatctccacg tccactgtcc tgctgtgtgg gctgagcgct gtgtctctcc tggcatgcta cctcaagtca aggcaaac ccccgctggc cagcgttgaa atggaagcca tggaggctct gccgggtgact tgggggacca gcagcagaga tgaagacttg gaaaactgct ctcaccacct atga
9	IL-15R α soluble humana con ADN de péptido señal	<u>atggccccgc</u> <u>ggcgggcgcg</u> <u>cggctgccgg</u> <u>accctcggtc</u> <u>tcccggcgct</u> <u>gctactgctg</u> <u>ctgctgctcc</u> <u>ggccgcccgc</u> <u>gacgcggggc</u> <u>atcacgtgcc</u> <u>ctcccccat</u> <u>gtccgtggaa</u> <u>cacgcagaca</u> <u>tctgggtcaa</u> <u>gagctacagc</u> <u>tgtactcca</u> <u>gggagcggta</u> <u>catttgaac</u> <u>tctggttca</u> <u>agcgtaaagc</u> <u>cggcacgtcc</u> <u>agcctgacgg</u> <u>agtgcgtgtt</u> <u>gaacaaggcc</u> <u>acgaatgctg</u> <u>cccactggac</u> <u>aacccccagt</u> <u>ctcaaatgca</u> <u>ttagagaccc</u> <u>tgccctggtt</u> caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtagcccc acagccagag agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gttcatctc ccagctcaaa caacacagcg gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc acctccaca ggaaccacag agataagcag tcatgagtc tcccacggca cccctctca gacaacagcc aagaactggg aactcacagc atccgctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc
10	IL-15R α soluble humana (terminación PQG)	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVA HWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTAKNWELTASASHQ PPGVYPQG
11	ADN optimizado con codón IL-15R α	cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgct caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataactacg gtaaatggcc gcctggctg accgcccaac gacccccgc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg atggtaaag gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttctctact ggacgtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcgggtt tggcagtaca tcaatgggcg tgatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcttga gacgccatcc acgtgtttt gacctcata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgtc gacgtagca agaaatggcc ccgaggcggg cgcgaggctg ccggaccctc ggtctcccgg cgctgtact gctctgctg ctccggccgc cggcgacgcg ggcatcacg tgccgcccc ccatgtccgt ggagcacgca gacatctggg tcaagagcta cagcttgatc tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt ttcaagcgga agggcggcac gtccagcctg acggagtgcg tgttgaacaa ggccacgaat gtgcgccact ggacgacccc ctgctcaag tgatccgcg acccgccct ggttcaccag cggcccgcg caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgagcc ggagagcctc tcccgtcgg gaaaggagcc cgccgcgtcg tgcccagct cgaacaacac ggcggccaca actgcagcga tcgtcccggg ctcccagctg atgccgtcga agtcgccgtc cacgggaacc acggagatca gcagtcata gtcctccac ggaccccc ctgcaaacgac ggccaagaac tgggaactca cggcgtccgc

		ctcccaccag ccgcccggggg tgtatccga aggccacagc gacaccacgg tggcgatctc cacgtccacg gtcctgtgtgt gtgggctgag cgcgggtgctg ctctggcgt gctacctcaa gtcgaggcag actccccgc tgccacgct tgagatggag gccatggagg ctctccgggt gacgtggggg accagcagca gggatgagga ctggagaac tgctcgacc acctataatg agaattcgat ccagatctgc tgtgccttct agttgccagc catctgtgtt ttcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgcc actccactg tccttctca ataaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggtaccc aggtgctgaa gaattgaccc ggttctctct gggccagaaa gaagcaggca catccccttc tctgtgacac accctgtcca cgcccctgggt tctagtctc agccccactc ataggacact catagctcag gagggctccg cttcaatcc caccgctaa agtacttga gcggtctct cctccctcat cagcccacca aaccaaacct agcctccaag agtgggaaga aattaaagca agataggcta ttaagtgcag agggagagaa aatgcctcca acatgtgagg aagtaatgag agaaatcata
12	Aminoácido optimizado con codón IL-15R α	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSR ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALVHQRPAAPS TVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGT TEISSHESHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDELENCSHHL
13	ADN optimizado con codón CMV IL-15R α	cctggccatt gcatacgttg tatccatc ataatatgta catttatatt ggctcatgac caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatatgaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgctggctg accgccaac gaccccgcc cattgacgac aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacgt cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt gacgtcaatg atggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttcttactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag ttgttttg caccaaatc aacgggactt tccaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctcat ataagcagag ctcttttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgcatcc acgctgtttt gacctcata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgag ggcgcgctc gacgctagca agaatggcc ccgaggcggg cgcgaggctg ccggaccctc ggttccccgg cgctgtact gctcctgctg ctccggccgc cggcgacgcg gggcatcacg tgcccccccc ccatgtccgt ggagcacgca gacatctggg tcaagagcta cagctgtac tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt ttcaagcgga aggccggcac gtccagcctg acggagtgcg tgtgaacaa ggccacgaat gtcgcccact ggacgacccc ctcgctcaag tgcatccgag acccgccct ggttaccag cggcccgcg caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgagcc ggagagcctc tcccgtcgg gaaaggagcc cgcgcgctg tcgcccagct cgaacaacac ggcgccaca actgcagcga tcttcccggg ctcccagctg atgccgtcga agtcgcccgc cacgggaacc acggagatca gcagtcatga gtcctccac ggaccccct cgcaaacgac ggccaagaac tgggaactca cggcgctccgc ctcccaccag ccgcccgggg tgtatccga aggccacagc gacaccacgt aatgagaatt cgcggatatc ggttaacgga tccagatctg ctgtgccttc tagttgccag ccatctgtt tttcccctc ccccgctcct tcctgaccc tggaagggtgc

		cactccact gtccttct aataaaatga ggaaattgca tcgattgctc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatgggtacc cagggtgctga agaattgacc cggttctcc tgggccagaa agaagcaggc acatcccctt ctctgtgaca caccctgtcc acgcccctgg ttcttagtgc cagccccact cataggacac tcatagctca ggagggctcc gccttcaatc ccacccgcta aagtactgg agcgggtctc cctccctca tcagcccacc aaaccaaacc tagcctcaa gagtggaag aaattaaagc aagataggct attaagtga gagggagaga aaatgcctcc aacatgtgag gaagtaatga gagaaatcat a
14	Aminoácido optimizado con codón CMV IL-15R α	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSR ERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPA PPS TVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGT TEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT
15	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQGHSDTT
16	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQGHSDT
17	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQGHSD
18	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQGHS
19	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQGH
20	C-terminal de IL-15R α humana soluble	PQG
21	IL-15R α soluble humana	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATN VAHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPA PPS TVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSP SSNNTAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTT
22	IL-15R α O-glicosilación	NWELTASASHQPPGVYPQG
23	IL-15R α N-glicosilación	ITCPPPMSVEHADIWVK
24	IL-15R α N-glicosilación	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNS
25	Sitio de escisión de	RXXR

	proteasa heteróloga de IL-15R α reconocido por la proteasa furina Xaa = cualquier aminoácido	
26	Sitio de escisión de proteasa heteróloga de IL-15R α 1,2 Xaa = aminoácidos hidrofóbicos 5,6 Xaa = aminoácidos no ácidos	XXPRXX
27	proteína de fusión sintética sIL-15R α -Fc huIL15sRa205-Fc	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSY RERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRD PALVHQR PAP PSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSPSPS TGTTEISSHESSHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
28	proteína de fusión sintética sIL-15R α -Fc huIL15sRa200-Fc	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSY RERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRD PALVHQR PAP PSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSPSPS TGTTEISSHESSHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGP KSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKS LSLSPGK

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de hetIL-15 en la línea celular CHO

[00206] Se utilizó la línea celular parental de ovario de hámster chino (CHO) CHO-MaKo para producir el heterodímero IL-15/IL-15R α (también denominado "hetIL-15"). La

línea celular CHO–MaKo se derivó mediante delección dirigida del gen de la matriptasa en CHO–C8TD utilizando la técnica de nucleasas con dedos de zinc (ZFN). Se descubrió que la proteasa matriptasa participa en la degradación de una variedad de proteínas terapéuticas recombinantes en células CHO. CHO–C8TD se derivó de un único vial de la línea celular parental CHO–K1PD de WCB070625. CHO–K1PD se derivó de la línea celular CHO–K1, obtenida originalmente de ATCC (nº de cat. CCL–61.3). Los detalles de la línea celular CHO–MaKo se pueden encontrar en el documento WO2015/166427, que se incorpora en el presente documento como referencia.

[00207] Las células CHO–MaKo se cotransfectaron por electroporación con el vector linealizado pBW1697 (que codifica IL–15 (interleucina 15) e IL015R α (receptor de interleucina 15 alfa)) y pBW1703 que codifica IL–15R α . Después de una fase de recuperación de dos días, el conjunto de células transfectadas se cultivó en medio con bajo contenido de folato complementado con metotrexato (MTX) durante varias semanas para seleccionar las células recombinantes. Para aumentar la expresión de IL–15, se transfectaron conjuntos de células recuperadas mediante electroporación con el vector linealizado pBW1916 que codifica IL–15. Después de una fase de recuperación de dos días, el conjunto de células transfectadas se cultivó en medio con bajo contenido de folato complementado con metotrexato (MTX) y puomicina durante varias semanas para seleccionar las células recombinantes de las que se clasificaron las células individuales mediante FACS. Los clones seleccionados se caracterizaron adicionalmente con respecto al rendimiento del biorreactor, el tamaño y la integridad del ARNm (mediante transferencia Northern), el número de copias del transgén (mediante qPCR), el tamaño y la integridad de los casetes de expresión (mediante transferencia Southern) y la verificación de la secuencia (mediante NGS).

[00208] Los mapas de vectores de pBW1697, pBW1703 y pBW1916 se presentan en la Figura 1. La Tabla 3 proporciona la descripción general de los constructos de expresión final y los casetes de expresión.

[00209] Como se muestra en la Tabla 1, se utilizaron dos casetes de expresión de IL–15 diferentes: en pBW1697, el péptido señal nativo (propio SP) de 29 aa y la secuencia de propéptido nativo de 19 aa que precede a la cadena de IL–15 de 114 aa se incluyen en el marco de lectura abierto (ORF). En pBW1916, la cadena de IL–15 se combina con el llamado péptido señal UTR12 (UTR12 SP).

[00210] También se expresó IL-15R α a partir de dos ORF diferentes. En pBW1697, se utiliza el receptor de longitud completa (IL-15R α FL) con su péptido señal nativo (propio SP). En pBW1703, una versión soluble de IL-15R α se expresa con UTR12 SP.

Tabla 3 Descripción general de los constructos de expresión final

Vector	Casete de expresión de IL-15 (ORF)	Casete de expresión de IL-15R α (ORF)
pBW1697	propio SP + propéptido + IL-15	propio SP + IL-15-Ra FL
pBW1703	n.a	UTR12 SP + IL-15R α sol
pBW1916	UTR12 SP + IL-15	n.a

ORF: marco de lectura abierto, SP: péptido señal, FL: longitud completa, n.a: no aplicable, sol: soluble

[00211] Ejemplo 2. Producción del heterodímero IL-15/IL-15R α

[00212] El IL-15/IL-15R α se produce mediante una línea celular recombinante de ovario de hámster chino (CHO). La producción se lleva a cabo utilizando un proceso de producción de lotes alimentados estándar en un biorreactor.

[00213] Un vial congelado del banco de células maestras se descongela y se suspende en el medio de expansión. Se realizan una serie de pases en matraces agitados para expandir el volumen del inóculo. Cuando el volumen del inóculo y la densidad de células viables son lo suficientemente altos (densidad de células viables de aproximadamente $4,8 \times 10^6$ células/ml; viabilidad > 90%), el inóculo se transfiere al primer reactor de semillas.

[00214] El inóculo del paso anterior se transfiere al primer biorreactor de semillas que contiene medio de expansión y se cultiva adicionalmente en modo discontinuo. Cuando la densidad de células viables es suficiente (densidad de células viables de aproximadamente $5,4 \times 10^6$ células/ml), el cultivo se utiliza para inocular el segundo biorreactor de semillas.

[00215] El cultivo del primer biorreactor de semillas se transfiere al medio de expansión que contiene el segundo biorreactor de semillas y se cultiva adicionalmente en modo discontinuo. Cuando la densidad de células viables es suficiente (densidad de células viables de aproximadamente $5,6 \times 10^6$ células/ml), el cultivo se utiliza para inocular el biorreactor de producción.

[00216] El biorreactor de producción se hace funcionar en modo de alimentación por lotes. El cultivo del paso 3 se transfiere al biorreactor de producción, que contiene medio de producción. La alimentación con dos soluciones de alimentación se lleva a cabo durante todo

el ciclo del biorreactor. Ambas adiciones de alimentación se inician a una densidad celular viable de aproximadamente 2×10^6 células/ml. A una densidad de células viables de aproximadamente $12,5 \times 10^6$ células/ml, la temperatura de cultivo se cambia de 36,5°C a 33,0°C. La cosecha se inicia cuando la viabilidad celular desciende a $\leq 75\%$ o aproximadamente 14 días después del inicio de la producción. Cada lote de cosecha a granel se monitorea para detectar agentes adventicios y de carga biológica.

[00217] El proceso de purificación incluye dos pasos que se dedican a la inactivación/eliminación de virus, a saber, incubación a pH bajo y nanofiltración. Al final, el producto se concentra y se diafiltra en el buffer final.

[00218] **Ejemplo 3. Determinación de la composición de O-glicanos**

[00219] Los O-glicanos se analizaron mediante espectrometría de masas de ionización por desorción por láser asistida por matriz (MALDI-MS). Para este propósito, los glicanos unidos a O se escinden químicamente de la proteína mediante el método de eliminación beta reductora y se derivatizan mediante permetilación antes de la detección de MS. A partir de los datos de MS, se generan resultados de identificación y semicuantitativos. La identidad y abundancia relativa de las principales especies de glicanos en los cinco lotes se resumen en la Tabla 4.

[00220] La figura 6 visualiza la distribución de las diversas especies en forma de gráfico de barras.

[00221] Se observan diferencias relevantes en las variantes y distribución de O-glicanos entre lotes de hetIL-15 derivados de diferentes líneas celulares. Los lotes HEK293 contienen aproximadamente el 50% de las variantes de tipo Core 2 (C2G, C2S1, C2GS1, C2GS2). Estos solo se detectan a niveles traza en lotes derivados de CHO. Se detectó un nivel más alto de una variante mono-sialilada de Core 1 (C1S1) en lotes de CHO en comparación con los lotes de HEK293 ($\sim 50\%$ frente a $\sim 15\%$, respectivamente). El nivel global de sialilación de todos los lotes es muy alto ($> 97\%$). Debido a las diferencias observadas, los lotes derivados de células HEK293 y CHO se consideran no comparables con respecto a su composición general de O-glicanos.

[00222] La Figura 7 muestra la estructura básica de las formas de O-glicano de tipo Core 1 ("C1"). Las extensiones con otros residuos de glicanos (por ejemplo, ácido siálico) conducen a estructuras más complejas como se enumeran en la Tabla 4 (por ejemplo, C1S1, C1S2). El motivo de la estructura Core 1 está presente en todos los lotes analizados. La Figura 8 a continuación muestra la estructura básica de las formas de O-glicano de tipo Core 2

("C2"). Las extensiones con otros residuos de glicanos conducen a estructuras más complejas como se enumeran en la Tabla 4 (por ejemplo, C2S1, C2GS1). Esta estructura se ha detectado en niveles relevantes solo en lotes HEK293.

Tabla 4. Distribución de O-glicanos

Isoforma de glicano	HEK293 lote 6270113002	HEK293 lote 6270117001	HEK293 lote 6270117006	CHO lote 18PP01	CHO lote BC0001
C1	0,57	—	—	1,2	0,92
H1S1	—	—	—	0,51	—
C1F1	0,71	—	—	—	—
C1S1	15,3	11,7	12,0	54,9	50,5
C2G + C1Lac1	2,1	1,6	1,6	—	—
C1H1S1 o H2N1S1	—	1,7	—	—	—
C2S1 + C1N1S1	5,5	5,6	6,8	—	—
C1S2	36,6	37,2	40,0	42,8	47,6
C2GS1	18,8	17,8	16,6	—	—
C2GS2	19,4	22,7	21,1	—	—
Suma de especies fucosiladas	1,1	0,81	0,84	—	—
Suma de especies A-sialiladas	3,5	2,4	2,6	1,2	0,93
Suma de especies mono-sialiladas	40,5	37,6	36,3	55,9	51,3
Suma de especies di-sialiladas	56,0	60,0	61,1	42,8	47,7

“—”: no detectado o por debajo del límite de notificación del 0,5%

“H”: Hexosa

“F”: Fucosa

“C”: Núcleo

“Lac”: N-acetil-lactosamina

“G”: Galactosa (núcleo alargado 2)

“S”: Ácido siálico

“N”: N-acetilhexosamina

[00223] Los O-glicanos se caracterizaron adicionalmente con respecto al tipo de enlace de los ácidos siálicos. Después de la escisión química de la proteína por el método de eliminación beta, se realizó la derivatización mediante esterificación etílica. El análisis de MS de los glicanos ligados a O después de la esterificación etílica proporciona información sobre el enlace del ácido siálico ($\alpha 2$, 3 o $\alpha 2$, 6) y se realizó únicamente sobre una base cualitativa.

[00224] Los lotes de HEK293 y CHO exhiben ambos dos tipos de enlaces de ácido siálico ($\alpha 2$, 3 y $\alpha 2$, 6). Esto se espera para las proteínas expresadas en células humanas (HEK293) pero es poco común en proteínas expresadas en células CHO. La Figura 9 a continuación muestra un espectro de masas para el lote clínico de CHO BC0001. La

intensidad relativa del ácido siálico enlazado a α 2,6 es bastante baja en comparación con la variante más dominante del ácido siálico enlazado a α 2,3.

[00225] El perfil y contenido de ácido siálico se evaluó mediante cromatografía de fase inversa. Después de la escisión química y el marcaje fluorescente, los ácidos siálicos se separaron en la columna mediante elución en gradiente y se cuantificaron mediante detección de fluorescencia.

[00226] El ácido N-acetilneuramínico es el ácido siálico predominante en las glicoproteínas humanas. El ácido N-glicolineuramínico se encuentra en glicoproteínas no humanas y no es deseado. Por lo tanto, se prefiere una alta relación de ácido N-acetilneuramínico a ácido N-glicolineuramínico.

[00227] Los lotes de HEK293 exhiben una proporción muy alta. La cantidad de ácido N-glicolineuramínico en estos lotes puede considerarse insignificante.

[00228] Los lotes de CHO exhiben una proporción alta y comparable de más de 200. Esto indica que menos del 0,5% de ácido N-glicolineuramínico no deseado está presente en estas muestras.

[00229] **Ejemplo 4. Determinación de la composición de N-glicanos**

[00230] Los N-glicanos se escindieron enzimáticamente del heterodímero hetIL-15 y se derivatizaron con un marcador fluorescente y una amina terciaria utilizando la tecnología RapiFluor™. Después de la purificación, los N-glicanos marcados se analizaron mediante HILIC (cromatografía líquida de interacción hidrófila) con detección de fluorescencia acoplada con MS (espectrometría de masas).

[00231] El cromatograma de la Figura 10 muestra una superposición de un lote derivado de HEK293 y un lote derivado de CHO. Se observan diferencias significativas en la población y distribución de N-glicanos entre lotes de CHO derivados de las dos líneas celulares diferentes. Las principales especies de N-glicanos son diferentes y el perfil del lote HEK293 exhibe una distribución heterogénea mientras que el perfil del lote CHO es más homogéneo.

[00232] La identidad y las áreas de pico relativas de las principales especies de N-glicanos en los cinco lotes se resumen en la Tabla 5.

[00233] El cromatograma de la Figura 11 muestra una superposición de los tres lotes de HEK293. El patrón general de carbohidratos de los tres lotes y el orden de clasificación de las formas principales son similares y las diferencias observadas están dentro de la variabilidad esperada de un lote a otro. Aunque las principales especies están relacionadas con la

galactosilación (FA2B/FA2/FA3/FA4), se observó un alto nivel de sialilación. Se detectó un gran número de diversos glicanos sialilados a niveles bajos. No se detectaron especies con un impacto potencial en la farmacocinética o inmunogenicidad, como los glicanos afucosilados y con alto contenido de manosa.

[00234] El cromatograma de la Figura 12 muestra una superposición de los dos lotes de CHO. El patrón de carbohidratos de los dos lotes es muy similar. Dos especies principales sialiladas (FA2G2S2 y FA2G2S1) contribuyen a aproximadamente el 60% de la población de N-glicanos. No se detectaron especies con un impacto potencial en la farmacocinética o inmunogenicidad, como los glicanos afucosilados y con alto contenido de manosa.

Tabla 5 Distribución de N-glicanos

Especies de N-glicanos	HEK293 lote 6270113002	HEK293 lote 6270117001	HEK293 lote 6270117006	CHO lote 18PP01	CHO lote BC0001
FM3	0,53	-	-	-	-
FA1 especie	2,2	0,8	1,1	-	-
FA2	7,4	3,7	4,9	-	-
FA1G1	-	-	-	-	0,57
FA2B y FA3	12,6	12,0	14,6	-	-
FA4 y FA3B	3,6	4,8	4,2	-	-
FA2[8]G1	1,1	0,63	0,72	-	-
FA2[3]G1	1,8	0,92	1,0	-	0,53
FA1G1S1 especie	-	-	-	-	0,57
FM6A1G1	0,59	0,55	0,67	-	-
FA2BG1 y FA3G1	5,6	4,1	6,3	-	-
FA4B	1,7	0,92	1,4	-	-
FA3F1	0,61	-	-	-	-
FA4G1 especie	1,5	1,1	1,4	-	-
FA3F1G1 especie	1,8	2,1	1,9	-	-
FA2G2	2,0	1,7	1,3	6,0	7,4
FA2BS1	0,62	1,4	2,0	-	-
FM6A1G1S1	0,56	0,72	-	-	-
FA2BG2 y FA3G2	3,3	3,4	3,2	-	-
FA4BG1	0,70	0,95	1,3	-	-
FA2G1S1 especie	3,3	1,5	1,8	-	-
FA3F1G2	1,8	2,8	2,6	-	-
FA2F1G2 especie	1,0	0,67	0,64	-	-
FA2BG1S1 especie	3,0	1,3	1,5	-	-
FA2G2S1 especie	5,6	5,2	4,9	18,5	21,1
FA4G2	-	0,68	0,86	-	-
FA2BG2S1 y FA3G2S1	5,1	7,0	5,8	0,66	-
FA2BF1G1S1 especie	0,75	1,7	1,2	-	-
FA3F1G2S1 especie	0,61	2,8	1,8	-	-
FA3G3	0,96	0,92	0,89	1,1	1,2
FA4G3 especie	1,5	1,3	1,2	-	-
FA4BG2S1	-	-	0,57	-	-
FA4G3S1 especie	2,7	2,1	1,4	-	-
FA2G2S2 especie	3,8	4,8	3,5	44,7	43,4
FA3G2S2 especie	1,8	2,6	2,4	-	-
FA4G4	0,53	-	-	-	-
FA3G3S1 especie	1,1	2,0	0,87	2,7	2,7
FA2F1G2S2 especie	-	-	-	3,7	3,0
FA2F2G2S2	-	-	-	0,52	-
FA4BG3S1	0,65	-	0,87	-	-
FA3G3S2 especie	1,2	1,2	1,3	3,8	3,7
FA4BF1G3S1	-	-	0,80	-	-
FA3BG3S2 especie	0,90	1,2	0,99	-	-
FA4BG4S1	0,99	1,8	1,5	-	-
FA3G3S3 especie	0,91	2,1	1,7	8,0	7,0
FA4BF1G4S1 especie	-	0,95	-	-	-
FA4G4S1 especie	0,88	-	-	-	-
FA4G4S2 especie	3,3	2,2	2,6	1,1	1,1
FA4F1G4S2 especie	0,75	-	-	-	-
FA4BG4S2 especie	-	1,9	1,4	-	-
FA4BF1G4S2 especie	-	0,84	0,72	-	-
FA4G4S3 especie	2,0	2,0	1,6	1,9	1,7
FA4BG4S3	-	0,58	-	-	-
FA4G4S4 especie	2,0	2,7	2,2	1,2	1,0
FA4G4Lac1S4 especie	-	0,62	0,52	-	-
picos desconocidos	-	-	-	1,1	0,83

"-": no detectado o por debajo del límite de notificación del 0,5%

"F": Fucosa

"A": N-acetilglucosamina antenaria

"B": N-acetilglucosamina bisectada

"M": Manosa

"Lac": Lactosamina

"G": Galactosa

"S": Ácido N-cetilneuraminico (ácido siálico)

[00235] Ejemplo 5. Estudio de fase I/Ib del complejo IL-15 / IL-15Ra solo o en combinación con una molécula de anticuerpo anti-PD-1 en adultos con cáncer metastásico

[00236] Este ejemplo describe un estudio para determinar la seguridad, tolerabilidad, toxicidad limitante de dosis (DLT) y dosis máxima tolerada (MTD) de complejos subcutáneos (SC) de IL-15 heterodimérica recombinante/IL-15Ra soluble (hetIL-15) producidos por la línea celular CHO, administrados solos o en combinación con la molécula de anticuerpo anti-PD-1 a pacientes humanos con tumores sólidos o linfoma.

[00237] Objetivos

[00238] El propósito de este estudio de fase I/Ib es determinar el perfil de seguridad de complejos de IL-15 heterodimérica/IL-15Ra soluble (hetIL-15) producidos por la línea celular CHO (denominada "CHO hetIL-15"), y si se puede combinar de forma segura con el anticuerpo anti-PD-1 y determinar la dosis y el programa adecuados para un estudio adicional. Además, el estudio caracterizará los perfiles farmacocinéticos de CHO hetIL-15 como agente único y en combinación con el anticuerpo anti-PD-1 e identificará la actividad antitumoral preliminar.

[00239] El objetivo principal es caracterizar la seguridad, la tolerabilidad de CHO hetIL-15 como agente único y en combinación con el anticuerpo anti-PD-1 en pacientes con tumores sólidos y linfomas que respondieron previamente al inhibidor del punto de control inmune (CPI) y progresaron (pacientes resistentes secundarios).

[00240] Los objetivos secundarios son: 1) evaluar la actividad antitumoral preliminar de CHO hetIL-15 y el anticuerpo anti-PD-1; y 2) caracterizar la farmacocinética (PK) de CHO hetIL-15 como agente único y en combinación con el anticuerpo anti-PD-1 y la PK del anticuerpo anti-PD-1.

[00241] Diseño del estudio

[00242] Este es un estudio de fase I/Ib, de etiqueta abierta, global, multicéntrico de CHO hetIL-15 administrado subcutáneamente solo y en combinación con anticuerpo anti-PD-1 en sujetos con tumores sólidos avanzados y linfoma que han progresado tras obtener una respuesta previa a la terapia anti-PD-1/CPI. La respuesta previa se define como una respuesta radiográfica completa (CR) o una respuesta parcial (PR). También se incluirán sujetos con enfermedad estable (SD) que dure ≥ 6 meses si el régimen más reciente incluyó CPI. El estudio consta de dos partes, aumento de la dosis y expansión de la dosis. Se examinarán dos brazos separados durante la parte de escalada: 1) evaluación de CHO hetIL-15 como agente único. El anticuerpo anti-PD-1 se puede agregar al anticuerpo anti-PD-1 de la primera reevaluación de la enfermedad y 2) la administración de CHO hetIL-15 y el anticuerpo anti-PD-1 como una combinación a partir de C1D1.

[00243] Población de pacientes

[00244] El estudio se realizará en pacientes masculinos y femeninos ≥ 18 años de edad que fueron tratados previamente con CPI (anti PD-1/PD-L1 y/o anti CTLA 4) que previamente han respondido y progresado. La respuesta previa es una CR/PR radiográfica inicial (no se requiere una exploración confirmatoria) o una SD que dura ≥ 6 meses si el régimen más reciente incluía CPI. Durante el aumento de dosis, el estudio se llevará a cabo en pacientes con linfomas y tumores sólidos avanzados. Durante la expansión, el estudio se realizará en pacientes con melanoma.

[00245] Criterios de inclusión clave

[00246] 1. Pacientes hombres o mujeres ≥ 18 años

[00247] 2. Tumores sólidos avanzados documentados y confirmados histológicamente y linfoma (incluye localmente avanzados que no son curables mediante cirugía o radioterapia, y aquellos con enfermedad metastásica) con progresión documentada después de la terapia estándar, o para quienes, en opinión del investigador, no existe una terapia estándar adecuada.

[00248] Escalada: pacientes tratados previamente con CPI (anti PD-1/PD-L1 y/o anti CTLA-4) que han respondido y progresado previamente. La respuesta previa es una CR/PR radiográfica inicial (no se requiere una exploración confirmatoria) o una SD que dura ≥ 6 meses si el régimen más reciente incluía CPI.

[00249] Expansión: Pacientes con melanoma tratados previamente con CPI (anti PD-1/PD-L1 y/o anti CTLA-4) que han respondido y progresado previamente. La respuesta previa es CR/PR radiográfica (no se requiere una exploración confirmatoria) o SD que dura ≥ 6 meses si el régimen más reciente incluía CPI.

[00250] Criterios de exclusión clave

[00251] 1. Pacientes que hayan recibido algún tratamiento previo con IL-15.

[00252] 2. Historial de reacciones de hipersensibilidad graves a cualquier ingrediente de los fármacos del estudio y otros mAb y/o sus excipientes.

[00253] 3. Se excluyen los pacientes con tumores primarios del SNC. Presencia de metástasis en el SNC sintomáticas o metástasis en el SNC que requieren terapia local dirigida al SNC (como radioterapia o cirugía) o dosis crecientes de corticosteroides 2 semanas antes de la entrada al estudio. Los pacientes con metástasis cerebrales sintomáticas tratadas deben estar neurológicamente estables (durante 4 semanas después del tratamiento y antes del ingreso al estudio) y con una dosis de ≤ 10 mg por día de prednisona o equivalente durante al menos 2 semanas antes de la administración de cualquier tratamiento del estudio.

[00254] 4. Terapia con esteroides crónica sistémica (> 10 mg/día de prednisona o equivalente) o cualquier terapia inmunosupresora, distinta de las dosis de reemplazo de esteroides en el contexto de insuficiencia suprarrenal, dentro de los 7 días de la primera dosis del tratamiento del estudio. Se permiten los esteroides tópicos, inhalados, nasales y oftálmicos.

[00255] 5. Enfermedad maligna, distinta de la que se está tratando en este estudio. Las excepciones incluyen el carcinoma de células basales de la piel o el carcinoma de células escamosas de la piel que se ha sometido a una terapia potencialmente curativa o cáncer de cuello uterino in situ u otros tumores que no afectarán la esperanza de vida.

[00256] Evaluaciones de eficacia

[00257] Evaluaciones de tumores según RECIST1.1, iRECIST para tumores sólidos como describen Seymour et al. (2017) Lancet Oncol; 18: e143–e152 y Cheson et al (2014) J. Clin. Oncol. 32 (27): 3059–67 para linfomas. En la selección, las evaluaciones por imágenes se realizarán dentro de los 28 días posteriores al inicio del tratamiento (día –28 al día –1 antes del día 1 del ciclo 1). Todos los sujetos se someterán a una tomografía computarizada (TC) con contraste intravenoso de tórax, abdomen y pelvis. Si hay evidencia clínica de enfermedad en el cuello, también se realizará una TC con contraste intravenoso del cuello. Se requieren imágenes del cerebro al inicio del estudio para sujetos con enfermedad conocida del SNC. Las imágenes de resonancia magnética (MRI) se deben utilizar para evaluar los sitios de la enfermedad que no son adecuadamente captados por TC. Si un sujeto es intolerante a los agentes de contraste, se pueden realizar TC sin contraste. La MRI se puede utilizar para evaluar sitios de enfermedad donde una TC sin contraste intravenoso no es adecuada. Las lesiones cutáneas visibles y los tumores fácilmente palpables se pueden medir mediante un examen físico con una regla o calibradores y se tomarán fotografías en color. El ultrasonido no se debe utilizar para medir sitios de enfermedad con el propósito de respuesta.

[00258] Medidas de resultado

[00259] La farmacocinética se evalúa mediante la concentración en suero de CHO hetIL–15 y anticuerpo anti–PD–1 al inicio del tratamiento y durante el tratamiento.

[00260] Incidencia de toxicidades limitantes de dosis (DLT) en el ciclo 1 (28 días) para CHO hetIL–15 como agente único y en combinación con anticuerpo anti–PD–1.

[00261] Incidencia y gravedad de eventos adversos (AE) y eventos adversos graves (SAE), incluidos cambios en parámetros de laboratorio, signos vitales y electrocardiogramas (ECG).

[00262] Otras evaluaciones incluyen:

[00263] 1. Evaluación de cambios en el número y actividad citotóxica de células T CD8 + infiltrantes en el tumor y células NK y cambios en la abundancia de clones de células T.

[00264] 2. Secuenciación en biopsias tumorales basales y durante el tratamiento. Evaluación de la expresión de PD–L1 y células T CD8 + en biopsias de tumores por IHC.

[00265] 3. Perfiles de expresión génica en muestras tumorales basales y durante el tratamiento

[00266] 4. Secuenciación del ADN del ADN tumoral libre circulante a partir de muestras de plasma basales y en tratamiento

[00267] 5. Evaluación de los cambios desde la línea base en el nivel y/o expresión de marcadores de activación/proliferación, inhibidores de puntos de control en subconjuntos de células T y células NK en sangre y factores inmunes solubles en plasma.

[00268] Tratamiento de estudio

[00269] Escalada de dosis y expansión de dosis

[00270] Se tratará a los pacientes con CHO hetIL–15 como agente único y en combinación con el anticuerpo anti–PD–1 hasta que se alcancen las MTD o se establezca una RD más baja para la combinación. El aumento de la dosis estará guiado por un BHLRM adaptativo siguiendo el principio EWOC para controlar el riesgo de toxicidad limitante de la dosis (DLT) en futuros sujetos en estudio. Se evaluarán dos brazos de dosificación separados durante la parte de aumento de dosis:

[00271] Brazo 1) Agente único CHO hetIL–15 (se permitirá que los sujetos comiencen con el anticuerpo anti–PD–1 después de su primera reevaluación de la enfermedad)

[00272] Brazo 2) CHO hetIL–15 en combinación con anticuerpo anti–PD–1 comenzando en C1D1.

[00273] La figura 14 proporciona los niveles de dosis provisionales que se evaluarán. Es posible agregar niveles de dosis adicionales y/o intermedios durante el curso del estudio. Además, pueden evaluarse programas de dosificación alternativos de hetIL–15, por ejemplo, administrando hetIL–15 una o dos veces por semana durante las dos primeras semanas del ciclo. Se pueden agregar cohortes a cualquier nivel de dosis por debajo de la MTD para comprender mejor la seguridad, la PK y/o la PD.

[00274] El período de tratamiento comenzará el día 1 del ciclo 1 (C1D1). Cada ciclo de tratamiento constará de 28 días. CHO hetIL–15 se administrará por vía subcutánea una vez a

la semana, 3 semanas con/1 semana sin. Cuando se administra el anticuerpo anti-PD-1, se administrará por vía intravenosa a una dosis fija de 400 mg una vez el día 1 de cada ciclo.

[00275] La dosis inicial de CHO hetIL-15, solo o en combinación con el anticuerpo anti-PD-1, para los sujetos inscritos en este ensayo es de 2 µg/kg por vía subcutánea (SC) una vez a la semana, a las 3 semanas con/1 semana sin. La dosis inicial de anticuerpo anti-PD-1 será de 400 mg Q4W i.v. Se pueden explorar programas de dosificación alternativos; el protocolo se modificará para reflejar cualquier programa nuevo.

[00276] En modelos preclínicos, los tratamientos con IL-15 por sí solos inducen IFN-γ y tienen efectos antitumorales, pero esta actividad antitumoral puede estar limitada debido a la regulación por incremento de PD-1 en células T CD8 +. La adición de la inhibición del punto de control, como los inhibidores de PD-1 y CTLA-4, aumenta aún más la expresión de IFN-γ y reduce la expresión de PD-1 en las células T CD8 +, lo que aumenta la supervivencia (Yu et al (2010) *Clin Cancer Res*; 16 (24): 6019–28, Yu et al (2012) *Proc Natl Acad Sci USA*; 109 (16): 6187–92). Además, los datos clínicos preliminares han demostrado que los sujetos que responden a CPI tienen niveles de referencia más altos de IL-15. La infiltración de tumores de células T CD8 + en melanoma, NSCLC y cáncer de mama también se correlaciona con niveles más altos de firmas de genes NK e IL-15. Por lo tanto, la combinación de CHO hetIL-15, un agonista de IL-15, con un anticuerpo anti-PD-1, un inhibidor de PD-1, puede ser sinérgica y puede mejorar aún más las respuestas antitumorales, particularmente en poblaciones de sujetos que han respondido previamente. a la inhibición del punto de control, y posteriormente recayó.

[00277] Se pueden combinar agentes adicionales con CHO hetIL-15 ± anticuerpo anti-PD-1 y se pueden considerar otras indicaciones en la parte de expansión del estudio. Estos regímenes y/o indicaciones de combinación adicionales solo se explorarán si se agregan a este ensayo con una futura enmienda del protocolo.

[00278] La parte de expansión de la dosis del estudio comenzará una vez que se declare la MTD y/o RD para CHO hetIL-15 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1. El objetivo principal del grupo de expansión es evaluar más a fondo la seguridad y tolerabilidad de CHO hetIL-15 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1. Un objetivo secundario del grupo de expansión es evaluar la actividad antitumoral de CHO hetIL-15 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1 en sujetos con melanoma recidivante CPI.

[00279] Niveles de dosis provisionales

[00280] La Tabla 6 y la Tabla 7 describen la dosis inicial y los niveles de dosis provisionales para CHO hetIL-15 que pueden evaluarse durante este ensayo. La dosis de anticuerpo anti-PD-1 se fija en 400 mg cada 4 semanas. Con la excepción del nivel de dosis inicial 1, los niveles de dosis reales se determinarán en función de los datos disponibles de toxicidad, farmacocinética y farmacodinámica.

Tabla 6 Niveles de dosis provisionales para el agente único CHO hetIL-15 (Brazo 1) seguido de una combinación de anticuerpos anti-PD-1

Nivel de dosis	Dosis semanal propuesta*	Incremento de la dosis anterior de hetIL-15	Dosis de anti-PD-1 cada 4 semanas (si se agrega después de la primera reevaluación de la enfermedad)	Incremento de la dosis anterior de Anti-PD-1***
-1**	1 µg/ kg	-50%	400 mg	0%
1	2 µg/ kg	(dosis inicial)	400 mg	(dosis inicial)
2	4 µg/ kg	100%	400 mg	0%
3	8 µg/ kg	100%	400 mg	0%
4	16 µg/ kg	100%	400 mg	0%

* Es posible agregar niveles de dosis adicionales y/o intermedios durante el curso del estudio. Se pueden agregar cohortes a cualquier nivel de dosis por debajo de la MTD para comprender mejor la seguridad, PK o PD. Pueden evaluarse simultáneamente múltiples niveles de dosis por debajo de la MTD para obtener datos de PK y PD en un rango de dosis.

** El nivel de dosis -1 representa las dosis de tratamiento para sujetos que requieren una reducción de la dosis desde el nivel de dosis inicial.

*** No se permiten reducciones de dosis para el anticuerpo anti-PD-1. La toxicidad relacionada con el anticuerpo anti-PD-1 se manejará por omisión o retraso.

Tabla 7 Niveles de dosis provisionales para la combinación de CHO hetIL-15 y anti-PD-1 (brazo 2)

Nivel de dosis	Dosis semanal propuesta*	Incremento de la dosis anterior de hetIL-15	Dosis de anti-PD-1 cada 4 semanas	Incremento de la dosis anterior de Anti-PD-1***
-1**	1 µg/ kg	-50%	400 mg (comenzando en C1D1)	0%
1	2 µg/ kg	(dosis inicial)	400 mg (comenzando en C1D1)	(dosis inicial)
2	4 µg/ kg	100%	400 mg (comenzando en C1D1)	0%
3	8 µg/ kg	100%	400 mg (comenzando en C1D1)	0%
4	16 µg/ kg	100%	400 mg (comenzando en C1D1)	0%

* Es posible agregar niveles de dosis adicionales y/o intermedias durante el curso del estudio. Se pueden agregar cohortes a cualquier nivel de dosis por debajo de la MTD para comprender mejor la seguridad, PK o PD. Pueden evaluarse simultáneamente múltiples niveles de dosis por debajo de la MTD para obtener datos de PK y PD en un rango de dosis.

** El nivel de dosis -1 representa las dosis de tratamiento para sujetos que requieren una reducción de la dosis desde el nivel de dosis inicial.

*** No se permiten reducciones de dosis para el anticuerpo anti-PD-1. La toxicidad relacionada con el anticuerpo anti-PD-1 se manejará por omisión o retraso.

[00281] Definición de Toxicidades Limitantes de la Dosis

[00282] Una toxicidad limitante de la dosis (DLT) se define como un evento adverso o valor de laboratorio anormal que ocurre dentro del período DLT (28 días) donde la relación con CHO hetIL-15 como agente único o la combinación CHO hetIL-15/ anti-PD-1, no se puede descartar y no está relacionada principalmente con la enfermedad, la progresión de la enfermedad, la enfermedad intercorriente o medicamentos concomitantes. La Tabla 8 enumera los criterios para DLT. Se utilizará la versión 5.0 de los Criterios de terminología común para eventos adversos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI CTCAE) para todas las calificaciones. A los efectos de las decisiones de escalada de dosis, las DLT se considerarán e incluirán en la BHLRM.

Tabla 8 Criterios para definir toxicidades limitantes de la dosis

Durante el aumento de la dosis, cualquier AE de Grado 3 o Grado 4 relacionado con el tratamiento del estudio que ocurra durante el Ciclo 1 son DLT, EXCEPTO:	
Fatiga	Fatiga de grado 3 que se resuelve a $\leq$ grado 1 en 7 días.
Hipertensión	Hipertensión de grado 3 que se resuelve dentro de los 7 días posteriores al inicio del tratamiento antihipertensivo.
Gastrointestinal	Náuseas y vómitos de grado 3 que se resuelven a $\leq$ grado 1 dentro de las 48 horas posteriores al inicio de la terapia antiemética óptima.
	Diarrea de grado 3 que se resuelve dentro de los 7 días posteriores al inicio del tratamiento antidiarreico óptimo, cuando no se sospecha colitis.
Hepático	ALT o AST de grado 3 en ausencia de un aumento significativo de la bilirrubina que se resuelve a $\leq$ grado 1 en 7 días.
Amilasa y lipasa	Amilasa o lipasa asintomática de grado ≥ 3 .
Dermatológico	Erupción no ampullosa de grado 3 sin desprendimiento epidérmico que se resuelve a $\leq$ grado 1 en los 7 días posteriores al inicio del tratamiento.
Hematología	Neutropenia de grado 3 sin fiebre u otros síntomas clínicos que se resuelven a $\leq$ Grado 1 en 7 días.
	Trombocitopenia de grado 3 sin hemorragia clínicamente significativa.
	Anemia de grado 3 que se resuelve en 7 días en ausencia de transfusión.
	La linfopenia de cualquier grado no es una DLT.
Electrolitos	Anormalidades de electrolitos de grado 3 que se resuelven a $\leq$ grado 1 dentro de los 7 días posteriores al inicio de la suplementación.
Musculoesquelético	Aumento asintomático de grado 3 de la creatina quinasa que se resuelve en 14 días en ausencia de evidencia de compromiso cardíaco.
Toxicidades relacionadas con la inmunidad *	En general, un EA de grado 3 relacionado con la inmunidad que se resuelve a $\leq$ grado 1 dentro de los 7 días posteriores al inicio del tratamiento adecuado no es una DLT.
Los siguientes EA de grado 2 relacionados con el tratamiento del estudio <u>se consideran DLT</u>:	
Trastornos oculares	El dolor ocular de grado 2 o la reducción de la agudeza visual son TLD si no responden a la terapia tópica y no mejoran a la gravedad de grado 1 dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de la terapia tópica, O si requieren tratamiento sistémico.
Neumonitis	La neumonitis de grado 2 es una DLT si no se resuelve a $\leq$ Grado 1 dentro de los 7 días posteriores al inicio de los corticosteroides.
Miocarditis	La miocarditis de grado 2 es una DLT.

Colitis	La colitis de grado 2 es una DLT si persiste > 7 días a pesar del tratamiento con corticosteroides.
Hepático	La ALT o AST de grado 2 acompañada de bilirrubina > 1,5 x ULN es una DLT.
Dermatológico	La enfermedad bullosa de grado 2 que no se resuelve a ≤ grado 1 dentro de los 7 días posteriores al inicio de los corticosteroides es una DLT.
Otros eventos adversos	Otras toxicidades clínicamente significativas, incluido un solo evento o múltiples ocurrencias del mismo evento que conducen a un retraso en la dosificación de > 14 días en el ciclo 1, pueden ser consideradas como DLT por los investigadores y Novartis, incluso si no son de grado 3 o superior según el CTCAE. .

* Dependiendo de la naturaleza del EA, puede haber casos en los que EA de grado 2–3 relacionado con el sistema inmunitario de cualquier duración justifiquen la declaración de una DLT y la interrupción permanente del estudio (por ejemplo, Síndrome de Steven Johnson (SJS)). La determinación de DLT que aún no se describe en esta tabla se realizará caso por caso después de la discusión entre el investigador y el monitor médico de Novartis.

[00283] Biomarcadores

[00284] Los análisis de biomarcadores se utilizarán para investigar el efecto de CHO hetIL–15 como agente único o en combinación con el anticuerpo anti–PD–1 a nivel molecular y celular, así como para determinar cómo los cambios en los marcadores pueden relacionarse con exposición y resultados clínicos. Además, también se explorarán los posibles marcadores predictivos de eficacia, así como los mecanismos de resistencia a hetIL–15.

Tabla 1 Plan de recolección de muestras de biomarcadores (grupo de agente único)

<i>Tipo de Muestra</i>	<i>Puntos de Tiempo/Visita</i>	<i>Volumen aproximado</i>	<i>Marcador</i>	<i>Propósito</i>
Muestras de tumores				
Biopsia de tumor recién obtenida **	Rastreo**, C1D21–D28, C3D21–D28 (si el paciente ha comenzado con anticuerpos anti–PD–1 EOT (opcional)	4–6 pases de biopsia con aguja gruesa	Caracterización del microambiente tumoral, evaluación de infiltrados de células T y células NK. Expresión de marcadores que incluyen, pero no se limitan a: CD8, PDL1, CD56, Granzima B. Análisis genómico/transcriptómico de genes inmunes y relacionados con el cáncer y abundancia clonal de células T.	Evaluar posibles biomarcadores de respuesta/resistencia
Muestras de sangre				
<i>Muestra de sangre para inmunomonitorización</i>	C1D1 (pre–dosis) C1D3 C1D4 C1D8 (pre–dosis) C1D15 (pre–dosis) C1D17 C2D1 (pre–dosis) C2D3 C2D4 C2D8 (pre–dosis) C2D15 (pre–dosis)	10 mL	Caracterización fenotípica de células inmunes activadas (por ejemplo CD8)	<i>Efecto farmacodinámico</i>

<i>Tipo de Muestra</i>	<i>Puntos de Tiempo/Visita</i>	<i>Volumen aproximado</i>	<i>Marcador</i>	<i>Propósito</i>
	C2D17 C3D1 (pre-dosis) C3D3 C3D4 C3D8 (pre-dosis) C3D15 C3D17 C4D1 (pre-dosis) C4D3 C4D4 C4D8 (pre-dosis) C4D15 C4D17			
<i>Muestra de sangre para citocinas solubles</i>	C1D1 (pre-dosis) C1D1 (8 hrs ($\pm$ 1) post-dosis) C1D2 C1D3 C1D4 C1D8 (pre-dosis) C1D15 (pre-dosis) C1D17 C3D1 (pre-dosis) C3D1 (8 hrs post) C3D3 C3D4 C3D8 (pre-dosis) C3D15 (pre-dosis) C3D17	3 mL	Análisis de citocinas (por ejemplo IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α)	<i>Caracterizar los niveles circulantes de citocinas.</i>
<i>Muestra de sangre para cfADN</i>	C1D1 (Pre-dosis), EOT	10 mL	Secuenciación de ADN en ADN libre de células	Análisis de la carga mutacional tumoral y otras alteraciones genéticas como posibles biomarcadores de respuesta/resistencia

Tabla 2 Plan de recolección de muestras de biomarcadores (combinación de CHO hetIL-15 y anticuerpo anti-PD-1 de C1D1)

<i>Tipo de Muestra</i>	<i>Puntos de Tiempo/Visita</i>	<i>Volumen aproximado</i>	<i>Marcador</i>	<i>Propósito</i>
<i>Muestras de tumores</i>				
Biopsia de tumor recién obtenida **	Rastreo**, C1D21-D28 EOT (Obligatorio si es seguro y médicamente factible)	4-6 pases de biopsia con aguja gruesa	Caracterización del microambiente tumoral, valoración de infiltrados linfocitarios. Expresión de marcadores como: CD8, PDL1, CD56, Granzima B Análisis genómico completo de genes inmunes y relacionados con el	Evaluar posibles biomarcadores de respuesta/resistencia

Tipo de Muestra	Puntos de Tiempo/Visita	Volumen aproximado	Marcador	Propósito
			cáncer y abundancia clonal de células T.	
Muestras de sangre				
<i>Muestra de sangre para inmunomonitorización</i>	C1D1 pre-dosis C1D3 C1D4 C1D8 (pre-dosis) C1D15 (pre-dosis) C1D17 C2D1 (pre-dosis) C2D3 C2D4 C2D8 (pre-dosis) C2D15 (pre-dosis) C2D17	10 mL	Caracterización fenotípica de células inmunes activadas (por ejemplo CD8)	<i>Efecto farmacodinámico</i>
<i>Muestra de sangre para citocinas solubles</i>	C1D1 (pre-dosis) C1D1 (8 hrs (±1) post-dosis) C1D2 C1D3 C1D4 C1D8 (pre-dosis) C1D15 (pre-dosis) C1D17	3 mL	Análisis de citocinas (por ejemplo IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α)	<i>Caracterizar los niveles circulantes de citocinas.</i>
<i>Muestra de sangre para cfADN</i>	C1D1 (Pre-dosis), EOT	10 mL	Secuenciación de ADN en ADN libre de células	Análisis de la carga mutacional tumoral y otras alteraciones genéticas como posibles biomarcadores de respuesta/resistencia

[00285] Se espera que CHO hetIL-15 promoverá las células T NK y CD8 + y aumentará la inmunidad antitumoral, y la terapia de combinación de CHO hetIL-15 y anticuerpo anti-PD-1 inhibirá el crecimiento tumoral.

[00286] El ejemplo 6 hetIL-15 producido por la célula CHO no tiene la variante de corte y empalme C-terminal de la cadena IL-15Ra en comparación con hetIL-15 producido por HEK293.

[00287] Se comparó la heterogeneidad por tamaño para HEK293 y CHO hetIL-15 mediante mapeo de péptidos, SDS-PAGE (condiciones nativas y reductoras), SEC, RP-HPLC y espectrometría de masas.

[00288] Como se muestra en la Figura 15, los perfiles cromatográficos de los lotes HEK293 y los lotes de CHO son significativamente diferentes. Los lotes de HEK293 exhiben un pico doble de IL-15Ra debido a la presencia de una variante de empalme que está ausente en los lotes de CHO. La ubicación de la variante de corte y empalme está en la región C-terminal del pico del receptor de IL-15. Los lotes de HEK293 y CHO son muy similares con

respecto a la distribución de los cuatro picos de IL-15 y la relación del área de los picos de IL-15Ra e IL-15. La relación de área de pico controla la estequiometría de IL-15Ra e IL-15: una relación de 2,0 corresponde a una relación molar 1: 1 de las dos cadenas.

[00289] La variante de corte y empalme de la cadena IL-15Ra se detectó solo en lotes de HEK293, que constan de 159 residuos (I1-G159) (que se muestran a continuación), que se determinó mediante mapeo de péptidos:

```
ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP
ALVHQRFAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTE
ISSHESSHGTPSQTTAKNWELADIG
```

[00290] Se entiende que los ejemplos y aspectos descritos en este documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[00291] Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

[00292] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan expresamente como referencia en su totalidad (o según lo dicte el contexto), en la misma medida que si cada una se incorporase como referencia individualmente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.