República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0619300-5 B1

(22) Data do Depósito: 06/10/2006

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: COMPOSTO DESTINADO A ESTIMULAR A VIA DE SINALIZAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA, ADJUVANTE PARA COMPOSIÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E FÁRMACO

(51) Int.Cl.: C12N 15/62; C07K 14/715; C07K 14/54; A61K 31/7088.

(30) Prioridade Unionista: 20/10/2005 EP 05 292 210.1.

(73) Titular(es): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM).

(72) Inventor(es): YANNICK JACQUES; ARIANE PLET; ERWAN MORTIER; AGNÈS QUEMENER; PATRÍCIA VUSIO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2006003917 de 06/10/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/046006 de 26/04/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/04/2008

(57) Resumo: COMPOSTO DESTINADO A ESTIMULAR A VIA DE SINALIZAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA, ÁCIDO NUCLÉICO QUE CODIFICA PARA UM COMPOSTO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, ADJUVANTE PARA COMPOSIÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA, COMPOSIÇÕES, FÁRMACO, PROCESSO IN VITRO DE INDUÇÃO E/OU ESTÍMULO DA PROLIFERAÇÃO E/OU ATIVAÇÃO DE CÉLULAS IL-15R BETA/GAMA-POSITIVAS, PROCESSO IN VITRO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS T E/OU NK ATIVADAS E USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO A presente invenção se refere ao estímulo da via de sinalização de IL-15R beta/gama, de forma a induzir e/ou estimular a ativação e/ou proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células NK e/ou T. Compostos apropriados incluem compostos que compreendem pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, direta ou indiretamente ligada por meio de covalência a pelo menos um polipeptídeo que contém o domínio sushi da região extracelular de IL-15R alfa.

“COMPOSTO DESTINADO A ESTIMULAR A VIA DE SINALIZAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA, ADJUVANTE PARA COMPOSIÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E FÁRMACO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se ao campo de respostas biológicas induzidas por citocina ou estimuladas por citocina, mais especificamente ao campo de respostas biológicas induzidas por IL-15 e/ou estimuladas por IL-15 e, especialmente, ao campo das respostas biológicas que envolvam via de sinalização de IL15Rβ/γ.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] IL-15 é uma citocina que, como IL-2, foi descrita originalmente como fator de crescimento de células T (1). As duas citocinas pertencem à família de feixes de quatro hélices α e os seus receptores de membranas compartilham duas subunidades (as cadeias IL-2R/IL-15R β e γ) responsáveis pela transdução de sinais (2). O complexo IL-2Rβ/γ é receptor de afinidade intermediário para as duas citocinas. Ele é expresso principalmente pela maior parte das células NK e pode ser ativado *in vitro* por concentrações nanomolares de IL-2 ou IL-15.

[003] Receptores de IL-2 e IL-15 com alta afinidade, que são expressos, por exemplo, sobre células T ativadas e que podem ser ativados com concentrações picomolares de cada citocina, contêm ainda sua própria cadeia α privada (IL-2Rα e IL-15Rα) que confere especificidade de citocinas e aumenta a afinidade de ligação de citocinas (3).

[004] As duas citocinas desempenham papéis fundamentais na imunidade inata e adaptativa. Embora experimentos *in vitro* iniciais tenham demonstrado grande sobreposição funcional (indução da proliferação e citotoxicidade de linfócitos ativados e células NK, coestímulo da proliferação de células B e síntese de imunoglobulina, quimiotaxia de células T) (1,4-6), experimentos mais recentes indicaram que as duas citocinas exercem ações complementares e até contrastantes *in vivo*. Embora o *knock out* de IL-2 ou IL-2Rα em camundongos fosse associado a fenótipos auto-imunes com maiores populações de células B e T ativadas, o *knock out* de IL-15 e IL-15Rα resultou em defeitos específicos em NK, NK-T, linfócitos intra-epiteliais e células T de memória CD8 (7, 8). Além disso, IL-2 promove tolerância periférica por meio da indução de morte celular induzida por ativação (AICD), enquanto IL-15 inibe AICD mediada por IL-2 (9) e, ao contrário de IL-2, IL-15 é fator de sobrevivência para células T de memória CD8 (10).

[005] Seguindo estas observações, sugeriu-se que o papel principal de IL-2 é limitar a expansão contínua de células T ativadas, enquanto IL-15 é fundamental para o início da divisão de células T e a sobrevivência de células T de memória (11).

[006] Foi descrito mecanismo inovador da transapresentação de IL-15, no qual IL-15 e IL-15Rα são expressos coordenadamente por células que apresentam antígenos (monócitos, células dendríticas) e IL-15 ligado a IL-15Rα é apresentado em trans para células T CD8 ou NK vizinhas que expressam apenas o receptor IL-15Rβ/γ (12). A transapresentação de IL-15 como evento coestimulante que ocorre na sinapse imunológica aparentemente é agora mecanismo dominante de ação de IL-15 *in vivo* (13, 14). Sugere-se que ele desempenha papel importante na imunossupervisão de tumores (15).

[007] As subunidades IL-15Rα e IL-2Rα formam subfamília de receptores de citocina, pelo fato de que eles compreendem, nas suas partes

extracelulares N-terminais, os chamados domínios estruturais “sushi” (um em IL-15Rα, dois em IL-2Rα) também encontrados em moléculas de adesão ou complemento (16). Nos dois casos, demonstrou-se que esses domínios sushi contêm a maior parte dos elementos estruturais responsáveis pela ligação de citocinas.

[008] Embora IL-2Rα isoladamente seja receptor de baixa afinidade para IL-2 (Kd = 10 nM), IL-15Rα se liga a IL-15 com alta afinidade (Kd = 100 pm). A divisão de IL-2Rα por meio de proteólise é mecanismo natural que participa da regulagem para baixo da ativação de linfócitos. IL-2Rα é dividido por Der p1, alérgeno de ácaros importante, para inibir células Th1 e favorecer ambiente alérgico (17) e por metaloproteinases derivadas de tumores para suprimir a proliferação de células T encontradas no câncer (18). O IL-2Rα solúvel gerado desta forma é inibidor competitivo da ação de IL-2 *in vitro*. Ele permanece, entretanto, aglutinante de IL-2 com baixa afinidade e não é propenso a participar eficientemente da regulagem para baixo da atividade de IL-2 *in vivo*.

[009] Descobriu-se recentemente que forma solúvel do IL-15Rα humano pode também ser liberada naturalmente de células IL-15Rα positivas por meio de processo de divisão que envolve MMPs (19). Ao contrário de IL-2Rα solúvel, este receptor de IL-15Rα solúvel foi capaz de se ligar a IL-15 com alta afinidade e bloqueia eficientemente a proliferação dirigida por meio do complexo de sinalização de IL-15Rα/β/γ com alta afinidade. Este resultado foi consistente com o conceito de sIL-15Rα que se comporta, como o seu homólogo sIL-2Rα, como antagonista e com efeitos inibidores de sIL-15Rα de camundongo *in vitro* ou *in vivo* (20, 21).

[010] Aqui, os inventores da presente invenção demonstram que fragmento que consiste essencialmente do domínio sushi de IL-15R alfa (= IL-15Rα) possui ação oposta.

[011] Esse fragmento é capaz de aumentar a ligação, bem como a bioatividade de IL-15 através do receptor de afinidade intermediária IL-15R beta/gama (= IL-15Rβ/γ), sem afetar aqueles através do receptor de alta afinidade. Além disso, os inventores do presente pedido descrevem proteínas de fusão que se comportam como potentes superagonistas do complexo IL-15Rβ/γ. Estas proteínas de fusão compreendem entidade de ligação de IL-15R beta/gama, tal como IL-15 (ou seu fragmento conservado, agonista ou mimético), fundido por meio de covalência, por exemplo, por ligante flexível, a IL-15Rα ou a fragmento de IL-15R alfa que tenha retido o domínio sushi de IL-15R alfa.

[012] Até onde sabem os inventores, existe somente um documento do estado da técnica que relata efeito estimulante para composto que compreende elemento relativo a IL-15R alfa, nomeadamente a forma disponível comercialmente de IL-15R alfa solúvel.

[013] Trata-se da publicação de Giron-Michel *et al*, que é intitulada *Membrane-Bound and Soluble IL-15/IL-15R Alpha Complexes Display Different Signalling and Functions on Human Haematopoietic Progenitors* (*Blood*, primeiro de outubro de 2005, vol. 106, nº 7, págs. 2302-2310; previamente publicado online em junho de 2005).

[014] A publicação de Giron-Michel *et al* descreve que (vide Figura 7 de Giron-Michel *et al*):

- IL-15 recombinante (rIL-15) induz efeito antiapoptótico significativo quando utilizado em dose de 10 ng/ml; e

- rIL-15 não induz nenhum efeito antiapoptótico significativo em dosagem de 0,1 ng/ml; mas

- rIL-15 em dose de 0,1 ng/ml induz efeito antiapoptótico significativo quando utilizado com a forma disponível comercialmente de IL-15R alfa solúvel.

[015] O IL-15R alfa solúvel que é utilizado por Giron-Michel *et al* é a forma disponível comercialmente de IL-15R alfa (disponível por meio da R&D Systems, sob referência 147-IR). Este IL-15R alfa solúvel é forma modificada de IL-15R alfa solúvel, que não contém exon 3. A forma de IL-15R alfa solúvel que é utilizada por Giron-Michel *et al* compreende, desta forma, a parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa, ligada diretamente à parte codificada por exon 4 de IL-15R alfa, sem comprometer nenhuma parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa. A forma de IL-15R alfa solúvel que é utilizada pro Giron-Michel *et al* não corresponde, portanto, a fragmento de IL-15R alfa, mas a uma de suas formas modificadas.

[016] A forma de IL-15R alfa solúvel que é utilizada por Giron-Michel *et al* compreende adicionalmente fragmento de Fc (IgG humano) a ela ligado por meio de covalência. Fragmento de Fc não se liga a IL-15R beta/gama. A publicação de Giron-Michel *et al*, portanto, não descreve nenhum composto em que a forma IL-15R alfa solúvel seria ligada por meio de covalência a entidade de união ligação de IL-15R beta/gama.

[017] A publicação de Giron-Michel *et al* descreve adicionalmente efeito antiapoptótico, mas não descreve nenhum efeito sobre a proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama-positivas. Pode-se ainda observar que o teste de efeito antiapoptótico descrito não compreende nenhuma amostra de controle que pudesse conter (i) o fragmento de IL-15R alfa-Fc solúvel na ausência de rIL-15 ou (ii) IL-15R alfa solúvel sem nenhum fragmento de Fc. O efeito antiapoptótico descrito não pode ser atribuído diretamente, portanto, à parte IL-15R alfa do composto que é utilizado.

[018] A publicação de Giron-Michel *et al* não contém ainda nenhuma indicação do domínio sushi de IL-15R alfa (nem a região de articulação que é ausente da forma IL-15R alfa solúvel que está sendo utilizada nesse

documento do estado da técnica), nem contém indicação quanto à via de sinalização de IL-15beta/gama.

[019] A presente invenção descreve, pela primeira vez, as unidades estruturais que são necessárias e, especialmente, vantajosas para a indução e/ou o estímulo de ação biológica IL-15, o acionamento específico das vias de sinalização de IL-15beta/gama e a indução e/ou o estímulo da proliferação de células NK e/ou T. A presente invenção apresenta, portanto, contribuição técnica sobre o estado da técnica, o que permite aplicações biológicas e médicas anteriormente não atingidas.

[020] Portanto, quando analisada em base *a priori*, a publicação de Giron-Michel não ensina a invenção reivindicada para os técnicos comuns no assunto, nem orienta os técnicos no assunto quanto à invenção reivindicada.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[021] A presente invenção refere-se à via de sinalização de IL-15R beta/gama e à indução e/ou estímulo da ativação e/ou proliferação de IL-15R beta/gama-positivas e/ou prevenção de apoptose, tal como células T e/ou NK.

[022] A presente invenção descreve que a região extracelular de IL-15R alfa pode agir como agonista da ação biológica de IL-15, por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama. A presente invenção descreve notadamente que pode estimular e/ou induzir a proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama positivas e/ou prevenção de apoptose, tal como células T e/ou NK.

[023] A presente invenção descreve que a unidade estrutural mínima contida nesta região extracelular IL-15R alfa, que é necessária para exercer essa ação agonista, é o domínio sushi de região extracelular IL-15R alfa.

[024] A presente invenção descreve, ainda, que a região de articulação e extremidade desta região extracelular IL-15R alfa aprimora significativamente a eficiência desta ação agonista.

[025] A presente invenção fornece, ainda, compostos que exibem aumento de 30 a 150 vezes da bioatividade, em comparação com IL-15 do tipo selvagem e que são ainda mais potentes que a simples associação de domínio sushi de IL-15R alfa solúvel e IL-15.

[026] A presente invenção refere-se aos objetos descritos no capítulo de descrição detalhada e, mais especificamente, aos definidos nas reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1. AFINIDADES DE LIGAÇÃO DAS VÁRIAS PROTEÍNAS IL-15Rα SOLÚVEIS PARA IL-15.

[027] Sensorgramas de SPR da ligação (fases de associação e dissociação) de crescentes concentrações de rIL-15 (3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 e 100 nM) para (A) sIL-15Rα-IL-2, (B) sIL-15Rα-sushi-IL-2 ou (C) IL-15Rα-sushi imobilizados. (D): Estudos de competição de sIL-15Rα-sushi (◊), sIL-15Rα-IL-2 (♦) ou sIL-15Rα-sushi-IL-2 (Δ) com rIL-15 radioiodado (200 pM) unindo-se a células TF-1. Sensorgramas SPR da ligação (fases de associação e de dissociação) de concentrações crescentes de rIL-15 (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 nM) a (E) sIL-15Rα-Sushi + imobilizado.

FIG. 2. EFEITOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO INDUZIDA POR IL-15 ATRAVÉS DE IL-15Rβ/γ.

[028] A proliferação de células Mo-7 foi avaliada por meio da incorporação de [^{3}H]-timidina. Células foram cultivadas com concentrações crescentes de rIL-15 humano (A) ou rIL-2 humano (B), na ausência (●) ou presença (◊) de concentração fixa (10 nM) de sIL-15Rα-sushi. (C): células foram cultivadas na presença de 1 nM de rIL-15, sem (●) ou com

concentrações crescentes de sIL-15Rα-sushi (◊). (D): células foram cultivadas com concentrações crescentes de rIL-15 (●), mistura equimolar de IL-15 e sIL-15Rα-sushi (◊), RLI (▲) ou proteína de fusão ILR (Δ). (E): construções moleculares utilizadas para expressar proteínas de fusão ILR e RLI. IL-15Rα sp: peptídeo de sinal IL-15Rα humano, ppl sp: peptídeo de sinal de preprolactina bovina. (F): estruturas de modelo tridimensional das proteínas de fusão.

FIG. 3: EFEITOS SOBRE A PREVENÇÃO DE APOPTOSE INDUZIDA POR IL-15 ATRAVÉS DE IL-15Rβ/γ.

[029] Apoptose foi avaliada por meio de expressão da superfície celular de Anexina V utilizando Citometria de Fluxo. Histograma completo (Aa) representa manchas de anexina V sobre Mo-7 no início do experimento. Células foram cultivadas por 48 horas, sem (Ab) ou com concentração fixa de rIL-15 humano (500 pM) (Ac), na ausência (histograma completo) ou presença de sIL-15Rα-sushi (10 nM) (linha contínua). (B): cinética da expressão de Anexina V sobre células Mo-7 na ausência de citocina exógena (●) ou na presença de rIL-15 (500 pM) (○), sIL-15Rα-sushi (10 nM) (□), sIL-15Rα-sushi (10 nM) mais rIL-15 (500 pM) (◊) ou RLI (500 pM) (▲). (C): células Mo-7 foram cultivadas com concentrações crescentes de rIL-15, na ausência (○) ou presença (◊) de concentração fixa (10 nM) de sIL-15Rα-sushi, ou com concentrações crescentes de RLI (▲).

FIG. 4: EFEITO AGONISTA DE SIL-15Rα-SUSHI SOBRE A LIGAÇÃO DE IL-15 A IL-15Rβ/γ.

LIGAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE RLI.

[030] (A): ligação de rIL-15 ^{125}I-marcado a células Mo7 na ausência (■) ou presença de 10 nM de sIL-15Rα-sushi (□). (B): ligação de proteína de fusão RLI ^{125}I-marcada. Em gráficos menores, são exibidas

plotagens Scatchard. (C): internalização de proteína de fusão de RLI ^{125}I-marcada (500 pM).

FIG. 5: EFEITOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR IL-15 E APOPTOSE POR MEIO DE RECEPTORES IL-15Rα/β/γ.

[031] Incorporação de [^{3}H]-timidina por células Kit 225 (A) e TF-1β (B) cultivadas com concentrações crescentes de rIL-15 (●), mistura equimolar de rIL-15 e sIL-15Rα-sushi (◊) ou proteína de fusão RLI (▲) ou ILR (Δ). (C): manchas com Anexina V de TF-1β no início do experimento (Ca), em 48 horas após a cultura sem (Cb) ou com concentração fixa de rIL-15 humano (500 pM) (Cc), na ausência (histograma completo) ou presença de proteína sIL-15Rα-sushi (10 nM) (linha contínua) ou na presença de 10 pM de RLI (Cd). (D): cinética de manchas na ausência de citocina exógena (○) ou na presença de rIL-15 (10 pM) (●), sIL-15Rα-sushi (10 nM) (□), sIL-15Rα-sushi (10 nM) mais rIL-15 (10 pM) (◊) ou proteína de fusão RLI (10 pM) (▲). (E): manchas em 48 horas após a cultura com concentrações crescentes de rIL-15, na ausência (●) ou presença (◊) de concentração fixa (10 nM) de sIL-15Rα-sushi ou com concentrações crescentes de proteína de fusão RLI (▲).

FIG. 6: LIGAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE SIL-15Rα-SUSHI E RLI SOBRE CÉLULAS TF-1β.

EFEITOS DE SIL-15Rα-SUSHI SOBRE A LIGAÇÃO DE IL-15.

[032] (A) curva de saturação de ligação de rIL-15 ^{125}I-marcado na ausência (■) ou presença de 10 nM de sIL-15Rα-sushi (□). (B): efeito de concentrações crescentes de sIL-15Rα-sushi sobre a ligação em concentração fixa de rIL-15 radioiodado (200 pM). (C): curva de de saturação de ligação de sIL-15Rα-sushi ^{125}I-marcado na presença de 1 nM de rIL-15 e (D) internalização subseqüente. (E): curva de saturação de ligação de RLI ^{125}I-marcado e (F) internalização subseqüente.

FIG. 7: MODELOS PROPOSTOS PARA OS EFEITOS DIFERENCIAIS DE SIL-15Rα E SIL-15Rα-SUSHI.

[033] (A) No contexto de receptores de IL-15Rα/β/γ, sIL-15Rα concorre com IL-15Rα de membrana para se ligar a IL-15. (B) No contexto de receptores de IL-15Rβ/γ, sIL-15Rα-sushi realiza complexo com IL-15 que ativa o complexo IL-15Rβ/γ mais eficientemente que IL-15 isoladamente. As proteínas de fusão RLI ou ILR amplificam este efeito agonista. (C) No contexto de receptores de IL-15Rα/β/γ, sIL-15Rα-sushi não é eficiente para competir com IL-15Rα de membrana, ou compete com IL-15Rα de membrana e o complexo de sIL-15Rα-sushi com IL-15 ativa complexos IL-15Rβ/γ em excesso como em (B).

FIGS. 8 A 42 EXIBEM SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS NUCLÉICOS

[034] As SEQ IDs encontram-se relacionados na Tabela 4 (a Tabela 4 está localizada após as referências bibliográficas, antes das reivindicações).

[035] Fig. 8: cDNA de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 1).

[036] Fig. 9: CDS de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 2) e proteína IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 3).

[037] Fig. 10: CDS e sequências de aminoácidos do peptídeo de sinal de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 4 e Nº 5) e de peptídeo maduro (SEQ ID Nº 6 e Nº 7).

[038] Fig. 11: sequências de ácidos nucléicos de exons 1 a 5 de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 8 a 12).

[039] Fig. 12: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos do domínio sushi de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 13 a 14) e de fragmento de IL-15R alfa do tipo selvagem humano que compreende o domínio sushi (SEQ ID Nº 15 e Nº 16).

[040] Fig. 13: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento de IL-15R alfa do tipo selvagem humano que compreende o domínio sushi (SEQ ID Nº 17 e Nº 18).

[041] Fig. 14: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos da articulação de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 19 e Nº 20) e de fragmentos desta região de articulação.

[042] Fig. 15: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmentos de IL-15R alfa do tipo selvagem humano que compreende o domínio sushi e fragmento de região de articulação (SEQ ID Nº 21 a 24).

[043] Fig. 16: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmentos de IL-15R alfa do tipo selvagem humano que compreende o domínio sushi e fragmento de região de articulação (SEQ ID Nº 25 a 28).

[044] Fig. 17: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento de IL-15R alfa do tipo selvagem humano que compreende o domínio sushi e a região de articulação (SEQ ID Nº 29 e 30).

[045] Fig. 18: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos da região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 31 e 32).

[046] Fig. 19: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos da parte codificada por exon 3 da região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 33 e 34) e de fragmento de IL-15R alfa que compreende o domínio sushi, a região de articulação e a parte codificada por exon 3 da região rica em sítios de glicosilação (SEQ ID Nº 35 e 36).

[047] Fig. 20: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento de região extracelular solúvel de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 37 e 38).

[048] Fig. 21: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de região extracelular solúvel de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 39 e 40).

[049] Fig. 22: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento de domínio extracelular de IL-15R humano solúvel com peptídeo de sinal excluído (SEQ ID Nº 41 e 42).

[050] Fig. 23: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de domínio extracelular de IL-15R alfa humano solúvel com peptídeo de sinal excluído (SEQ ID Nº 43 e 44).

[051] Fig. 24: sequência de ácidos nucléicos de IL-15 do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 45).

[052] Fig. 25: sequência de aminoácidos de proteína precursora de IL-15 do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 46), sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de IL-15 maduro do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 47 e 48).

[053] Fig. 26: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de dois ligantes flexíveis (ligante 20, SEQ ID Nº 49 e 50; ligante 26, SEQ ID Nº 51 e 52).

[054] Fig. 27: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de marcador Flag e sítio de ligação Xa (SEQ ID Nº 53 a 56) de peptídeo de sinal preprolactina bovina (SEQ ID Nº 57 e 58) e sequência de ácidos nucléicos de IL-15R e sequências Kozak de preprolactina.

[055] Fig. 28: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de RLI (proteína de fusão de acordo com a presente invenção; SEQ ID Nº 59 e 60). Proteína de fusão RLI = peptídeo de sinal de IL-15R alfa + marcador Flag e sítio de ligação de Xa + it + sushi + rd + onze aa codificados por exon 3 + ligante 20 + IL-15 maduro do tipo selvagem humano.

[056] Fig. 29: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de ILR (proteína de fusão de acordo com a presente invenção; SEQ ID Nº 61 e 62). Proteína de fusão ILR = peptídeo de sinal de preprolactina bovina + marcador Flag e sítio de ligação de Xa + IL-15 maduro do tipo selvagem humano + ligante 26 + it + sushi + i + rd + onze aminoácidos codificados por exon 3.

[057] Fig. 30: sequência de ácidos nucléicos de IL-2 do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 63).

[058] Fig. 31: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de IL-2 maduro do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 64 e 65) e de ligante utilizado para marcar fragmento que contém sushi de IL-15R alfa com IL-2.

[059] Fig. 32: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento que contém sushi de IL-15R alfa, marcado com IL-2 (SEQ ID Nº 66 e 67).

[060] Fig. 33: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de fragmento que contém sushi de IL-15R alfa (fragmento de IL-15R alfa extracelular), marcado com IL-2 (SEQ ID Nº 68 e 69).

[061] Fig. 34: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de IL-15R alfa de *Mus musculus* (SEQ ID Nº 72 e 73).

[062] Fig. 35: sequências de aminoácidos de região extracelular de IL-15R alfa de *Mus musculus* (SEQ ID Nº 74), domínio sushi (SEQ ID Nº 75), região de articulação (SEQ ID Nº 76) e região de extremidade (SEQ ID Nº 77).

[063] Fig. 36: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de IL-15R alfa de *Pan troglodytes* (SEQ ID Nº 78 e 79).

[064] Fig. 37: sequências de aminoácidos de região extracelular de IL-15R alfa de *Pan troglodytes* (SEQ ID Nº 80), domínio sushi (SEQ ID Nº 81), região de articulação (SEQ ID Nº 82) e região de extremidade (SEQ ID Nº 83).

[065] Fig. 38: sequências de aminoácidos e ácidos nucléicos de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (SEQ ID Nº 84 e 85).

[066] Fig. 39: sequências de aminoácidos de região extracelular de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (SEQ ID Nº 86), domínio sushi (SEQ ID Nº 87), região de articulação (SEQ ID Nº 88) e região de extremidade (SEQ ID Nº 89).

[067] Fig. 40: sequência de ácidos nucléicos do exon 3 de IL-15R alfa de *Mus musculus* (SEQ ID Nº 90), de IL-15R alfa de *Pan troglodytes* (SEQ ID Nº 91) e de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (SEQ ID Nº 92).

[068] Fig. 41: sequência de aminoácidos da parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa humano (SEQ ID Nº 93), de IL15-R alfa de *Mus musculus* (SEQ ID Nº 94), de IL-15R alfa de *Pan troglodytes* (SEQ ID Nº 95) e de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (SEQ ID Nº 96).

[069] Fig. 42: sequência de aminoácidos da parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa humano (SEQ ID Nº 24), de IL15-R alfa de *Mus musculus* (SEQ ID Nº 97), de IL-15R alfa de *Pan troglodytes* (SEQ ID Nº 98) e de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (SEQ ID Nº 99).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[070] A presente invenção refere-se a IL-15R alfa e a fragmentos de IL-15R alfa que compreendem pelo menos um domínio sushi de IL-15R alfa.

[071] A presente invenção refere-se a produtos que podem destinar-se ao estímulo da via de sinalização de IL-15R beta/gama para desta forma induzir e/ou estimular a ativação e/ou proliferação e/ou prevenção de apoptose de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células NK e/ou T.

[072] A presente invenção refere-se à polipeptídeos que contêm sushi isolados, que contêm o domínio sushi que é compreendido na região extracelular de IL-15R alfa, ou seja, refere-se ao fragmento isolado que consiste de região extracelular de IL-15R alfa e a seus subfragmentos que tenham retido o domínio sushi.

[073] Os polipeptídeos que contêm sushi de acordo com a presente invenção podem ser ligados por meio de covalência ou não ligados por meio de covalência a pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[074] A presente invenção refere-se mais especificamente a composto ligado covalentemente que compreende pelo menos esse polipeptídeo que contém sushi, ligado direta ou indiretamente por meio de covalência a pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama. Esse composto pode possuir aumento da bioatividade em 30 a 150 vezes, em comparação com IL-15 do tipo selvagem, e ser mais potente que a livre associação de IL-15 e domínio sushi IL-15R alfa solúvel.

ENTIDADE DE LIGAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA:

[075] Além do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi, o mencionado composto ligado covalentemente de acordo com a presente invenção compreende pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[076] A mencionada entidade de ligação de IL-15R beta/gama é preferencialmente IL-15, fragmento de IL-15, mimético ou agonista, em que o mencionado fragmento de IL-15, mimético ou agonista possui afinidade de ligação a IL-15R beta/gama que não é significativamente mais baixa que a de IL-15 nativo.

[077] O mencionado IL-15 pode ser qualquer IL-15, tal como IL-15 humano, IL-15 de mamífero não humano ou IL-15 não de mamífero.

[078] São IL-15 de mamíferos não humanos ilustrativos IL-15 de macaco, IL-15 murino (tal como IL-15 de camundongo com número de acesso NM_008357; IL-15 de rato com número de acesso NM_013129), IL-15 de coelho (tal como número de acesso DQ157152), IL-15 de carneiro (tal como número de acesso NM_001009734) ou IL-15 de porco (tal como número de acesso

NM_211390). IL-15 não de mamífero ilustrativo é galinha (tal como número de acesso NM_204571).

[079] De maior preferência, o mencionado IL-15 é IL-15 humano. De preferência superior, a sequência de aminoácidos do mencionado IL-15 humano é a sequência de SEQ ID Nº 48.

[080] IL-15 não se liga a IL-2R alfa. Em vista das aplicações médicas e biológicas contempladas pela presente invenção, o mencionado fragmento, mimético ou agonista de IL-15 preferencialmente não se liga a IL-2R alfa.

[081] Os termos “agonista” e “mimético” são fornecidos no presente pedido considerando o seu significado comum no campo.

[082] Composto é denominado agonista de IL-15 quando induzir resposta biológica que é de nível similar ou superior à induzida por IL-15 nativo. Agonistas preferidos são aqueles que induzem nível ainda mais alto de resposta biológica (superagonistas).

[083] Agonista de IL-15 possui tipicamente afinidade para ligação a IL-15R alfa e/ou a IL-15R beta/gama que é pelo menos não significativamente diferente do IL-15 nativo e que preferencialmente é significativamente mais alta que a de IL-15 nativo.

[084] Mimético (ou mimetopo) de IL-15 designa qualquer composto que seja capaz de imitar as ações biológicas de IL-15.

[085] Na presente invenção, miméticos ou agonistas de IL-15 preferidos são aqueles que são capazes de imitar a ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama. Esse mimético de IL-15 preferido possui, portanto, a capacidade de ligar-se ao complexo IL-15beta/gama e, desta forma, induzir e/ou estimular a transdução de sinal biológico por meio do mencionado complexo de IL-15R beta/gama. Miméticos ou agonistas de IL-15 preferidos de acordo com a presente invenção possuem afinidade de ligação

a IL-15R beta/gama que é ao menos não significativamente diferente de IL-15 nativo e que preferencialmente é significativamente mais alta que a de IL-15 nativo. Agonistas ou miméticos apropriados foram descritos, por exemplo, no Pedido PCT Internacional nº PCT/EP 2005/002367, depositado em 10 de fevereiro de 2005, em nome de INSERM.

POLIPEPTÍDEO QUE CONTÉM SUSHI:

[086] A sequência de aminoácidos do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi:

- é a sequência de aminoácidos da região extracelular de IL-15R alfa (a mencionada região extracelular de IL-15R alfa compreende domínio sushi de IL-15R alfa); ou

- é a sequência de aminoácidos de fragmento da região extracelular de IL-15R alfa, em que o mencionado fragmento reteve o domínio sushi da mencionada região extracelular de IL-15R alfa, em que o mencionado domínio sushi é definido como iniciando no primeiro resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C1) e terminando no quarto resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C4), em que os resíduos C1 e C4 são ambos incluídos no domínio sushi; ou

- é sequência de aminoácidos variantes que reteve cada um dos quatro resíduos de cisteína (C1, C2, C3 e C4) do mencionado domínio sushi.

[087] Definição alternativa da definição é que ela começa no primeiro resíduo de cisteína (C1) após o peptídeo de sinal e termina no quarto resíduo de cisteína (C4) após o peptídeo de sinal.

[088] A mencionada sequência de aminoácidos variante pode compreender sequência variante conservada de domínio sushi de IL-15R alfa.

[089] Essa sequência variante conservada de domínio sushi de IL-15R alfa deriva da sequência de domínio sushi parental, por meio de pelo menos uma exclusão e/ou pelo menos uma substituição e/ou pelo menos uma

adição de aminoácido, mas reteve a capacidade de pelo menos uma das características a seguir:

i. aumento da afinidade de IL-15 para IL-15R beta/gama;

ii. indução e/ou estímulo de efeito antiapoptótico sobre células beta/gama-positivas e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas;

iii. aumento da eficiência da ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama, ou seja, indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células beta/gama-positivas e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas ou em repouso.

[090] Preferencialmente, as mencionadas variantes conservadas retiveram a característica descrita em iii acima.

[091] Linhagens celulares apropriadas para testar as características mencionadas acima são células IL-15R beta/gama-positivas IL-15R alfa-negativas. Ilustra estas linhagens celulares a linhagem celular 32D, que pode ser transfectada com cadeia beta e gama (tal como cadeia beta humana e gama humana).

[092] Alternativamente, células T e/ou NK nativas ou em repouso podem ser purificadas a partir de amostra biológica, tal como amostra de sangue.

[093] Preferencialmente, a mencionada sequência de aminoácidos variantes é pelo menos 85% idêntica à sequência de aminoácidos dessa região extracelular de IL-15R alfa ou desse fragmento de região extracelular de IL-15R alfa, ao longo de todo o comprimento dessa sequência de região extracelular de IL-15R alfa ou de fragmento de região extracelular de IL-15R alfa.

[094] De maior preferência, este percentual de identidade de sequências é de pelo menos 90%, de preferência ainda maior pelo menos 92%,

de preferência superior pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%.

[095] Essas sequências de aminoácidos variantes notadamente englobam os polimorfismos de IL-15R alfa que ocorrem naturalmente em espécie animal, bem como variantes conservadas que podem ser produzidas pelos técnicos comuns no assunto.

IL-15R ALFA:

[096] Exon 1 de IL-15R alfa codifica o peptídeo de sinal de IL-15R alfa.

[097] Exon 2 de IL-15R alfa codifica o domínio sushi de IL-15R alfa.

[098] Parte 5'-terminal de exon 3 codifica a região conhecida como a região de articulação de IL-15R alfa.

[099] A parte restante de exon 3, bem como os demais exons extracelulares (ou seja, exon 4, exon 5 e parte 5' de exon 6 para IL-15R alfa humano, bem como para a maior parte das espécies), codificam região rica em sítios de glicosilação, também conhecidos como região de extremidade de IL-15R alfa.

[0100] Os exons de IL-15R alfa restantes (ou seja, parte 3' de exon 6, bem como exon 7 para IL-15R alfa humano, bem como para a maior parte das espécies) codificam as regiões transmembrana e intracitoplasmáticas de IL-15R alfa.

[0101] Convenientemente, em vista das aplicações médicas da presente invenção, o mencionado IL-15R alfa é preferencialmente IL-15R alfa humano.

[0102] A sequência de aminoácidos do mencionado IL-15R alfa humano é de maior preferência a sequência de IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 (267 aminoácidos). A região extracelular do IL-15R alfa humano de SEQ ID

Nº 3 contém a sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 40 (1..209 de SEQ ID Nº 3). A forma com peptídeo de sinal excluído de SEQ ID Nº 40 é relacionada como SEQ ID Nº 44 (31..209 de SEQ ID Nº 3).

[0103] Alguns alelos humanos de IL-15R alfa podem possuir aminoácido Thr (aminoácido t, codificado por act, acc, aca ou acg), no lugar de aminoácido Asn (aminoácido n, codificado por aat ou aac) na posição 182 de SEQ ID Nº 3. Essas variantes são de ocorrência natural e são funcionais.

[0104] No presente pedido, essas variantes de ocorrência natural alélicas de IL-15R alfa humano destinam-se a ser equivalentes às sequências de IL-15R alfa humano de referência de SEQ ID Nº 3 (sequência de aminoácidos) e SEQ ID Nº 1 ou Nº 2 (sequências de cDNA e CDS) e às sequências IL-15R alfa humanas de referência de que derivam diretamente, ou seja, as sequências de região extracelular de SEQ ID Nº 40 ou Nº 44 (sequências de aminoácidos) e SEQ ID Nº 39 e Nº 43 (sequências de CDS).

[0105] As posições dos sete exons do IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 são conforme descrito na Tabela 1 a seguir.

[0106] Neste particular, observe que as posições de exon 1 são 1..170 e as de exon 2 são 171..365, conforme descrito na Tabela 1 abaixo, e que não são 1..171 e 172..365, conforme declarado na sequência disponível com número de acesso U31628.

TABELA 1

	CDS IL-15R alfa humano (SEQ ID Nº 2)
Exon 1	1..170
Exon 2	171..365
Exon 3	366..464
Exon 4	465..665
Exon 5	666..698
Exon 6	699..774
Exon 7	775..883

[0107] As posições das diferentes regiões e partes do IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 são exibidas na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

		IL-15R alfa humano	
		Posições de CDS em SEQ ID Nº 1	Posições de aminoácidos em SEQ ID Nº 3
Peptídeo de sinal		83..172	1..30
Proteína IL-15R alfa		173..883	31..267
Partes de proteína IL-15R alfa humana	Peptídeo de sinal	83..172	1..30
	Parte codificada por Exon 2, que contém o domínio sushi (it-sushi-i)	173..364	31..94
	Região de articulação (irdpalvhqrpapp)	362..403	94..107
	Região rica em sítios de glicosilação	404..709	108..209
	Parte de transmembrana	710..766	210..228
	Parte intracitoplasmática	767..883	229..267

[0108] No presente pedido, o símbolo de pontos duplos (« .. ») colocado entre primeiro número e segundo número descreve sequência isolada que é idêntica à sequência que se estende da posição “primeiro número” até a posição “segundo número”.

[0109] No presente pedido, quando sequências forem definidas por posições de “início” e “parada”, estas posições de início e parada destinam-se a ser incluídas na sequência descrita.

[0110] Para algumas aplicações biológicas, tais como testes preliminares, pesquisa, desenvolvimento, seleção de compostos ou células, estudos clínicos e pré-clínicos (incluindo testes relativos a qualidades farmacológicas, toxicológicas, farmacocinéticas ou biológicas, bem como

“determinação de risco-benefício” e testes relativos à segurança), IL-15R alfa de mamífero não humano pode, entretanto, ser utilizado.

[0111] IL-15R alfa de mamífero não humano preferido compreende notadamente IL-15R alfa de macaco (tal como IL-15R alfa de chimpanzé) ou IL-15R alfa murino (tal como IL-15R alfa de camundongo, IL-15R alfa de rato) ou IL-15R alfa de coelho, ou IL-15R alfa de porco.

[0112] Sequências de aminoácidos IL-15R alfa ilustrativas desse IL-15R alfa de mamífero não humano são as codificadas pelas sequências de ácidos nucléicos disponíveis como número de acesso NM_008358 (IL-15R alfa de *Mus musculus*; sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 72, sequência amino de SEQ ID Nº 73), como número de acesso XM_521684 (IL-15R alfa de *Pan troglodytes*: sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 78, sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 79) ou como número de acesso XM_577598 (IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*; sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 84, sequência amino de SEQ ID Nº 85). Vide Figuras 40, 41 e 42 para sequências e posições exon 2 e exon 3 de IL-15R alfa humano.

REGIÃO EXTRACELULAR DE IL-15R ALFA:

[0113] A região extracelular de IL-15R alfa normalmente é definida como a região de sequência de IL-15R alfa que se estende a partir do seu primeiro aminoácido N-terminal até o último aminoácido da região de extremidade (ou região rica em sítios de glicosilação). Conforme descrito com mais detalhes abaixo, a região de extremidade de sequência IL-15R alfa pode ser determinada pelos técnicos no assunto, tal como com o auxílio de software.

[0114] A mencionada região extracelular de IL-15R alfa é região extracelular de IL-15R alfa humana ou região extracelular de IL-15R alfa de mamíferos não humanos.

[0115] Dentre as sequências de aminoácidos de regiões IL-15R alfa extracelulares humanas, a sequência de aminoácidos da região IL-15R alfa extracelular de SEQ ID Nº 40 é preferida.

[0116] A sequência de aminoácidos da região extracelular de IL-15R alfa humana de SEQ ID Nº 40 é codificada por exons 1 a 5 e parte 5' pequena de exon 6 de IL-15R alfa humano.

[0117] Exon 1 de IL-15R alfa humano (SEQ ID Nº 8) codifica peptídeo de sinal IL-15R alfa (sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 4; sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 5).

[0118] Exon 2 (SEQ ID Nº 9) compreende a codificação de sequências para o domínio sushi de IL-15R alfa humano.

[0119] O último códon 3' de exon 2 codifica o primeiro aminoácido da região de articulação.

[0120] Parte 5' de exon 3 (exon 3 de SEQ ID Nº 10) codifica a região de articulação de IL-15R alfa humano.

[0121] A parte 3' restante de exon 3, mais exon 4 (SEQ ID Nº 11), exon 5 (SEQ ID Nº 12) e parte 5' de exon 6 (699..709 de SEQ ID Nº 1) codificam região rica em sítios de glicosilação (também conhecida como região de extremidade).

[0122] A sequência de SEQ ID Nº 44 é a forma com peptídeo de sinal excluído da região extracelular IL-15R alfa de SEQ ID Nº 40. Na presente invenção, peptídeos de sinal podem ser utilizados, mas são opcionais. Esse peptídeo de sinal pode ser peptídeo de sinal IL-15R alfa, ou o peptídeo de sinal de outra proteína. Desta forma, forma com peptídeo de sinal excluído de região extracelular de IL-15R alfa (tal como SEQ ID Nº 44) é diretamente equivalente à sequência extracelular de IL-15R alfa completa (tal como SEQ ID Nº 40).

[0123] Ilustram regiões extracelulares de IL-15R alfa de mamíferos não humanos as que possuem a sequência de SEQ ID Nº 74 (1..204 de IL-15R

alfa de *Mus musculus*) de SEQ ID Nº 80 (1..286 de IL-15R alfa de *Pan troglodytes*) de SEQ ID Nº 86 (1..182 de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*).

DOMÍNIO SUSHI:

[0124] A região extracelular de IL-15R alfa ou seu fragmento que define o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi contém domínio sushi IL-15R alfa.

[0125] A região extracelular de IL-15R alfa contém domínio que é conhecido como domínio sushi (Wei *et al*, 2001, *J. Immunol.* 167: 277-282).

[0126] O domínio sushi de IL-15R alfa possui conformação de folha beta.

[0127] Ele é codificado pelo exon 2 de IL-15R alfa. Ele começa no primeiro resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C1) e termina no quarto resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C4).

[0128] Ao considerar a sequência de proteínas IL-15R alfa na orientação N-terminal para C-terminal padrão, o domínio sushi de IL-15R alfa pode ser definido como iniciando no primeiro resíduo de cisteína (C1) após o peptídeo de sinal e terminando no quarto resíduo de cisteína (C4) após o peptídeo de sinal.

[0129] Os resíduos C1 e C4 são ambos incluídos na sequência de sushi.

[0130] Desta forma, quando a identificação do domínio sushi for realizada em sequência IL-15R alfa que é excluída da sua sequência de peptídeo de sinal (tal como a sequência de SEQ ID Nº 44), o domínio sushi é definido em seguida como iniciando no primeiro resíduo de cisteína (a partir da extremidade N-terminal da proteína) e terminando no quarto resíduo de cisteína dessa sequência de IL-15R alfa.

[0131] O domínio sushi de IL-15R alfa pode também ser determinado por meio de análise da sequência de aminoácidos de IL-15R alfa com software apropriado, tal como:

- Prosite (http://us.expasy.org/prosite/);
- InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/);
- SMART (http://elm.eu.org/).

[0132] A sequência de aminoácidos do mencionado domínio sushi pode ser a sequência de aminoácidos de domínio sushi de IL-15R alfa humano ou de domínio sushi de mamífero não humano.

[0133] Dentre as sequências de aminoácidos de domínios sushi de IL-15R alfa humano, a sequência de aminoácidos do domínio sushi de IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 14 é preferida.

[0134] A sequência de aminoácidos do mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa humano pode ser, por exemplo, a sequência de SEQ ID Nº 16 (it + sushi de IL-15R alfa humano) ou Nº 18 (t + sushi de IL-15R alfa humano).

[0135] Ilustram os domínios sushi de IL-15R alfa mamífero não humano as sequências de aminoácidos de SEQ ID Nº 75 (36..96 de IL-15R alfa de *Mus musculus*), de SEQ ID Nº 81 (13..73 de IL-15R alfa de *Pan troglodytes*) ou de SEQ ID Nº 87 (24..84 de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*).

PEPTÍDEO DE SINAL:

[0136] Peptídeo de sinal é cadeia de peptídeos curta (15 a 60 aminoácidos de comprimento) que dirige o transporte pós-tradução de proteína. Alguns peptídeos de sinal são divididos da proteína por peptidase de sinal após o transporte das proteínas. Peptídeos de sinal podem também ser denominados sequências de sinal ou sinais de direcionamento. As sequências de aminoácidos de peptídeos de sinal dirigem proteínas que são sintetizadas no citosol de certas

organelas tais como o núcleo, matriz mitocôndrica, retículo endoplasmático, cloroplasto e peroxisoma.

[0137] O peptídeo de sinal de IL-15R alfa é sequência N-terminal de cerca de 29 a 33 aminoácidos, tais como 30 a 32 aminoácidos. Ela começa no primeiro resíduo de aminoácido N-terminal de IL-15R alfa. Ele é determinado por meio de análise da sequência de aminoácidos N-terminal de IL-15R alfa com software apropriado tal como:

- SIGCLEAVE (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/sigcleave.html);

- InterProScan (http://www.ebi.ac.ui/InterProscan/);

- SMART (http://elm.eu.org/).

[0138] O peptídeo de sinal de IL-15R alfa de *Mus musculus* é sequência de aminoácidos N-terminal de 32 aminoácidos (vide número de acesso (NP_032384); sig_peptide 1..32).

[0139] O peptídeo de sinal de IL-15R alfa humano, conforme exibido em SEQ ID Nº 5, é sequência de aminoácidos N-terminal de 30 aminoácidos, que contém um resíduo de cisteína.

FRAGMENTO DE PARTE CODIFICADA POR EXON 2:

[0140] O exon 2 de IL-15R alfa contém o domínio sushi, ou seja, a unidade estrutural mínima que é exigida pela presente invenção.

[0141] O mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa pode compreender (ou pode consistir essencialmente de):

- parte de região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelo exon 2 do mencionado IL-15R alfa; ou

- fragmento dessa parte codificada por exon 2.

[0142] Segundo a presente invenção, o mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa necessita compreender pelo menos um domínio IL-15R alfa. Desta forma, fragmento de parte codificada por exon 2 pode

ser qualquer de seus fragmentos, desde que ele ainda compreenda o domínio sushi (do resíduo C1 para o resíduo C4).

[0143] A parte codificada por exon 2 da região extracelular humana de SEQ ID Nº 40, por exemplo, é a sequência que se estende da posição 31 até a posição 94 (ou seja, SEQ ID Nº 24), ou seja, é: it + sushi + i.

[0144] Fragmentos desta parte codificada por exon 2 são: t + sushi, it + sushi, t + sushi + i.

[0145] A mencionada sequência codificada por exon 2 pode ser, por exemplo:

- a parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa extracelular humano, que é a sequência de SEQ ID Nº 24;

- a parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa extracelular de *Pan troglodytes*, que é a sequência de SEQ ID Nº 98;

- a parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa extracelular de *Mus musculus*, que é a sequência de SEQ ID Nº 97;

- a parte codificada por exon 2 de IL-15R alfa extracelular de *Rattus norvegicus*, que é a sequência de SEQ ID Nº 99.

[0146] Variantes desses fragmentos de região extracelular de IL-15R alfa são englobados dentro do escopo da presente invenção.

[0147] Essas variantes incluem notadamente as que contêm exclusão e/ou substituição e/ou adição amino conservada na sua sequência.

[0148] Sequência variante conservada de fragmento de região extracelular de IL-15R alfa é derivada da sequência de fragmento de região extracelular de IL-15R alfa parental por pelo menos uma exclusão e/ou pelo menos uma substituição e/ou pelo menos uma adição de aminoácido e reteve a capacidade de pelo menos uma das características a seguir:

i. aumento da afinidade de IL-15 para IL-15R beta/gama;

ii. indução e/ou estímulo de efeito antiapoptótico sobre células

beta/gama-positivas e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas;

iii. aumento da eficiência de ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama, ou seja, indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células beta/gama-positivas, e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas ou em repouso.

[0149] Preferencialmente, as mencionadas variantes conservadas retiveram a característica descrita em iii acima.

[0150] Variantes conservadas compreendem notadamente aquelas que contêm sequência de aminoácidos que possui identidade de pelo menos 85% com a sequência parental, ao longo de todo o comprimento desta sequência parental. Preferencialmente, o mencionado percentual de identidade é de pelo menos 90%, de preferência ainda maior pelo menos 92%, de preferência superior pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%.

[0151] Por exemplo, a partir da parte codificada por exon 2 mencionada acima de SEQ ID Nº 40, será evidente para os técnicos no assunto que i + sushi, i + sushi + t, i + sushi + i, it + sushi + t são variantes conservadas, que são tecnicamente equivalentes ao fragmento parental.

FRAGMENTO DE PARTE CODIFICADA POR EXON 2-3:

[0152] Segundo realização muito vantajosa da presente invenção, o mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa pode compreender adicionalmente pelo menos um aminoácido da sequência que é codificada pelo exon 3 do mencionado IL-15R alfa.

[0153] O mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa pode, portanto, compreender ou consistir de:

- parte da região extracelular de IL-15R alfa que é codificada pelos

exons 2 e 3 do mencionado IL-15R alfa; ou

- fragmento dessa parte codificada por exon 2-3, que tenha retido o mencionado domínio sushi.

[0154] Exon 3 do IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 (ou seja, da região extracelular humana de SEQ ID Nº 40) é a sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 10. A parte codificada por exon 3 de SEQ ID Nº 3 é a sequência de SEQ ID Nº 93, ou seja, a parte de sequência 95..127 de SEQ ID Nº 3 ou de SEQ ID Nº 40 (ou seja, a sequência de aminoácidos que se estende da posição 95 até a posição 127 da sequência IL-15R alfa humana de SEQ ID Nº 3 ou Nº 40, em que as posições 95 e 127 são ambas incluídas).

[0155] A mencionada sequência codificada por exon 3 pode ser, por exemplo:

- a parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa extracelular humano, que é a sequência de SEQ ID Nº 93;

- a parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa extracelular de *Pan troglodytes* que é a sequência de SEQ ID Nº 95;

- a parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa extracelular de *Mus musculus* que é a sequência de SEQ ID Nº 94;

- a parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa extracelular de *Rattus norvegicus* que é a sequência de SEQ ID Nº 96.

[0156] Fragmento de parte codificada por exon 3 pode ser fragmento de apenas um aminoácido, preferencialmente pelo menos dois aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos, de preferência ainda maior pelo menos quatro aminoácidos e, de preferência superior, pelo menos cinco aminoácidos.

[0157] Os inventores demonstram que parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa ou seu fragmento aumenta convenientemente a afinidade e a

eficiência do composto resultante, em termos de transdução de sinal de IL-15R beta/gama e de ativação e proliferação de células IL15R beta/gama-positivas.

[0158] Quando o polipeptídeo que contém sushi destinar-se à produção de proteína de fusão, os técnicos no assunto podem preferir limitar o número de aminoácidos de exon 3 ao número ideal, ou seja, ao número de aminoácidos que representa equilíbrio razoável entre o aumento da afinidade e eficiência, por um lado, e o aumento do tamanho molecular e dificuldades de conformação, por outro lado. Desta forma, os técnicos no assunto podem achar vantajoso limitar o número de aminoácidos codificados por exon 3 que são adicionados ao mencionado domínio sushi de IL-15R alfa a número de 30, preferencialmente 25, de maior preferência 20, de preferência ainda maior 18, de preferência superior 17, tal como 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6.

[0159] Os números de aminoácidos codificados por exon 3 de maior preferência são, portanto, os de intervalos que resultam da combinação de cada um dos limites inferiores mencionados acima com cada um dos limites superiores mencionados acima.

[0160] Ilustram os fragmentos preferidos de parte codificada por exon 3 todos os fragmentos derivados da parte codificada por exon 3 do IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 (ou SEQ ID Nº 40), ou seja, a parte que se estende da posição 95 à posição 127, em que as posições 95 e 127 são ambas incluídas (em outras palavras: sequência 95.127 de SEQ ID Nº 3 ou Nº 40).

[0161] Composto preferido da presente invenção compreende, portanto, pelo menos um polipeptídeo que contém sushi que, além do mencionado domínio de sushi, compreende pelo menos um aminoácido da sequência que se estende da posição 95 até a posição 127 de SEQ ID Nº 3 (em que as posições 95 e 127 são ambas incluídas). Ele compreende de maior preferência:

- número preferido desses aminoácidos (ou seja, “pelo menos dois

aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos, de preferência ainda maior pelo menos quatro aminoácidos, de preferência superior pelo menos cinco aminoácidos”); ou

- número de preferência superior desses aminoácidos (ou seja, qualquer combinação resultante de “pelo menos dois aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos, de preferência ainda maior pelo menos quatro aminoácidos, de preferência superior pelo menos cinco aminoácidos” e “no máximo 30, preferencialmente no máximo 25, de maior preferência no máximo 20, de preferência ainda maior no máximo 18, de preferência superior no máximo 17, tal como 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6”).

[0162] Desta forma, o mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa compreende convenientemente a parte de região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelo exon 2 do mencionado IL-15R alfa ou sua variante conservada conforme definido acima, e que compreende adicionalmente pelo menos um aminoácido da sequência codificada pelo exon 3 do mencionado IL-15R alfa.

[0163] Mais especificamente, o mencionado fragmento de região extracelular de IL-15R alfa pode compreender (ou pode consistir essencialmente de):

- parte da região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelos exons 2 e 3 do mencionado IL-15R alfa ou sua variante conservada; ou

- a parte de região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelo exon 2 do mencionado IL-15R alfa, e fragmento da parte de região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelo exon 3 do mencionado IL-15R alfa.

[0164] Ainda mais especificamente, o mencionado fragmento de região extracelular IL-15R alfa pode compreender (ou pode consistir essencialmente de):

- parte da região extracelular de IL-15R alfa, que é codificada pelos exons 2 e 3 do mencionado IL-15R alfa ou sua variante conservada; ou

- fragmento dessa parte codificada por exon 2-3 dessa variante codificada por exon 2-3, com a ressalva implícita de que esse fragmento reteve o domínio sushi.

[0165] A definição de variantes conservadas fornecida acima se aplica, *mutatis mutandis*, a variante conservada de parte codificada por exon 2-3, ou seja, é sequência derivada de sequência codificada por exon 2-3 parental, por pelo menos uma exclusão e/ou pelo menos uma substituição e/ou pelo menos uma adição de aminoácido e reteve a capacidade de pelo menos uma das características a seguir:

i. aumento da afinidade de IL-15 por IL-15R beta/gama;

ii. indução e/ou estímulo de efeito antiapoptótico sobre células beta/gama-positivas e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas;

iii. aumento da eficiência de ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama, ou seja, indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células beta/gama-positivas e, mais especificamente, de células beta/gama-positivas alfa-negativas, tais como células T e/ou NK nativas ou em repouso.

[0166] Preferencialmente, as mencionadas variantes conservadas retiveram a característica descrita em iii. acima.

[0167] Variantes conservadas compreendem notadamente aquelas que contêm sequência de aminoácidos que possui identidade de pelo menos 85% com a sequência parental ao longo de todo o comprimento desta

sequência parental. Preferencialmente, o mencionado percentual de identidade é de pelo menos 90%, de preferência ainda maior pelo menos 92%, de preferência superior pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%.

REGIÃO DE ARTICULAÇÃO (LOCALIZADA APÓS O DOMÍNIO SUSHI, CODIFICADA POR PARTE 3' DE EXON 2 E PARTE 5' DE EXON 3, OU POR PARTE 5' DE EXON 3):

[0168] Os inventores demonstram que a região de articulação de IL-15R alfa é mais particularmente envolvida neste aumento da eficiência de transdução de sinal e, neste aumento, em ativação e proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas.

[0169] Desta forma, segundo realização muito vantajosa da presente invenção, o mencionado fragmento de região extracelular IL-15R alfa pode, além do mencionado domínio sushi de IL-15R alfa, compreende adicionalmente região de articulação de IL-15R alfa ou fragmento de região de articulação de IL-15R alfa.

[0170] Região de articulação de IL-15R alfa é definida como a sequência de aminoácidos que começa no primeiro resíduo amino após o domínio sushi (ao considerar a sequência IL-15R alfa na orientação N-terminal para C-terminal padrão) e que termina no último resíduo de aminoácido antes do primeiro sítio de glicosilação potencial.

[0171] As posições de sítios de glicosilação potenciais são determinadas utilizando o software NetOGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/) para identificação de potenciais sítios de O-glicosilação e o software NetNGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) para a identificação de potenciais sítios de N-glicosilação.

[0172] Em IL-15R alfa humano, a sequência de aminoácidos da região de articulação consiste dos quatorze aminoácidos que estão localizados

após o domínio sushi deste IL-15R alfa, em posição C-terminal relativa ao mencionado domínio sushi, ou seja, a mencionada região de articulação de IL-15R alfa inicia no primeiro aminoácido após o mencionado resíduo de cisteína (C4) e termina no décimo-quarto aminoácido (contado na orientação “de N-terminal para C-terminal” padrão).

[0173] No IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 (cuja região extracelular é a sequência de SEQ ID Nº 40), a sequência de aminoácidos da mencionada região de articulação de IL-15R alfa humano é a sequência de SEQ ID Nº 20. Ela contém um aminoácido codificado por exon 2 (aminoácido i) e treze aminoácidos codificados por exon 3.

[0174] No IL-15R alfa de *Mus musculus* de SEQ ID Nº 73, a região de articulação contém a sequência de SEQ ID Nº 76.

[0175] No IL-15R alfa de *Pan troglodytes* de SEQ ID Nº 79, a região de articulação contém a sequência de SEQ ID Nº 82.

[0176] No IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* de SEQ ID Nº 85, a região de articulação contém a sequência de SEQ ID Nº 88.

[0177] O mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi pode compreender, portanto, o domínio sushi de SEQ ID Nº 75 e a região de articulação de SEQ ID Nº 76 (*Mus musculus*), o domínio sushi de SEQ ID Nº 81 e a região de articulação de SEQ ID Nº 82 (*Pan troglodytes*) ou o domínio sushi de SEQ ID Nº 87 e a região de articulação de SEQ ID Nº 88 (*Rattus norvegicus*).

[0178] Convenientemente, o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi compreende preferencialmente o domínio sushi humano de SEQ ID Nº 14 e a região de articulação humana de SEQ ID Nº 20 (tal como SEQ ID Nº 16 ou Nº 18, seguida pela região de articulação de SEQ ID Nº 20). Preferencialmente, o mencionado pelo menos um polipeptídeo que

contém sushi compreende ou é polipeptídeo de SEQ ID Nº 30 (it + sushi + articulação), opcionalmente excluído do seu i e/ou t N-terminal.

[0179] O mencionado fragmento de região extracelular IL-15R alfa pode compreender alternativamente, além do domínio sushi, fragmento de região de articulação. Por fragmento de região de articulação, indica-se no presente pedido qualquer de seus fragmentos, até pelo menos um aminoácido da mencionada região de articulação. Preferencialmente, fragmento de região de articulação compreende pelo menos dois aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos.

[0180] Fragmento de região de articulação IL-15R alfa pode ser, portanto, fragmento de 1 (tal como aminoácido i), 2 (tal como aminoácidos ir), 3 (tal como aminoácidos ird), 4 (tal como aminoácidos irdp), 5 (tal como aminoácidos irdpa), 6 (tal como aminoácidos irdpal), 7 (tal como aminoácidos irdpalv), 8 (tal como aminoácidos irdpalvh), 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 aminoácidos.

[0181] Convenientemente, o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi compreende preferencialmente o domínio sushi humano de SEQ ID Nº 14 e fragmento da região de articulação de SEQ ID Nº 20.

[0182] A sequência de aminoácidos do mencionado fragmento de região de articulação de IL-15R alfa compreende ou é i, ir ou ird.

[0183] O polipeptídeo que contém sushi de SEQ ID Nº 22, 24 e 26 compreende o domínio sushi de SEQ ID Nº 14 e o fragmento “i” da região de articulação de SEQ ID Nº 20.

[0184] O polipeptídeo que contém sushi de SEQ ID Nº 28 compreende o domínio sushi de SEQ ID Nº 14 e o fragmento “ird” da região de articulação de SEQ ID Nº 20.

[0185] A mencionada sequência de aminoácidos de fragmento de região extracelular de IL-15R alfa humana pode compreender mais

particularmente, além do mencionado domínio sushi e sequências de aminoácidos de região de articulação:

- a sequência de aminoácidos de região de IL-15R alfa extracelular que é conhecida como a região rica em sítios de glicosilação, ou como a região de extremidade; ou

- seu fragmento.

REGIÃO RICA EM SÍTIOS DE GLICOSILAÇÃO, TAMBÉM CONHECIDA COMO REGIÃO DE EXTREMIDADE (CODIFICADA POR PARTE 3' DE EXON 3, PELOS OUTROS EXONS EXTRACELULARES):

[0186] A região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa é região que compreende vários sítios de glicosilação potenciais. Às vezes é denominada região de "extremidade" de IL-15R alfa. Ela começa no primeiro resíduo de aminoácido após a região de articulação (ao considerar a sequência na orientação "N-terminal para C-terminal" padrão) e termina no último resíduo de aminoácido antes da região de transmembrana de IL-15R alfa. Ela compreende vários sítios de glicosilação potenciais.

[0187] O domínio de transmembrana é determinado pela análise da sequência de aminoácidos de IL-15R alfa com software apropriado, tal como: TopPred (http://biowed.pasteur.fr/seqanal/interfaces/topred.html), TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

[0188] A região de extremidade de IL-15R alfa humano compreende vários sítios de O-glicosilação e um sítio de N-glicosilação.

[0189] A região de extremidade de IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 32 é codificada por parte 3' de exon 3 e por exon 4, exon 5 e parte 5' de exon 6 do mencionado IL-15R alfa.

[0190] Ilustram a extremidade de região extracelular de IL-15R alfa de mamífero não humano as sequências de aminoácidos de SEQ ID Nº 77 (*Mus*

musculus), de SEQ ID Nº 83 (*Pan troglodytes*) ou de SEQ ID Nº 89 (*Rattus norvegicus*).

[0191] Por fragmento ou subfragmento de região rica em sítios de glicosilação (ou fragmento ou subfragmento de região de extremidade), indica-se pelo presente pedido qualquer fragmento ou subfragmento da mencionada região até apenas um aminoácido da mencionada região. Preferencialmente, o mencionado fragmento ou subfragmento compreende pelo menos dois aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos.

[0192] A mencionada sequência de aminoácidos de fragmento de região extracelular IL-15R alfa pode compreender, portanto:

- a parte codificada por exon 3 da região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa; ou

- fragmento dessa parte codificada por exon 3.

[0193] Sequência de aminoácidos preferida para a parte codificada por exon 3 da região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa humano é a sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 34. Polipeptídeo que contém sushi de acordo com a presente invenção é convenientemente o polipeptídeo de SEQ ID Nº 36 (opcionalmente excluído dos primeiros aminoácidos i e/ou t C-terminal.

[0194] Conforme indicado anteriormente, qualquer fragmento de parte codificada por exon 3 que os técnicos no assunto considerem apropriado pode ser utilizado, tal como qualquer fragmento de pelo menos um aminoácido, preferencialmente pelo menos dois aminoácidos, de maior preferência pelo menos três aminoácidos.

EXONS EXTRACELULARES, DIFERENTES DE EXONS 1, 2 E 3:

[0195] Os exons IL-15R alfa extracelulares, diferentes dos exons 1, 2 e 3, codificam fragmento C-terminal da região de extremidade.

[0196] Estas partes, ou seus fragmentos, podem aumentar ainda mais a eficiência dos compostos de acordo com a presente invenção.

[0197] A mencionada sequência de aminoácidos de fragmento de região extracelular IL-15R alfa pode, portanto, compreender adicionalmente parte de IL-15R alfa extracelular que é codificado por exon 4 e/ou exon 5 e/ou exon 6, ou qualquer fragmento dessa parte.

[0198] As posições exon do IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 3 são exibidas no presente pedido na Tabela 1 acima.

[0199] Ilustram as sequências de aminoácidos desses polipeptídeos que contêm sushi as sequências de SEQ ID Nº 38 ou SEQ ID Nº 42 com peptídeo de sinal excluído, ou SEQ ID Nº 44 com peptídeo de sinal excluído.

[0200] Ilustram os polipeptídeos que contêm sushi os que contêm o domínio sushi, a região de articulação e a extremidade completa de IL-15R alfa (tal como a extremidade IL-15R alfa humana de SEQ ID Nº 32; a extremidade IL-15R alfa de *Pan troglodytes* de SEQ ID Nº 83; a extremidade IL-15R alfa de *Mus musculus* de SEQ ID Nº 77; a extremidade IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* de SEQ ID Nº 89) e, opcionalmente, peptídeo de sinal.

AÇÃO BIOLÓGICA IL-15:

[0201] Em nível celular ou de organismo, produto de acordo com a presente invenção é caracterizado pelo fato de que induz e/ou estimula a ação biológica de IL-15. Ele estimula as ações biológicas que são exercidas, indutíveis ou estimuladas por IL-15, miméticos de IL-15 e/ou agonistas de IL-15.

[0202] Os produtos de acordo com a presente invenção (ou seja, os polipeptídeos que contêm sushi descritos no presente pedido, em forma isolada, e, mais especificamente, os compostos de acordo com a presente invenção) podem ser considerados, portanto, agonistas da ação biológica de IL-15.

[0203] Função característica especial e vantajosa dos produtos de acordo com a presente invenção é que eles são capazes de induzir e/ou

estimular a via de sinalização de IL-15R beta/gama e, mais especificamente, de estimular a ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama.

[0204] Em nível molecular, produto de acordo com a presente invenção é, portanto, mais particularmente caracterizado pelo fato de que aumenta a eficiência da via de sinalização de IL-15R beta/gama. Ele sensibiliza as células que expressam o complexo de IL-15R beta/gama à ação de IL-15. Ainda mais especificamente, ele sensibiliza as células que expressam o complexo de IL-15R beta/gama, mas não expressam IL-15R alfa (células IL-15Rβ/γ^+ IL-15Rα^-), à ação de IL-15.

[0205] Alguns dos produtos de acordo com a presente invenção são específicos de IL-15R beta/gama, no sentido de que não aumentam a eficiência da via de sinalização de IL-15R alfa/beta/gama. É notadamente o caso da proteína de fusão de ILR de acordo com a presente invenção (sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 62; e sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 61).

[0206] Alguns outros produtos de acordo com a presente invenção são capazes de aumentar a eficiência das vias de sinalização de IL-15R beta/gama e IL-15R alfa/beta/gama. É notadamente o caso da proteína de fusão RLI de acordo com a presente invenção (sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 60 e sequência de ácidos nucléicos de SEQ ID Nº 59).

[0207] A presente invenção também demonstra que o domínio sushi de IL-15Rα é fundamental para transpresentação. Ele gera acesso, desta forma, a aplicações médicas particularmente úteis e particularmente necessárias no campo de tratamento e/ou paliação e/ou prevenção de câncer, por meio de administração de vacinas, tal como administração de composição que compreende pelo menos um composto que contém pelo menos um domínio sushi de IL-15R alfa.

[0208] IL-15 é citocina que estimula a proliferação e/ou sobrevivência de linfócitos (tais como células T, células T $CD8^+$, células NK, células dendríticas) e/ou sua atividade contra células tumorais.

[0209] IL-15 está envolvido no cruzamento entre células acessórias e células linfóides. É essencial em tecidos periféricos para o desenvolvimento de células NK, células NKT e células T de memória CD8+.

[0210] É o fator fisiológico mais poderoso capaz de induzir a diferenciação de células hematopoiéticas CD34+.

[0211] A mencionada ação biológica de IL-15 é ação biológica exercida, indutível ou estimulada por IL-15 e/ou miméticos de IL-15 e/ou agonistas de IL-15.

[0212] Os técnicos no assunto podem selecionar qualquer resposta biológica de IL-15 que ele(a) considerar apropriada ou conveniente para determinar ou monitorar.

[0213] Preferencialmente, a mencionada ação biológica de IL-15 é ação biológica exercida, indutível ou estimulada por IL-15 e/ou miméticos de IL-15 e/ou agonistas de IL-15 sobre células IL-15R beta/gama$^+$ IL-15R alfa$^-$.

[0214] Resposta biológica de IL-15 típica é a proliferação e/ou ativação de células sensíveis a IL-15.

[0215] Exemplos de células sensíveis a IL-15 são células T, células T $CD8^+$, células NK, células dendríticas, cuja proliferação é induzida e/ou estimulada mediante adição de IL-15 e/ou miméticos de IL-15 e/ou agonistas de IL-15 e/ou cuja ativação é induzida e/ou estimulada mediante adição de IL-15 e/ou miméticos de IL-15 e/ou agonistas de IL-15 (tal como indução de atividade antitumoral).

[0216] Essas células podem ser recolhidas, por exemplo, de organismo mamífero.

[0217] Outros exemplos de células sensíveis a IL-15 compreendem linhagens celulares conhecidas, tais como a linhagem de células de linfoma T citotóxico de camundongo CTL-L2 (número de acesso ATCC TIB-214) ou células TF1-beta.

[0218] Células TF1-beta são disponíveis por meio de transfecção de células TF com cadeias beta.

[0219] Células TF-1 são disponíveis por meio da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, ATCC; P. O. Box 1549, Manassas VA 20108, Estados Unidos; cf. http://www.lgcpromochem.com/atcc/ sob número de acesso ATCC CRL-2003. Retrovírus recombinantes de IL-2R beta podem ser utilizados em seguida para infectar células TF-1 para gerar TF-1β após seleção em meio que contém G418.

[0220] Preferencialmente, as mencionadas células sensíveis a IL-15 são células IL-15R beta/gama$^+$ IL-15R alfa$^-$. Exemplos de células IL-15R beta/gama$^+$ IL-15R alfa$^-$ incluem a linhagem de células Mo-7 humana ou células T e/ou NK em repouso.

[0221] As células T e/ou NK em repouso são disponíveis para os técnicos no assunto. Elas podem ser obtidas, por exemplo, por meio de purificação de amostra de células, tal como amostra de sangue.

[0222] Células T e NK em repouso podem ser isoladas do sangue de doadores adultos saudáveis conforme segue: sangue integral é centrifugado em alta velocidade para obter revestimento de leucócitos. Esse revestimento de leucócitos é centrifugado sobre gradiente de densidade (Histopaque, Sigma) para obter linfócitos do sangue periférico. As células NK em repouso são isoladas em seguida de linfócitos do sangue periférico utilizando kit de isolamento negativo de células NK. (Dynal, Biotech ASA, Oslo, Noruega). Alternativamente, células T em repouso são isoladas de linfócitos do sangue periférico utilizando kit de isolamento negativo para células T (Dynal, Biotech ASA, Oslo, Noruega).

[0223] Outros exemplos de células IL-15R beta/gama$^+$ IL-15R alfa$^-$ incluem células IL-15R alfa$^-$, que são transformadas ou transfectadas por IL-15R beta/gama, preferencialmente por IL-15R beta/gama humano.

[0224] A linhagem de células 32D murinas (ATCC CRL-11346), por exemplo, pode ser transfectada por cadeias beta e gama, preferencialmente com cadeias gama e humanas.

[0225] Cadeias beta (ou seja, cadeias beta IL-15R, também denominadas cadeias IL-2R beta) são conhecidas dos técnicos no assunto e para eles disponíveis. Dentre as cadeias beta, são preferidas cadeias beta humanas.

[0226] Modelos de cadeia beta são disponíveis a partir de RNA de HuT102 (ATCC TIB-162) por meio de RT-PCR utilizando a contraprova polimerase Pfu (Stratagène nº 600390) e 5’ GAGAGACTGGATGGACCC 3’ como primer senso (SEQ ID Nº 70) e 5’ AAGAAACTAACTCTTAAAGAGGC 3’ como primer antisenso (SEQ ID Nº 71), de acordo com sequência IL-2R beta humana (número de acesso NCBI K03122). O produto de PCR é eficientemente clonado utilizando o Kit de Clonagem PCR Zero Blunt (categoria In Vitrogen nº K2700-20) ou o kit de clonagem PCR TOPO XL (categoria In Vitrogen nº K4750-10). O cDNA para gene IL-2R beta é subclonado em seguida no sítio de clonagens múltiplas do vetor de expressão de retrovírus pLXRN do Sistema de Expressão Retroviral Pantropic (BD Biosciences Clontech nº 631512) e transfectado em células GP2-293, conforme descrito no kit para gerar retrovírus recombinantes.

[0227] Cadeias gama (ou seja, cadeias IL-15R gama, também denominadas cadeias IL-2R gama) são conhecidas dos técnicos no assunto e para eles disponíveis. Dentre as cadeias gama, são preferidas cadeias gama humanas.

[0228] Modelos de cadeias gama são disponíveis a partir de RNA de TF1 (ATCC CRL 2003) ou HuT 102 (ATCC TIB 162) por meio de RT-PCR utilizando a contraprova polimerase Pfu e 5’ GAAGAGCAAG CGCCATGTTG 3’ (SEQ ID Nº 100) como primer senso e 5’ TCAGGTTTCAGGCTTTAGGG 3’ como primer antisenso (SEQ ID Nº 101) de acordo com sequência gama receptora de interleucina 2 humana (número de acesso NCBI D 11086). O produto de PCR é eficientemente clonado utilizando Kit de Clonagem PCR Zero Blunt ou o kit de clonagem PCR TOPO XL. O cDNA para o gene IL-2Rγ é subclonado em seguida em pcDNA 3.1/HYGRO (In Vitrogen) para gerar plasmídeo IL-2Rγ/HYGRO de pcDNA.

[0229] Retrovírus recombinantes de IL-2R beta podem ser utilizados para infectar células 32D para gerar 32Dβ após seleção em meio que contém G418. O plasmídeo IL-2Rγ/HYGRO de pcDNA pode ser transfectado em seguida em células 32Dβ por meio de eletroporação para gerar 32Dβγ após seleção em meio que contém higromicina.

[0230] Os técnicos no assunto podem optar alternativamente por determinar ou monitorar resposta biológica de IL-15 que seja mais abaixo no fluxo na via de sinalização, tal como a ativação de tirosino quinase (tal como Jak-1/Jak-3; Lck; Syk), ativação de MAP quinase ou evento de translocação nuclear (tal como translocação de Stat-3 e/ou Stat-5 fosforilado). A mencionada resposta biológica de IL15 pode então ser reação acelular.

ELEMENTOS ADICIONAIS (PEPTÍDEO DE SINAL, MARCADOR MOLECULAR, SÍTIO PROTEOLÍTICO ETC.):

[0231] Composto de acordo com a presente invenção pode compreender peptídeo de sinal. Este peptídeo de sinal pode ser ligado direta ou indiretamente ao mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi ou à mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama. O

mencionado peptídeo de sinal pode ser ligado ao mencionado composto por meio de covalência.

[0232] Peptídeos de sinal facilitam a secreção de proteínas pelas células.

[0233] Este peptídeo de sinal pode ser, por exemplo, o peptídeo de sinal de IL-15R alfa, tal como IL-15R alfa humano (como o peptídeo de sinal de IL-15R alfa humano que possui a sequência SEQ ID Nº 5), ligado direta ou indiretamente ao mencionado fragmento, ou o peptídeo de sinal de outra proteína (tal como o peptídeo de sinal de preprolactina bovina de SEQ ID Nº 58), direta ou indiretamente ligado ao mencionado fragmento. Exemplos de peptídeos de sinal são:

- o peptídeo codificado pela sequência líder de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 4), ou seja, os trinta primeiros aminoácidos N-terminais de IL-15R alfa do tipo selvagem humano (SEQ ID Nº 5); ou

- o peptídeo codificado pela sequência líder de preprolactina bovina (SEQ ID Nº 57), ou seja, os primeiros 31 aminoácidos N-terminais de preprolactina bovina (SEQ ID Nº 58).

[0234] Outros peptídeos de sinais que são considerados apropriados pelos técnicos no assunto podem também ser empregados. Além disso, certos nucleotídeos na sequência líder de IL-15 podem ser alterados sem alterar a sequência de aminoácidos. Adicionalmente, alterações de aminoácidos que não afetam a capacidade da sequência de agir como peptídeo de sinal podem ser elaboradas.

[0235] Polipeptídeo que contém sushi de acordo com a presente invenção pode ser ligado diretamente ao peptídeo de sinal do IL-15R alfa do qual é derivado. Esse polipeptídeo que contém sushi pode, entretanto, ser:

- ligado indiretamente a esse peptídeo de sinal “nativo”; ou

- ligado direta ou indiretamente a peptídeo de sinal que não é do

IL-15R alfa do qual deriva o mencionado polipeptídeo que contém sushi.

[0236] Composto de acordo com a presente invenção pode compreender adicionalmente pelo menos um marcador molecular e/ou pelo menos um sítio proteolítico.

[0237] Marcador molecular e/ou sítio proteolítico pode ser localizado, por exemplo, entre o peptídeo de sinal e o domínio sushi, ou entre o peptídeo de sinal e a entidade de ligação de IL-15R beta/gama. O mencionado marcador molecular e/ou sítio proteolítico pode ser ligado direta ou indiretamente ao mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi ou à mencionada entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[0238] Exemplos de marcadores moleculares compreendem notadamente marcadores FLAG®.

[0239] Exemplos de sítios proteolíticos compreendem notadamente sítios de ligação de Xa.

[0240] O octapeptídeo FLAG® (marca comercial registrada) (Hopp *et al*, *Bio/Technology* 6: 1204, 1988) não altera a atividade biológica de proteínas de fusão, é altamente antigênico e fornece epítopo ligado de forma reversível por anticorpo monoclonal específico, que permite a rápida detecção e fácil purificação da proteína de fusão expressa. A sequência FLAG® também é especificamente dividida por enteroquinase da mucosa bovina no resíduo imediatamente após o pareamento de AspLys. Proteínas de fusão tampadas com esse peptídeo podem também ser resistentes à degradação intracelular em *E. coli*. Anticorpo monoclonal murino que se liga à sequência FLAG® foi depositado junto à ATCC com número de acesso HB 9259. Métodos de utilização do anticorpo em purificação de proteínas de fusão que compreendem a sequência FLAG® são descritos na Patente Norte-Americana nº 5.011.912.

[0241] Exemplos de sequências que codificam epítopo Flag e sítio de ligação de fator Xa compreendem SEQ ID Nº 53 e Nº 55 (sequências de aminoácidos de SEQ ID Nº 54 e Nº 56, respectivamente).

AMINOÁCIDOS:

[0242] No contexto da presente invenção, “resíduo de aminoácidos” indica qualquer resíduo de aminoácidos conhecido dos técnicos no assunto (vide, por exemplo, Sewald *et al*, 2002 (42); nomenclatura IUPAC em http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/). Isso engloba aminoácidos de ocorrência natural (incluindo, por exemplo, utilizando o código de três letras, Ala, bAla, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), bem como aminoácidos raros e/ou sintéticos e seus derivados (incluindo, por exemplo, Aad, Abu, Acp, Ahe, Aib, Apm, Dbu, Des, Dpm, Hyl, MeLys, MeVal, Nva, HAO, NCap, Abu, Aib, MeXaa e similares (vide, por exemplo, Müller *et al*, 1993; Aurora *et al*, 1998; Obrecht *et al*, 1999; Maison *et al*, 2001; Formaggio *et al*, 2003; Nowick *et al*, 2003; (43-48). O mencionado resíduo de aminoácidos ou seu derivado pode ser qualquer dos seus isômeros, especialmente qualquer isômero quiral, tal como a isoforma L ou D.

[0243] Por derivado de aminoácido, indicamos pelo presente pedido qualquer derivado de aminoácido conhecido na técnica (vide, por exemplo, Sewald *et al*, 2002 (42); nomenclatura IUPAC em http://www.chem.gmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/).

[0244] Derivados de aminoácidos incluem, por exemplo, resíduos deriváveis de aminoácidos naturais que contêm cadeias laterais adicionais, tais como cadeias laterais alquila e/ou substituições de heteroátomos. Exemplos adicionais de derivados de aminoácidos compreendem aminoácidos que contêm modificações químicas tais como as encontradas em peptídeos miméticos ou peptidomiméticos, que são compostos que contêm elementos estruturais não peptídicos que são capazes de imitar ou antagonizar a(s) ação(ões) biológicas

de peptídeo parental natural. Peptidomimético normalmente não possui mais características de peptídeos clássicos tais como uniões peptídicas enzimaticamente separáveis.

[0245] Preferencialmente, o mencionado aminoácido pertence ao grupo dos aminoácidos não essenciais. Os aminoácidos não essenciais preferidos são glicina, alanina, prolina, serina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina e histidina. Aminoácidos apropriados podem ser selecionados precisamente por meio de seleção dos aminoácidos que se encontram em quantidades mais baixas no paciente a quem o fármaco deve ser administrado. Regime de administração e dosagem pode ser determinado em função do nível do paciente no mencionado aminoácido. O regime de administração e dosagem preferido é aquele que pretende aumentar o nível de aminoácidos do paciente até o nível padrão normal.

LIGAÇÃO DO MENCIONADO PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO QUE CONTÉM SUSHI À MENCIONADA PELO MENOS UMA ENTIDADE DE LIGAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA:

[0246] O mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi de acordo com a presente invenção pode ser ligado diretamente à mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[0247] Alternativamente, o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi de acordo com a presente invenção e a mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, as proteínas podem ser separadas por sequência de aminoácidos “ligante” com comprimento suficiente para garantir que as proteínas formem estruturas secundárias e terciárias apropriadas.

[0248] Preferencialmente, o mencionado ligante é ligante peptídico que compreende pelo menos um, mas menos de trinta aminoácidos, tal como ligante peptídico de dois a trinta aminoácidos, preferencialmente de dez a trinta aminoácidos, de maior preferência de quinze a trinta aminoácidos, de preferência

ainda maior de 19 a 27 aminoácidos e, de preferência superior, de 20 a 26 aminoácidos.

[0249] Os ligantes preferidos são aqueles que permitem que o composto adote conformação adequada (ou seja, conformação que permita atividade de transdução de sinal apropriada ao longo da via de sinalização de IL-15R beta/gama). Exemplos de ligantes preferidos incluem ligantes flexíveis.

[0250] As sequências de ligantes mais apropriadas (1) adotarão conformação estendida flexível, (2) não exibirão propensão ao desenvolvimento de estrutura secundária ordenada que pudesse interagir com os domínios funcionais de proteínas de fusão e (3) possuirão caráter hidrofóbico ou carregado mínimo que poderá promover a interação com os domínios de proteína funcionais. Aminoácidos da superfície típicos de acordo com a presente invenção incluem Gly, Asn e Ser (ou seja, G, N ou S). Esperar-se-ia que virtualmente qualquer permuta de sequências de aminoácidos que contenham Gly, Asn e Ser satisfizesse os critérios acima para sequência ligante. Outros aminoácidos quase neutros, tais como Thr, Ala, Leu, Gln (ou seja, T, A, L, Q) podem também ser utilizados na sequência ligante. O comprimento da sequência ligante pode variar sem afetar significativamente a atividade biológica da proteína de fusão.

[0251] Exemplos de sequências ligantes são descritos nas Patentes Norte-Americanas nº 5.073.627 e 5.108.910.

[0252] Ligantes flexíveis ilustrativos que são mais particularmente apropriados para a presente invenção incluem os codificados pelas sequências de SEQ ID Nº 49 ou Nº 51 (sequências de aminoácidos de SEQ ID Nº 50, também denominada ligante 20, e Nº 52, também denominada ligante 26, respectivamente).

[0253] Em composto de acordo com a presente invenção, a sequência do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi pode

encontrar-se em posição N-terminal com relação à sequência da mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[0254] Alternativamente, a sequência do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi pode encontrar-se em posição C-terminal com relação à sequência da mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

[0255] Composto de acordo com a presente invenção pode ser proteína de fusão.

[0256] As proteínas de fusão são polipeptídeos que compreendem duas ou mais regiões derivadas de peptídeos ou proteínas diferentes ou heterólogas. Proteínas de fusão são preparadas utilizando métodos convencionais de corte de enzimas e ligação de fragmentos de sequências desejadas. Métodos de PCR que empregam oligonucleotídeos sintéticos podem ser utilizados para preparar e/ou amplificar os fragmentos desejados. A sobreposição de oligonucleotídeo sintético que representa as sequências desejadas pode também ser utilizada para preparar construções de DNA que codificam proteínas de fusão. Proteínas de fusão podem compreender várias sequências, que incluem sequência líder (ou peptídeo de sinal), sequência ligante, sequência zíper de leucina ou outras sequências de formação de oligômeros e sequências que codificam porções altamente antigênicas que fornecem meios de fácil purificação ou rápida detecção de proteína de fusão.

[0257] Ilustram os compostos de acordo com a presente invenção as proteínas de fusão que compreendem o polipeptídeo que contém sushi de SEQ ID Nº 30 (it + sushi + articulação) e o IL-15 do tipo selvagem humano de SEQ ID Nº 48, opcionalmente ligados entre si por meio de ligante.

[0258] Ilustram adicionalmente os compostos de acordo com a presente invenção as proteínas de fusão que compreendem:

- o peptídeo de sinal de SEQ ID Nº 5;

- o marcador Flag e a sequência de sítio de ligação de Xa de SEQ ID Nº 54;

- o polipeptídeo que contém sushi de SEQ ID Nº 30 (it + sushi + articulação);

- o ligante de SEQ ID Nº 50; e

- o IL-15 do tipo selvagem humano de SEQ ID Nº 48;

ou seja, a proteína de fusão de RLI codificada por SEQ ID Nº 60.

[0259] Ilustram adicionalmente os compostos de acordo com a presente invenção as proteínas de fusão que compreendem:

- o peptídeo de sinal de SEQ ID Nº 58;

- o marcador Flag e a sequência de sítio de ligação de Xa de SEQ ID Nº 56;

- o IL-15 do tipo selvagem humano de SEQ ID Nº 48;

- o ligante de SEQ ID Nº 52;

- o polipeptídeo que contém sushi de SEQ ID Nº 30 (it + sushi + articulação), ou seja, a proteína de fusão de ILR de SEQ ID Nº 62.

[0260] Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser produzidos por quaisquer meios que os técnicos no assunto possam considerar apropriados, tais como síntese química de polipeptídeos ou biossíntese de polipeptídeos.

[0261] A síntese química de polipeptídeos é agora rotineira (vide, por exemplo, Andersson *et al*, 2000, *Biopolymers (Peptide Science)* 55: 227-250) e muitas empresas são especializadas nessa síntese.

[0262] Preferencialmente, os compostos de acordo com a presente invenção são sintetizados por meio de métodos de síntese de peptídeos de fase (SPPS) utilizando protocolos FMOC padrão (vide, por exemplo, Carpino *et al*, 1970, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (19): 5748-5749; Carpino *et al*, 1972, *J. Org. Chem.* 37 (22): 3404-3409).

[0263] Alternativamente, os técnicos no assunto podem optar por produzir os compostos biologicamente por meio de tradução *in vitro* ou *in vivo* de codificação de ácido nucléico para esse composto.

ÁCIDOS NUCLÉICOS, VETORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS:

[0264] A presente invenção também se refere, portanto, a ácidos nucléicos (DNA ou RNA) que codificam produto que é destinado ao estímulo da via de sinalização de IL-15R beta/gama, de forma a induzir e/ou estimular a ativação e/ou proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células T e/ou NK.

[0265] Mais especificamente, os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção codificam polipeptídeo que contém sushi isolado de acordo com a presente invenção, conforme definido no presente pedido, ou composto ligado covalentemente de acordo com a presente invenção, conforme definido no presente pedido (ou seja, que compreende pelo menos um polipeptídeo que contém sushi ligado direta ou indiretamente por meio de covalência a pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama). A mencionada codificação está de acordo com o código genético universal, considerando devidamente a sua degeneração.

[0266] Os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem estar opcionalmente contidos em vetor, tal como vetor de transfecção ou vetor de expressão.

[0267] Os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem ser ligados operativamente a sequência reguladora de transcrição ou tradução apropriada tais como amplificadores ou promotores de transcrição, sequência operadora opcional para controlar a transcrição, sequência que codifica sítios de ligação ribossômica de mRNA apropriadas e sequências apropriadas que controlam o início e o término de tradução e transcrição de

controle. Exemplos desses vetores incluem pEF1/myc-His (In Vitrogen, V921-20), pcDNA3.1 (In Vitrogen, V800-20).

[0268] Os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção podem também ser ligados a sequência líder que permita a secreção extracelular aprimorada do polipeptídeo traduzido. Exemplos dessas sequências líderes incluem sequências líderes de preprolactina de rato (SEQ ID Nº 57) ou de IL-15R alfa, tal como CDS de peptídeo de sinal IL-15R alfa humano de SEQ ID Nº 4.

[0269] A sequência desses ácidos nucléicos pode também compreender códon de parada (TAG, TGA, TAA) na sua extremidade 3'-terminal.

[0270] A presente invenção refere-se a todos os ácidos nucléicos que codificam um dos compostos descritos de acordo com a presente invenção. A Tabela 4, localizada antes da seção de reivindicações, indica o SEQ ID Nº correspondente desses ácidos nucléicos.

[0271] Por exemplo:

- codificação nucléica para o mencionado IL-15R alfa humano pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 2;

- codificação nucléica para o mencionado IL-15R alfa extracelular humano pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 39;

- codificação nucléica para o mencionado domínio sushi humano pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 13;

- codificação nucléica para a mencionada região de extremidade humana pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 31;

- codificação nucléica para a mencionada parte codificada por exon 3 da mencionada região de extremidade humana pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 33;

- codificação nucléica para o mencionado IL-15 humano pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 47;

- codificação nucléica para composto ligado covalentemente de

acordo com a presente invenção pode compreender a sequência de SEQ ID Nº 59 (proteína de fusão RLI) ou de SEQ ID Nº 61 (proteína de fusão ILR).

[0272] Ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode compreender sequência Kozak na sua extremidade 5', tal como sequência Kozak de IL-15R do tipo selvagem humano, tal como gcc gcc; ou sequência Kozak de preprolactina bovina, tal como gcc acc.

[0273] Ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode compreender códon de parada (tal como tag, tga ou taa) na sua extremidade 3'.

[0274] A presente invenção também se refere a qualquer vetor que compreende ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Preferencialmente, esse vetor é vetor de bacilovírus.

[0275] O mencionado vetor pode ser, por exemplo, vetor de transfecção ou de expressão.

[0276] A presente invenção também se refere a qualquer célula hospedeira, transformada ou transfectada por ácido nucléico e/ou por vetor de acordo com a presente invenção.

[0277] Da forma utilizada no presente pedido, "transfectado" ou "transfecção" indica a introdução de um ou mais ácidos nucléicos exógenos em célula eucariótica. Transfecção inclui a introdução de ácidos nucléicos brutos tais como plasmídeos por meio de métodos de transfecção físico-química padrão, incluindo precipitação de fosfato de cálcio, precipitação de sulfato de dextran, eletroporação, transferência de ácido nucléico mediada por lipossomos, métodos balísticos tais como bombardeamento de partículas etc. Transfecção também inclui a introdução de ácidos nucléicos em células por meio de métodos biológicos, que incluem a transdução viral ou infecção (mediada por receptor e não mediada por receptor). Da forma utilizada no presente pedido, "transformado" ou "transformação" indica a

introdução de um ou mais ácidos nucléicos exógenos em célula procariótica. Transformação inclui a introdução de ácidos nucléicos brutos, bem como de vetor de ácido nucléico, tal como fago.

[0278] Células hospedeiras apropriadas incluem procariotos, levedura ou células eucarióticas superiores sob o controle de promotores apropriados.

[0279] Procariotos incluem organismos grama positivos e grama negativos, tais como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e várias outras espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*.

[0280] Exemplos de células hospedeiras apropriadas também incluem levedura tal como *Saccharomyces cerevisiae* e células eucarióticas superiores, tais como linhagens celulares estabelecidas de origem em insetos ou mamíferos. Exemplos de células eucarióticas superiores apropriadas compreendem linhagens de células de mamíferos, tais como células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), por exemplo linhagem de células de ovário de hamster chinês CHO/dhfr$^-$ (CHO duk$^-$) (ATCC nº CRL-9096) ou como linhagens de células epiteliais, tais como linhagem de células epiteliais de símios COS-7 (ATCC nº CRL 1651) ou linhagens de células humanas, tais como linhagem de células de rins humanos c18 293 (ATCC nº CRL-10852) ou linhagem de células de rim humano FreeStyle 293-F (In Vitrogen nº R790-07).

[0281] A mencionada célula hospedeira pode ser célula eucariótica, célula de mamíferos (humana ou não humana tal como célula CHO), célula de levedura ou célula procariótica (tal como *E. coli*). De maior preferência, a mencionada célula hospedeira é célula de mamífero, pois na presente invenção essas células são mais eficientes (independentemente de qualquer problema de glicosilação).

APLICAÇÕES MÉDICAS E BIOLÓGICAS:

[0282] Os produtos de acordo com a presente invenção compreendem notadamente os mencionados polipeptídeos que contêm sushi em forma isolada conforme definido no presente pedido e a sua forma ligada covalentemente, que é denominada no presente pedido composto ligado covalentemente de acordo com a presente invenção (ou seja, o composto que compreende pelo menos um polipeptídeo que contém sushi direta ou indiretamente ligado por meio de covalência a pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama).

[0283] Os produtos de acordo com a presente invenção também compreendem a codificação de ácidos nucléicos para esses polipeptídeos e compostos, em que o vetor que compreende esses ácidos nucléicos, bem como as células hospedeiras transformadas ou transfectadas por esse ácido nucléico ou esse vetor.

[0284] Os produtos de acordo com a presente invenção são úteis para expandir subconjuntos de linfócitos, tais como subconjuntos de T/NK específicos. A presente invenção refere-se, portanto, ao uso de produto de acordo com a presente invenção como agente para a expansão de uma ou mais populações de linfócitos, tais como células NK, células NK-T, células de memória CD8+ e aos adjuvantes, composições e kits destinados a esse uso, incluindo as composições farmacêuticas e fármacos, que compreendem pelo menos um produto de acordo com a presente invenção.

[0285] O mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi e a mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama podem ser utilizados em forma combinada; tal como na forma de composto ligado covalentemente de acordo com a presente invenção, ou em formas separadas. A presente invenção refere-se, portanto, a:

- a mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R

beta/gama, conforme definido no presente pedido; e

- o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi, conforme definido no presente pedido;

ou seu ácido nucléico, vetor e células hospedeiras correspondentes;

na forma de preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial, ou seja, em formato de kit de partes.

[0286] A presente invenção refere-se, desta forma, a essa preparação, que é adjuvante, composição ou kit que inclui composição farmacêutica e fármaco.

[0287] O presente pedido refere-se, portanto, à prevenção e/ou alívio e/ou tratamento de condição ou doença na qual se deseja aumento da atividade de IL-15, tal como, notadamente, câncer ou imunodeficiência. Essa prevenção e/ou alívio e/ou tratamento pode agir por meio de estímulo da proliferação e/ou sobrevivência de linfócitos (tais como células T, células T $CD8^+$, células NK, células dendríticas) e/ou sua atividade contra células de tumores.

[0288] Método de prevenção e/ou alívio e/ou tratamento de acordo com a presente invenção compreende a administração de produto de acordo com a presente invenção a paciente dele necessitado.

[0289] A presente invenção também se refere a adjuvantes, composições, composições farmacêuticas, fármacos e vacinas, que se destinam a essa prevenção e/ou alívio e/ou tratamento.

[0290] As composições farmacêuticas, fármacos e vacinas de acordo com a presente invenção compreendem pelo menos um produto de acordo com a presente invenção e, opcionalmente, veículo e/ou carreador e/ou diluente e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0291] A presente invenção refere-se mais especificamente a adjuvante. Esse adjuvante é notadamente adaptado à indução e/ou estímulo de

reação imunológica, que compreende domínio sushi IL-15R alfa isolado, ou sua variante conservada Esse adjuvante pode ser adjuvante para vacina antimicrobiana (antiviral, antibacteriana ou antifúngica) ou para vacina antitumorais.

[0292] A presente invenção também se refere a:

- composição que pode ser notadamente destinada à indução e/ou estímulo de ação biológica IL-15, que compreende domínio sushi IL-15R alfa isolado ou sua variante conservada;

- uso de domínio sushi de IL-15R alfa isolado ou sua variante conservada para a fabricação de adjuvante para composição imunoterapêutica;

- uso de domínio sushi IL-15R alfa isolado ou sua variante conservada para a fabricação de composição destinada à indução e/ou estímulo de ação biológica IL-15.

[0293] A presente invenção refere-se, portanto, o fármaco ou vacina que compreende pelo menos um polipeptídeo que contém sushi conforme definido no presente pedido e, opcionalmente, veículo e/ou carreador e/ou diluente e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[0294] Esse fármaco ou vacina destina-se à prevenção e/ou tratamento e/ou alívio de condição ou doença na qual deseja-se aumento da atividade de IL-15, tal como notadamente câncer ou imunodeficiência. Esse fármaco ou vacina pode agir estimulando a proliferação e/ou sobrevivência de linfócitos (tais como células T, células T $CD8^+$, células NK, células dendríticas) e/ou sua atividade contra células tumorais.

[0295] A presente invenção refere-se mais especificamente a vacina ou fármaco antitumoral que exerce a sua ação preventiva e/ou de alívio e/ou terapêutica por meio do estímulo da proliferação de células T CD8+ e NK que expressam IL-15R beta/gama mas não IL-15R alfa.

[0296] Essa vacina ou fármaco antitumoral destina-se, portanto, aos pacientes cujas populações de células T CD8+ e/ou NK sejam insuficientemente ativas para exercer liberação ou supervisão antitumoral eficiente.

[0297] Essa vacina ou fármaco antitumoral destina-se mais especificamente aos pacientes que possuem população insuficiente ou população insuficientemente ativa de células T CD8+ e/ou NK que expressam IL-15R beta/gama mas não IL-15R alfa.

[0298] Fármaco antitumoral ou vacina de acordo com a presente invenção pode compreender domínio sushi IL-15R alfa isolado ou sua variante conservada.

[0299] Vacina ou fármaco antitumoral preferido de acordo com a presente invenção compreende:

- pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, conforme definido no presente pedido, tal como IL-15; e

- pelo menos um polipeptídeo que contém sushi, conforme definido no presente pedido, tal como domínio sushi IL-15R alfa isolado, ou sua variante conservada.

[0300] Preferencialmente, pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, tal como IL-15, e o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi, tal como domínio sushi de IL-15R alfa isolado, ou sua variante conservada, são ligados em proteína de fusão, de maneira a formar composto covalentemente ligado de acordo com a presente invenção.

[0301] A presente invenção também se refere à prevenção e/ou alívio e/ou tratamento de doença ou condição que envolve imunodeficiência.

[0302] A presente invenção refere-se mais especificamente à prevenção e/ou alívio e/ou tratamento de doença ou condição que envolve imunodeficiência relativa ao HIV.

[0303] Esta prevenção e/ou alívio e/ou tratamento compreende a administração de produto de acordo com a presente invenção a paciente dele necessitado.

[0304] A presente invenção refere-se a fármaco e/ou composição para essa prevenção e/ou alívio e/ou tratamento.

[0305] A presente invenção refere-se, portanto, a adjuvante para composição imunoterapêutica, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um elemento dentre os elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;
- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;
- vetor de acordo com a presente invenção;
- célula hospedeira de acordo com a presente invenção.

[0306] Convenientemente, o mencionado adjuvante aumenta a reação de memória de CD8.

[0307] No presente pedido, “imunoterapia” engloba terapia, paliação e/ou prevenção por meio de indução e/ou estímulo de reação imunológica. A expressão “composição imunoterapêutica” engloba, portanto, vacinas preventivas, bem como “vacinas” paliativas e/ou terapêuticas.

[0308] O termo “adjuvante” destina-se a definir substância que pode ser adicionada a composição para aprimorar reação imunológica (reação imunológica inata e/ou reação imunológica adaptativa). Na presente invenção, ele engloba ainda substância que pode ser adicionada a composição para aumentar a eficiência dessa composição ao longo do tempo, ou seja, a duração da reação imunológica (células T CD8+ de memória).

[0309] O composto de acordo com a presente invenção pode ser utilizado em composição na forma de composto adjuvante, mas pode também agir por si próprio como princípio ativo.

[0310] É realmente, e por si próprio, capaz de induzir e/ou estimular a proliferação e ativação de células IL-15R beta/gama-positivas e, mais especificamente, a diferenciação de células T e/ou NK de células T e/ou NK nativas.

[0311] A expressão “princípio ativo” destina-se a definir substância que pode proporcionar reação imunológica.

[0312] Como adjuvante para composição imunoterapêutica, composto de acordo com a presente invenção aumenta a intensidade da reação imunológica (reação imunológica inata; reação imunológica adaptativa) e/ou aumenta a duração da reação imunológica (aumenta a reação de memória CD8 T).

[0313] Como agente ativo para composição imunoterapêutica, composto de acordo com a presente invenção induz reação imunológica, que é de maior intensidade e/ ou mais longa duração que a induzida por outros estimulantes de células NK/T.

[0314] Desta forma, se utilizado como adjuvante em associação com outra reação imunológica induzida, ou utilizado como princípio ativo que, por si próprio, induz reação imunológica, composto de acordo com a presente invenção aumenta a intensidade e/ou a duração da reação imunológica. Convenientemente, ele:

- induz reação imunológica inata aprimorada;

- induz reação imunológica adaptativa aprimorada e, mais especificamente, reação de memória CD8 aprimorada.

[0315] O pedido também se refere à composição adjuvante que compreende pelo menos um elemento dentre os elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção, conforme definido no presente pedido;

- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;

- vetor de acordo com a presente invenção;

- célula hospedeira de acordo com a presente invenção.

[0316] O pedido também se refere a método de produção de adjuvante para composição imunoterapêutica, caracterizado pelo fato de que compreende:

- fornecimento de molécula de IL-15R alfa solúvel ou seu fragmento que tenha retido o seu domínio sushi;

- ligação por meio de covalência a elemento de ligação de IL-15R beta/gama, selecionado a partir de IL-15, fragmento, agonista ou mimético de IL-15 que possui afinidade para ligação a IL-15R beta/gama que não é significativamente mais baixa que a de IL-15 nativo (capaz de competir com IL-15 nativo e/ou IL-2 para ligação a IL-15R beta/gama) e que preferencialmente não se liga a IL-2R alfa; por meio do quê o composto dele resultante é adjuvante para composição imunoterapêutica.

[0317] A presente invenção também se refere à composição, composição farmacêutica ou fármaco que compreende pelo menos um polipeptídeo que contém o domínio sushi de IL-15R alfa, conforme definido no presente pedido, ou seja, em que a sequência de aminoácidos do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi:

- é a sequência de aminoácidos da região extracelular de IL-15R alfa humano ou de seu fragmento que tenha retido o domínio sushi do mencionado IL-15R alfa, em que o domínio sushi de IL-15R alfa é definido como iniciando no primeiro resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C1) e terminando no quarto resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C4), em que os dois resíduos, C1 e C4, são incluídos na sequência sushi; ou

- é pelo menos 85% idêntico a essa sequência de IL-15R alfa ou fragmento de IL-15R alfa, desde que cada um dos quatro resíduos de cisteína (C1, C2, C3 e C4) do mencionado domínio sushi tenha sido retido.

[0318] Preferencialmente, o mencionado percentual de identidade é de pelo menos 90%, de preferência ainda maior de pelo menos 92%, de preferência superior de pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%.

[0319] A presente invenção refere-se mais especificamente a composição, composição farmacêutica ou fármaco que compreende pelo menos um polipeptídeo que contém o domínio sushi de IL-15R alfa, conforme definido no presente pedido, em que o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi compreende ou consiste da parte de IL-15R alfa extracelular que é codificada pelos exons 2 e 3 ou fragmento dessa parte que tenha retido o domínio sushi.

[0320] A presente invenção refere-se preferencialmente a composição, composição farmacêutica ou fármaco que compreende:

- fragmento de IL-15Ralfa humano, cuja sequência de aminoácidos é o aminoácido que se estende da posição 1 até a posição 127 de SEQ ID Nº 3; ou

- seu subfragmento que tenha retido o domínio sushi do mencionado fragmento, em que:

- o mencionado domínio sushi é definido como começando no primeiro resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C1) e terminando no quarto resíduo de cisteína codificado por exon 2 (C4), em que os dois resíduos, C1 e C4, são incluídos no domínio sushi; e

- a sequência de aminoácidos do mencionado peptídeo de sinal é a sequência que se estende da posição 1 à posição 30 do mencionado SEQ ID Nº 3;

ou

- variante do mencionado fragmento ou subfragmento, que possui identidade de sequências de aminoácidos de pelo menos 85% ao longo de todo

o comprimento do mencionado fragmento ou subfragmento.

[0321] Preferencialmente, o mencionado percentual de identidade é de pelo menos 90%, de preferência ainda maior de pelo menos 92%, de preferência superior pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%.

[0322] Essa composição, composição farmacêutica ou fármaco pode ainda compreender pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, tal como IL-15, ou fragmento ou variante de IL-15 conforme definido no presente pedido.

[0323] A mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama pode ser não ligada ao mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi por meio de covalência, ou seja, ser colocada em forma livre na mencionada composição e/ou pode ser ligada por meio de covalência ao mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi. No último caso, a composição, composição farmacêutica ou fármaco de acordo com a presente invenção de fato compreende composto de acordo com a presente invenção conforme definido no presente pedido.

[0324] Essa composição farmacêutica ou fármaco pode destinar-se a agonizar ação biológica de IL-15 e, mais especificamente, induzir e/ou estimular a proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama positivas.

[0325] Essa composição farmacêutica ou fármaco pode destinar-se a induzir e/ou estimular a proliferação e/ou a ativação de reação imunológica NK e/ou T. Essa composição farmacêutica ou fármaco pode destinar-se a composição de vacina terapêutica e/ou paliativa e/ou preventiva.

[0326] Essa composição farmacêutica ou fármaco pode destinar-se à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de doença infecciosa e/ou à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de imunodeficiência (tal como imunodeficiência induzida por HIV) e/ou à prevenção e/ou paliação e/ou

tratamento de presença ou desenvolvimento de tumor (e pode conter ainda pelo menos um antígeno de tumor) e/ou à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de X-SCID.

[0327] Segundo realização vantajosa da presente invenção, o mencionado pelo menos polipeptídeo que contém sushi é ligado covalentemente à entidade de ligação de IL-15R beta/gama. De maior preferência, esta entidade de ligação de IL-15R beta/gama não se liga a IL-2R alfa.

[0328] Segundo realização preferida da presente invenção, o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi é ligado covalentemente à entidade de ligação de IL-15R beta/gama, que é IL-15, ou fragmento, mimético ou agonista de IL-15, que possui afinidade de ligação a IL-15R beta/gama que não é significativamente mais baixa que a de IL-15 nativo (ou seja, fragmento, mimético ou agonista que é capaz de competir com IL-15 nativo e/ou IL-2 para ligação a IL-15R beta/gama).

[0329] A presente invenção se refere mais especificamente, portanto, a composição farmacêutica destinada a estímulo da via de sinalização de IL-15R beta/gama, de forma a induzir e/ou estimular a ativação e/ou a proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células T e/ou NK, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um elemento dentre os elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;
- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;
- vetor de acordo com a presente invenção;
- célula hospedeira de acordo com a presente invenção.

[0330] Essa composição farmacêutica pode compreender adicionalmente veículo farmaceuticamente aceitável (veículo, diluente, excipiente, aditivo, ajustador de pH, emulsificante ou agente dispersante,

conservante, tensoativo, agente gelificante, bem como tampão e outro agente estabilizante e solubilizante etc.).

[0331] A presente invenção também se refere ao fármaco, destinado a estimular a via de sinalização de IL-15R beta/gama, de forma a induzir e/ou estimular a ativação e/ou proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células NK e/ou T, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um elemento dentre os elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;
- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;
- vetor de acordo com a presente invenção;
- célula hospedeira de acordo com a presente invenção.

[0332] O mencionado fármaco é preferencialmente uma composição imunoterapêutica.

[0333] Esse fármaco é de maior preferência composição de vacina preventiva e/ou paliativa e/ou terapêutica.

[0334] O mencionado fármaco pode compreender adicionalmente veículo fisiologicamente apropriado (carreador, diluente, excipiente, aditivo, ajustador de pH, agente emulsificante ou dispersante, conservante, tensoativo, agente gelificante, bem como agente tampão ou outro estabilizante e solubilizante etc.).

[0335] Veículos e formulações farmaceuticamente aceitáveis apropriadas incluem todos os veículos e formulações farmaceuticamente aceitáveis conhecidas, tais como descrito em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, vigésima edição, Mack Publishing Co.; e *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Ansel, Popovich e Allen Jr., Lippincott Williams e Wilkins.

[0336] De forma geral, a natureza do veículo dependerá do modo específico de administração sendo empregado. Formulações parenterais

normalmente compreendem, além do um ou mais agentes de contraste, por exemplo, fluidos injetáveis que incluem fluidos farmacêutica e fisiologicamente aceitáveis, que incluem água, solução salina fisiológica, soluções de sal balanceado, tampões, dextrose aquosa, glicerol, etanol, óleo de gergelim, suas combinações ou similares como veículo. O meio pode também conter materiais adjuntos farmacêuticos convencionais, tais como sais farmaceuticamente aceitáveis para ajustar a pressão osmótica, tampões, conservantes e similares. O veículo e a composição podem ser estéreis e a formulação adequa-se ao modo de administração.

[0337] Para composições sólidas (tais como formas de pó, pílulas, pastilhas ou cápsulas), veículos sólidos não tóxicos convencionais podem incluir, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio ou estearato de magnésio. Além de veículos biologicamente neutros, composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, conservantes, agentes tamponantes de pH e similares, tais como acetato de sódio ou monolaurato de sorbitan.

[0338] A composição pode ser solução líquida, suspensão, emulsão, pastilha, pílula, cápsula, formulação de liberação sustentada ou pó. A composição pode ser formulada com aglutinantes e veículos tradicionais, tais como triglicérides.

[0339] Composição ou fármaco de acordo com a presente invenção é útil na indução e/ou estímulo de ação biológica de IL-15 por meio da via de sinalização de IL-15R beta/gama. É mais particularmente útil na indução e/ou estímulo de reação imunológica inata (células NK) e/ou imunidade adaptativa (células T e, mais especificamente, células de memória CD8+ T).

[0340] Segundo realização muito vantajosa da presente invenção, o mencionado fármaco pode destinar-se à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de presença ou desenvolvimento de tumor.

[0341] O mencionado tumor pode ser, por exemplo, melanoma, linfoma, carcinoma (tal como carcinoma da cervical), câncer de mama, câncer do ovário, tumor pancreático. Convenientemente, o mencionado fármaco antitumoral é vacina antitumoral que age por meio de transpresentação.

[0342] Fármaco antitumoral de acordo com a presente invenção pode compreender ainda pelo menos um antígeno de tumor. O mencionado pelo menos um antígeno de tumor pode apresentar-se em forma solúvel ou ser ligado a composto de acordo com a presente invenção (por meio de covalência ou outra forma de ligação).

[0343] O mencionado pelo menos um antígeno de tumor é convenientemente fornecido na forma de células dendríticas com esse antígeno, tais como células dendríticas geneticamente elaboradas que expressam o mencionado pelo menos um antígeno de tumor.

[0344] Antígenos de tumores são antígenos que são apresentados por moléculas MHC I sobre a superfície de células de tumores. Antígenos de tumores podem também apresentar-se sobre a superfície do tumor na forma de, por exemplo, receptor que sofreu mutação, caso em que será reconhecido por células B.

[0345] Antígenos de tumores podem às vezes ser apresentados somente por células de tumores e nunca pelas normais. Neste caso, eles são denominados antígenos específicos de tumores (TSA) ou antígenos de transplante específicos de tumores (TSTA), ou antígenos de rejeição de tumores (TRA) e resultam tipicamente de mutação específica de tumores. TSA normalmente surge quando vírus infeccioso houver feito com que a célula se torne imortal e expresse antígeno de vírus. TSA não induzido por vírus são os

idiotipos de BCR sobre linfomas de células B ou TCR sobre linfomas de células T.

[0346] Antígenos que são apresentados por células de tumores e células normais são mais comuns e denominados antígenos associados a tumores (TAA). TAA são encontrados sobre células de tumores e sobre células normais durante a vida do feto (antígenos oncofetais), após o nascimento em órgãos selecionados ou em muitas células mas em concentração muito mais baixa que sobre células de tumores.

[0347] Oncogenes podem ser expressos em vírus causadores de câncer. A maior parte dos oncogenes está de fato presente na célula hospedeira, onde funcionam no crescimento regulado das células. Ao sofrer transdução pelo vírus e ser expresso sob o controle do promotor viral, o produto do gene de célula hospedeira, ou seja, o produto do proto-oncogene, contribui para o crescimento desregulado da célula tumoral. Como proteínas codificadas por protooncogenes normalmente são expressas por células normais, a sua expressão excessiva sobre células de tumores as qualificaria como antígenos associados a tumores.

[0348] Linfócitos T citotóxicos que reconheceram esses antígenos podem ser capazes de destruir as células de tumores antes da sua proliferação ou metástase. Células de tumores podem, entretanto, regular para baixo a expressão de MHC Classe I. Eles freqüentemente não possuem moléculas coestimuladoras como moléculas de adesão ou B7 que são necessárias para a sua interação com células CD8+ T. Algumas células de tumores suprimem ativamente a reação imunológica por meio da produção de citocina supressiva, tal como TGF beta, que inibe a imunidade celular.

[0349] Exemplos de antígenos de tumores notadamente compreendem:

- reguladores do ciclo celular, tais como quinase 4 dependente de ciclina (melanoma);

- transdutores de sinais, tais como beta-catenina (melanoma);

- reguladores da apoptose, tais como caspase 8 (carcinoma de células escamosas);

-proteínas dos testículos, tais como antígenos MAGE (melanoma, tumores de mama e glioma), como MAGE-1 (número de acesso P43355), MAGE-2 (número de acesso P43356), MAGE-3 (número de acesso P43357), MAGE-4 (número de acesso P43358), MAGE-6 (número de acesso P43360), MAGE-8 (número de acesso P43361), MAGE-9 (número de acesso P43362), MAGE-10 (número de acesso P43363), MAGE-11 (número de acesso P43364), MAGE-12 (número de acesso P43365);

- composto envolvido na síntese de melanina (melanoma), tal como tirosinase (número de acesso P14679);

- idiotipos BCR, tais como idiotipo Ig de superfície (linfoma);

- receptores de tirosino quinase, tais como Her-2/neu, MUC-1 (câncer de mama e ovário);

- mucinas subglicosiladas, tais como MUC-1 (tumores de mama e do pâncreas);

- produtos de gene viral, tais como HPV E6 e E7 (carcinoma da cervical).

[0350] Composição ou fármaco de acordo com a presente invenção pode destinar-se à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de doença infecciosa (infecção por microorganismo, tal como vírus, bactéria, levedura, fungo etc.).

[0351] Composição ou fármaco de acordo com a presente invenção pode destinar-se à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de imunodeficiência (tal como imunodeficiência induzida como efeito colateral por tratamento específico, tal como tratamento antitumoral ou tratamento pré-enxerto; ou induzida por vírus, tal como HIV).

[0352] Composição ou fármaco de acordo com a presente invenção pode destinar-se à prevenção e/ou paliação e/ou tratamento de SCID-X (imunodeficiência combinada severa X-ligada, que é ligada a disfunção de IL-15R gama).

[0353] A formulação de composição farmacêutica que compreende pelo menos um dos produtos de acordo com a presente invenção encontra-se bem dentro do conhecimento da técnica. O mesmo é verdade para os detalhes de administração da mencionada composição. O médico que trata o paciente necessitará considerar, entre outros parâmetros, a idade, condições gerais e estado da doença.

[0354] Os compostos terapeuticamente úteis identificados segundo o método de acordo com a presente invenção podem ser administrados a paciente por meio de qualquer método apropriado para o composto específico, tal como oral, intravenoso, parenteral, transdérmico, transmucosa ou por meio de cirurgia ou implante (tal como com o composto na forma de matriz reabsorvível e biologicamente compatível sólida ou semi-sólida) no local em que se deseja o efeito do composto ou perto dele. Doses terapêuticas são determinadas como sendo apropriadas pelos técnicos no assunto e são função do peso do corpo.

[0355] A presente invenção também se refere a método de tratamento por meio de terapia e/ou paliação e/ou prevenção de paciente ou animal não humano dele necessitado com composto.

[0356] A presente invenção também se refere a método de tratamento de paciente dele necessitado (tratamento por meio de terapia e/ou paliação e/ou prevenção), por meio de administração de produto, composição ou fármaco de acordo com a presente invenção.

[0357] A presente invenção também se refere à via de indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama-positivas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contato de células IL-15R beta/gama-positivas com pelo menos um dos elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;

- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;

- vetor de acordo com a presente invenção;

- célula hospedeira de acordo com a presente invenção;

por meio do quê a proliferação e/ou ativação das mencionadas células IL-15R beta/gama-positivas é induzida e/ou estimulada.

[0358] O mencionado contato é realizado sob condições que permitem a proliferação e/ou ativação das mencionadas células IL-15R beta/gama-positivas. Essas condições notadamente compreendem o período de duração e as condições ambientais (temperatura, atmosfera, meio de cultura). O ajuste destas condições pertence à competência dos técnicos comuns no assunto.

[0359] A presente invenção também se refere a processo *in vitro* de indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama-positivas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- fornecimento de amostra de células que compreende células IL-15R beta/gama-positivas;

- contato da mencionada amostra com pelo menos um dos elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;

- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;

- vetor de acordo com a presente invenção;

- célula hospedeira de acordo com a presente invenção;

por período de tempo e sob condições ambientais que permitam que o mencionado contato induza e/ou estimule a proliferação e/ou ativação das mencionadas células IL-15R beta/gama-positivas.

[0360] A presente invenção também se refere a processo de produção de células T e/ou NK ativadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contato de células T e/ou NK em repouso com pelo menos um dos elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;

- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;

- vetor de acordo com a presente invenção;

- célula hospedeira de acordo com a presente invenção;

por período de tempo e sob condições ambientais que permitam que o mencionado contato induza a ativação das mencionadas células T e/ou NK em repouso compreendidas na mencionada amostra.

[0361] A presente invenção também se refere a processo *in vitro* de produção de células T e/ou NK ativadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- fornecimento de amostra de células que compreende células T e/ou NK em repouso;

- contato da mencionada amostra com pelo menos um dos elementos a seguir:

- composto de acordo com a presente invenção;

- ácido nucléico de acordo com a presente invenção;

- vetor de acordo com a presente invenção;

- célula hospedeira de acordo com a presente invenção;

por período de tempo e sob condições ambientais que permitam que o mencionado contato induza a ativação das mencionadas células T e/ou

NK em repouso compreendidas na mencionada amostra.

[0362] No processo de indução e/ou estímulo da proliferação e/ou ativação de células IL-15R beta/gama-positivas e no processo de produção de células T e/ou NK ativadas, as células contatadas podem ser linhagens celulares. Elas podem alternativamente ser células *ex vivo* recolhidas de organismo (tal como paciente humano) e destinadas a ser devolvidas para esse ou outro organismo (tal como o mesmo paciente) após tratamento *in vitro*.

[0363] Desta forma, a presente invenção engloba a realização *ex vivo* dos mencionados processos e sua implementação no transcurso de tratamento por meio de terapia e/ou paliação e/ou prevenção.

[0364] No presente pedido, o códon de “parada” (TAG, TGA ou TAA) normalmente não é declarado como estando compreendido no CDS.

[0365] A expressão “que compreende”, que é sinônima de “que inclui” ou “que contém”, possui significado aberto e não inclui elemento(s), ingrediente(s) ou etapa(s) de método(s) adicionais não indicados, enquanto a expressão “que consiste de” é expressão fechada, que exclui qualquer elemento, etapa ou ingrediente adicional que não é indicado explicitamente. A expressão “que consiste essencialmente de” é expressão parcialmente aberta, que não exclui elemento(s), etapa(s) ou ingrediente(s) adicional(is) não indicado(s), desde que esse(s) elemento(s), etapa(s) ou ingrediente(s) adicional(is) não afete(m) materialmente as propriedades básicas e inovadoras da presente invenção.

[0366] A expressão “que compreende(m)” (ou “compreende(m)”) inclui, portanto, a expressão “que consiste(m) de” (“consiste(m) de”), bem como a expressão “que consiste(m) essencialmente de” (“consiste(m) essencialmente de”). Conseqüentemente, a expressão “que compreende(m)” ou (“compreende(m)”) é compreendida, no presente pedido, como englobando mais particularmente a expressão “que consiste(m) de” (“consiste(m) de”) e a

expressão “que consiste(m) essencialmente de” (“consiste(m) essencialmente de”).

[0367] O termo “significativamente” é utilizado no presente pedido no seu significado habitual no campo de estatística (tal como teste t, teste z, valor chi quadrado ou razão F etc.), ou seja, para comparar um valor com outro e determinar se esses valores diferem entre si. O termo “significativamente” engloba, portanto, o fato de que os técnicos no assunto podem considerar o desvio padrão (se houver), que mede a quantidade de difusão de dados em distribuição de freqüências. O valor p desejado normalmente é definido em nível alfa de 5% ou no nível alfa mais estringente de 1%.

[0368] Cada uma das revelações relevantes de todas as referências mencionadas no presente pedido é especificamente incorporada como referência. Os exemplos a seguir são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação.

EXEMPLOS

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

CULTURA CELULAR E CITOCINAS:

[0369] IL-15 humano recombinante (rIL-15) foi da Peprotech Inc. (Rocky Hill NJ). A linhagem de células de leucemia mielóide Mo-7 (linhagem de células humanas que expressam IL-15Rβ/γ mas não IL-15Rα) e a linhagem de células humanas de eritroleucemia TF-1 (linhagem celular que expressa IL-15Rα e IL-15Rγ, mas não IL-15Rβ; ATCC CRL-2003) foram cultivadas em meio RPMI 1640 que contém 10% de soro de feto de bezerro desativado por calor (FCS), 2 mM de glutamina e 1 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems; Abington, Reino Unido). Células TF1-β (22) foram cultivadas no mesmo meio suplementado com 250 μg/ml de geneticin. A linhagem de células de linfoma T humanas Kit 225 (linhagem celular dependente de IL-2) foi cultivada em meio RPMI 1640

contendo 6% FCS, 2 mM de glutamina e 10 ng/ml de rIL-2 (Chiron, Emeryville CA).

[0370] A linhagem de células 32Dβ de camundongo que expressa cadeia IL-15Rγ de camundongo endógeno e cadeia IL-15Rβ humana transfectada (linhagem de células 32D disponível por meio da ATCC CRL-11346) foi cultivada em RPMI, 10% FCS, 0,4 ng/ml de m-IL-3, 10 μg/ml de b-mercaptoetanol e 250 μg/ml de geneticina.

sIL-15Rα-IL2, sIL-15Rα-SUSHI-IL-2 E sIL-15Rα-SUSHI:

[0371] sIL-15Rα-IL-2 foi expresso em células CHO e preparado conforme descrito (23). Foi elaborada construção similar na qual o domínio sushi de IL-15Rα (aminoácidos 1 a 66 de sequência de codificação madura) foi ligado à molécula de IL-2 humano (sIL-15Rα-sushi-IL-2).

[0372] O domínio sushi de IL-15Rα foi amplificado por meio de PCR. Produtos de PCR foram purificados, digeridos com BamHI e HindIII (Fermentas, Vilna, Lituânia) e ligados a vetor de expressão de pQE30. Expressão foi realizada em células de *E. coli SG13009* sob indução de IPTG. Após a lise celular, corpos de inclusão foram lavados, solubilizados em 6 mM de guanidina HCl, 20 mM de fosfato de sódio, pH 7,4, 20 mM de imidazol, 150 mM de cloreto de sódio e 1 mM de DTT. O IL-15Rα-sushi foi capturado sobre coluna de Ni-NTA agarose (Qiagen) equilibrada com o tampão de solubilização mais 1 mM de glutationa reduzida e 0,2 M de glutationa oxidada. Ele foi novamente dobrado por meio de gradiente de 6 a 0 M guanidino HCL em tampão de coluna (24) e eluído com 250 mM de imidazol.

PROTEÍNAS DE FUSÃO DE ILR E RLI:

[0373] As construções das proteínas de fusão são exibidas na Fig. 2E. Domínio sushi de IL-15Rα humano (aa 1-77) e IL-15 humano foram separados pelo ligante 20 (SGGSGGGGSGGGSGGGGSLQ; SEQ ID Nº 50) para RLI, ou pelo ligante 26 (SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ,

SEQ ID Nº 52) para ILR. Codificação de sequências para o epítopo Flag e sítio de ligação de Fator Xa (DYKDDDDKIEGR, SEQ ID Nº 54, para RLI; TTRDYKDDDDKIEGR, de SEQ ID Nº 56, para ILR) foi adicionada entre o peptídeo de sinal (sp) e as sequências de codificação. O sp endógeno de IL-15Rα humano (SEQ ID Nº 5) foi utilizado para RLI e o sp de preprolactina bovina (SEQ ID Nº 58) para ILR.

[0374] Estas construções foram inseridas entre o sítio BamHI e HindIII de vetor de expressão pFastBac 1 (In Vitrogen) para gerar dois vetores de expressão que foram recombinados no DNA de bacilovírus utilizando o sistema de expressão de Bac em Bac (In Vitrogen). Os bacilovírus recombinantes foram utilizados para infectar células SF9 (ATCC CRL-1711) e proteínas de fusão foram expressas no meio SF 900 II (Gibco® Invitrogen Corp.) e colhidas quatro dias após a infecção. As concentrações das proteínas de fusão foram medidas por meio de ELISA com o mAb 247 anti-IL-15 (R & D Systems) como anticorpo de captura e o conjugado de M2-peroxidase anti-Flag (Sigma; St. Louis MO) como anticorpo revelador.

ESTUDOS DE RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE:

[0375] Estes experimentos foram realizados com biossensor BIACore 2000 (BIACore, Uppsala, Suécia). rIL-15 foi ligado covalentemente a chips sensores CM5 e a ligação de concentrações crescentes de sIL-15Rα-IL-2, sIL-15Rα-sushi-IL-2 ou sIL-15Rα-sushi foi monitorada. Análise de sensogramas foi realizada utilizando software de avaliação cinética BIAlogue.

TESTES DE PROLIFERAÇÃO:

[0376] As reações proliferativas de Mo-7, TF-1β e células Kit 225 a rIL-15, rIL-2, RLI ou ILR foram medidas por meio de incorporação de [^{3}H]-timidina conforme descrito (19) após quatro horas em meio sem citocina, 48 horas de cultura e 16 horas com [^{3}H]-timidina.

APOPTOSE:

[0377] O teste de anexina V foi realizado utilizando citômetro de fluxo FACScan e o kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC (BD Biosciences Pharmingen, França). Após a ausência de citocina, as células foram semeadas em placas com múltiplas cavidades a 5 x 10^5 células/cavidade em 1 ml e cultivadas em meio suplementado com os diversos reagentes (rIL-15, sIL-15Rα-sushi e proteína de fusão de RLI). Dados foram obtidos e analisados com o uso do software CellQuest.

TESTES DE LIGAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO:

[0378] Marcação com [^{125}I]-iodo de rIL-15, sIL-15Rα-sushi e proteínas de fusão de RLI humanas e experimentos de ligação subseqüentes foram realizados conforme descrito anteriormente (19). Para internalização, as células foram equilibradas a 4 ºC com sIL-15Rα-sushi ou RLI marcado e a temperatura foi alterada para 37 ºC. Em diferentes intervalos de tempo, duas amostras foram lavadas e centrifugadas. Uma das pelotas celulares foi tratada com tampão glicina-HCl 0,2 M, pH 2,5, enquanto a outra foi tratada com PBS pH 7,4 a 4 ºC por cinco minutos. Após a centrifugação, o total de ligação de ligante foi determinado a partir da pelota das células tratadas com PBS, enquanto as frações internalizadas e unidas por membrana foram determinadas, respectivamente, a partir do sobrenadante e pelota de células tratadas com pH ácido.

SIL-15RA-SUSHI$^+$: SIL-15Rα-SUSHI +

[0379] Marcado com Flag-Fator Xa foi expresso em meio de células SF9 de insetos (ATCC CRL-1711), SF 900 II (In Vitrogen, Cergy-Pontoise, França), conforme descrito para as proteínas de fusão RLI e ILR. Os sobrenadantes foram concentrados por meio de precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação e carregados sobre coluna de imunoafinidade de agarose anti-Flag (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, França). A

pureza do sIL-15Ra-Sushi^{+} foi de 100% com massa molecular aparente de 12 kDa, conforme determinado por meio de SDS-PAGE após iodação com método de cloramina-T conforme descrito anteriormente (Lehours *et al*, *Eur. Cyotkine Netw.* 11 (2000), 207-5). A sua concentração foi determinada por meio de teste de proteína com base em ácido bicinchonínico (BCA) (Pierce, Perbio Science, Brebières, França).

RESULTADOS

A LIGAÇÃO DE IL-15Rα A IL-15 DEVE-SE PRINCIPALMENTE AO DOMÍNIO SUSHI:

[0380] Estudo anterior (25) demonstrou que a remoção do domínio “sushi” codificado pelo exon 2 de IL-15R resultou em completa anulação da ligação de IL-15 a IL-15Rα ancorado por membrana, o que sugere que o domínio sushi foi indispensável para ligação. A fim de medir diretamente a contribuição do domínio sushi em ligação de IL-15, formas solúveis de IL-15Rα que contêm o domínio extracelular completo ou somente o domínio sushi N-terminal foram preparadas e testadas para determinar a ligação de IL-15 em teste de competição e utilizando a tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR).

[0381] Conforme exibido na Fig. 1A, proteína de fusão sIL-15Rα-IL-2 produzida em células CHO e que compreende o domínio extracelular de IL-15Rα completo ligado à molécula de IL-2 humano (utilizado como marcador para purificação), uniu IL-15 com alta afinidade (kon = 3,7 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$; koff = 1,4 10^{-5} s^{-1}; Kd = 38 pM). Construção similar que liga o domínio sushi de IL-15Rα a IL-2 humano também uniu IL-15 (Fig. 1B) mas com afinidade dez vezes mais baixa, principalmente devido à taxa de desligamento mais rápida (kon = 3,1 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$; koff = 1,3 10^{-4} s^{-1}; Kd = 420 pM).

[0382] Domínio sushi solúvel também foi produzido em *E. coli*. Este sIL-15Rα-sushi também uniu IL-15 com afinidade mais baixa (kon = 2,5 10^5 $M^{-1}s^{-1}$; koff = 3,8 10^{-4} s^{-1}; Kd = 1,5 nM) (Fig. 1C).

[0383] Estes resultados indicam que o domínio sushi é responsável pela maior parte da afinidade de ligação de IL-15, mas que ele não reconstitui completamente a ligação de alta afinidade exibida pelo domínio extracelular de comprimento completo.

[0384] Conforme exibido na Figura 1E, domínio sushi solúvel estendido até os primeiros treze aminoácidos codificados por exon 3, denominado região de articulação, exibiu aumento de quatro vezes da afinidade de ligação em comparação com sIL-15Rα-Sushi-IL-2, que contém domínio sushi não estendido, e afinidade apenas três vezes mais baixa que o IL-15Rα solúvel de comprimento total, enquanto todas as três construções foram produzidas em sistemas eucarióticos que possuem capacidades de dobra similares. Estes resultados indicam que o domínio sushi estendido até a região de articulação reconstitui quase totalmente a ligação de alta afinidade exibida pelo domínio extracelular de comprimento total.

[0385] Os resultados da análise de sensorgramas que geram as constantes de afinidade para IL-15 (K_D), calculadas para as várias proteínas IL-15Rα solúveis, e a constante de teste estatístico (Chi 2), são exibidos na Tabela 3 abaixo.

TABELA 3

	K_D (pM)	Chi 2
sIL-15R-IL-2	34	0,183
Sushi15-IL-2	428	0,159
Sushi 15+	102	0,443

PROTEÍNAS IL-15Rα SOLÚVEIS INIBEM A LIGAÇÃO DE IL-15 A IL-15Rα ANCORADO POR MEMBRANA:

[0386] As três formas solúveis de IL-15Rα foram testadas para determinar a sua capacidade de competir pela ligação de IL-15 a IL-15Rα radioiodados expressos pela linhagem de células humanas TF-1 que também expressa à cadeia IL-15Rγ, mas não a cadeia IL-15Rβ (Fig. 1D). As três proteínas inibiram completamente a ligação de IL-15 a células TF-1 com IC50s correspondentes que foram similares aos Kds medidos por meio da tecnologia SPR: 100 pM (sIL-15R (-IL-2), 270 pM (sIL-15Rα-sushi-IL-2) e 1,3 nM (sIL-15Rα-sushi).

SIL-15Rα-SUSHI AUMENTA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DIRIGIDAS POR IL-15 POR MEIO DO COMPLEXO IL-15Rβ/γ.

[0387] Como o domínio sushi solúvel foi facilmente produzido em *E. coli* em altos rendimentos, ele foi selecionado para todos os estudos adicionais. Em primeiro caso, ele foi testado sobre linhagens celulares que expressam somente o complexo de IL-15Rβ/γ (linhagem de células Mo-7 humanas e linhagem de células 32Dβ de camundongos que expressam cadeia IL-15Rγ de camundongo endógeno e cadeia IL-15Rβ humana transfectada). Conforme esperado, a linhagem de células Mo-7 proliferou-se em resposta a concentrações nanomolares de rIL-15 ou rIL-2 (Fig. 2A e 2B). Inesperadamente, a adição no teste de concentração fixa de sIL-15Rα-sushi (10 nM) aumentou a reação proliferativa que foi alterada em cerca de quatro vezes em direção a concentrações mais baixas de rIL-15. Por si próprio, sIL-15Rα-sushi não induziu nenhuma reação proliferativa. Em 32Dβ, resultados similares foram obtidos com alteração de cerca de dez vezes. A especificidade foi determinada pelo fato de que sIL-15Rα-sushi não afetou a proliferação dirigida por rIL-2 de células Mo-7 (Fig. 2B). A Fig. 2C demonstra que, de forma dependente de dose, sIL-15Rα-sushi, com IC50 (3,5 nM)

similar ao seu Kd para IL-15, potencializou o efeito de concentração fixa de rIL-15 (1 nM) que sozinho induz efeito proliferativo apenas pequeno.

PROTEÍNAS DE FUSÃO RLI E ILR SÃO POTENTES INDUTORES DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR MEIO DO COMPLEXO DE IL-15Rβ/γ:

[0388] A fim de avaliar se o efeito sinérgico de sushi sobre a bioatividade de IL-15 poderá ser transferido sobre uma única molécula, foram elaboradas construções moleculares que codificam proteínas de fusão que ligam IL-15 e o domínio sushi. Para as duas construções, ligante flexível foi introduzido entre o terminal C de IL-15 e o terminal N do domínio sushi (ILR) ou vice-versa (RLI) (Fig. 2E). Modelos moleculares que ilustram as estruturas dessas proteínas são exibidos na Fig. 2F. Estas duas proteínas de fusão foram testadas sobre a proliferação de células Mo-7.

[0389] Conforme exibido na Fig. 2D, as duas proteínas induziram indução dependente de dosagem da proliferação de células Mo-7, com EC50s que foram similares (cerca de 25 pM) e muito mais baixos que os EC50s de rIL-15 isoladamente (3 nM) ou de quantidade equimolar de rIL-15 mais sI-15Rα-sushi (0,9 nM). Estes resultados confirmam ainda o efeito sinérgico de sIL-15Rα-sushi sobre a ação de IL-15 e indicam que a estabilização do complexo de IL-15 e sIL-15Rα-sushi com ligante covalente aumenta notadamente esta ação sinérgica.

SIL-15Rα-SUSHI AUMENTA A PREVENÇÃO INDUZIDA POR IL-15 DE APOPTOSE E RLI EVITA EFICIENTEMENTE A APOPTOSE CELULAR:

[0390] Após a retirada de citocina, a fração de células Mo-7 apoptóticas elevou-se de 10% para 80% em 48 horas (Fig. 3A, gráficos a e b). Quando adicionado no momento zero, rIL-15 (5 nM) reduziu essa apoptose para 70% (Fig. 3A, gráfico c). Isoladamente, sIL-15Rα-sushi (10 nM) não apresentou efeito (Fig. 3Ab). Entretanto, ela potencializou notadamente o efeito antiapoptótico de rIL-15 (35% apoptose em 48 horas) (Fig. 3A, gráfico c). O efeito

sinérgico de sIL-15Rα-sushi sobre a prevenção de apoptose por IL-15 é confirmado por meio de análise cinética (Fig. 3B) e por curvas de reação à dosagem (Fig. 3C). rIL-15 agiu com IC50 de cerca de 1,5 nM, valor de acordo com a saturação de receptores de IL-15β/γ. Este IC50 foi cerca de dez vezes mais baixo (170 pM) na presença de 10 nM de sIL-15Rα-sushi. A proteína de fusão de RLI notadamente evitou a apoptose (Fig. 3B). Em base molar, ela foi ainda mais ativa que a associação de IL-15 e sIL-15Rα-sushi, com IC50 de cerca de 40 pM (Fig. 3C).

SIL-15Rα-SUSHI AUMENTA A LIGAÇÃO DE IL-15 A CÉLULAS MO-7 E A PROTEÍNA DE FUSÃO DE RLI LIGA-SE A CÉLULAS MO-7 E É INTERNALIZADA POR ELAS:

[0391] Conforme esperado, células Mo-7 se ligaram a IL-15 com afinidade intermediária (Kd = 13,5 nM), com capacidade máxima de ligação de 800 sítios /célula (Fig. 4A). A adição de sIL-15Rα-sushi (10 nM) aumentou a afinidade de ligação de IL-15 (Kd = 7 nM) sem afetar significativamente a capacidade máxima de ligação (1180 sítios /célula). Ao utilizar proteína de fusão de RLI radioiodada (Fig. 4B), concluímos que ela se uniu a quantidade similar de sítios receptores (730 sítios por célula) e a afinidade de ligação (Kd = 780 pM) foi notadamente mais alta que a de IL-15. A Fig. 4C demonstra que RLI pode ser rápida e eficientemente internalizado. A fração de radioatividade ligada por célula caiu em cerca de vinte minutos e foi acompanhada por aumento simultâneo da radioatividade intracelular.

SIL-15Rα-SUSHI NÃO AFETA A PROLIFERAÇÃO CELULAR DIRIGIDA POR IL-15 NEM A INIBIÇÃO DE APOPTOSE POR MEIO DO COMPLEXO DE IL-15Rα/β/γ COM ALTA AFINIDADE:

[0392] A linhagem de células de linfoma humano Kit 225 expressa cadeias de IL-15Rα, β e γ endógenas e a linhagem de células TF-1β humanas expressa cadeias IL-15Rα e γ endógenas mais cadeia IL-15Rβ humana transfectada. Conseqüentemente, essas linhagens celulares proliferam-se em

resposta a baixas concentrações picomolares de IL-15 conforme exibido nas Figs. 5A e 5B (EC50 = 19 pM e 21 pM, respectivamente). Ao contrário do encontrado em células Mo-7 ou 32Dβ, a adição de concentrações equimolares de sIL-15Rα-sushi a IL-15 não afetou significativamente a curva de reação à dosagem de IL-15 em nenhum tipo de célula. A proteína de fusão de ILR foi tão ativa quanto rIL-15 nas duas linhagens celulares. RLI foi também tão ativa quanto rIL-15 sobre células Kit 225, mas foi cerca de dezesseis vezes mais eficiente (EC50 = 1,2 pM) que rIL-15 sobre células TF-1β.

[0393] Os efeitos de sIL-15Rα-sushi e RLI foram adicionalmente analisados sobre apoptose de células TF-1β induzida por esgotamento de citocinas. Histogramas são exibidos na Fig. 5C (gráficos a, b, c e d), enquanto curvas de reação à dosagem e cinética são exibidas nas Figs. 5D e 5E, respectivamente. rIL-15 inibiu, de forma dependente de tempo e dosagem, a apoptose de TF-1β. sIL-15Rα-sushi isoladamente não apresentou efeito nem alterou o efeito de IL-15. A proteína de fusão de ILR foi tão ativa quanto rIL-15, embora RLI apresentasse efeito protetor que foi cerca de três vezes mais alto que o de rIL-15 (IC50 = 2,5 pM para RLI em vez de 6,5 pM para rIL-15 ou sIL-15Rα-sushi mais rIL-15).

LIGAÇÃO DE IL-15, SIL-15Rα-SUSHI E RLI A CÉLULAS TF1β:

[0394] Enquanto IL-15Rα-sushi não afetava a proliferação de IL-15 de TF-1β, examinamos o seu efeito sobre a ligação de IL-15 que foi analisada em ampla faixa de concentração (Fig. 6A). Análise Scatchard da curva de saturação de ligação indicou a presença de duas classes de sítios de ligação de IL-15, compatíveis com a presença de pequena quantidade de sítios de ligação com alta afinidade (complexos de IL-15Rα/β/γ, Kd = 22 pM, Bmax = 100 sítios /célula) mais quantidades mais altas de sítios de ligação de afinidade intermediários (complexos de IL-15Rβ/γ, Kd = 30 nM, 2800 sítios /célula). sIL-15Rα-sushi induziu aumento da ligação de IL-15 que, sob análise Scatchard,

deveu-se principalmente a aumento da afinidade de ligação de IL-15 para o componente de afinidade intermediária (Kd = 3,5 nM).

[0395] A fim de testar mais especificamente o efeito de sIL-15Rα sobre o componente de alta afinidade, o seu efeito foi analisado sob baixas concentrações de IL-15 radiomarcado. Conforme exibido na Fig. 6B, sIL-15Rα-sushi, sob concentrações de até 25 nM, não afetou a ligação de IL-15 de baixas concentrações de IL-15 (200 pM) que se dirigem principalmente ao receptor de alta afinidade (Fig. 6B).

[0396] A ligação de sIL-15Rα-sushi radiomarcado a células TF-1β (Fig. 6C) revelou componente de ligação específico que foi estritamente dependente da presença de rIL-15. Na presença de 1 nM de rIL-15, o Kd que reflete a ligação de sIL-15Rα-sushi foi de 3,5 nM, valor compatível com a sua afinidade para IL-15, com capacidade máxima de ligação (3300 sítios /célula) compatível com o número de sítios de ligação intermediários de IL-15. Conforme exibido adicionalmente na Fig. 6D, o sIL-15Rα-sushi radiomarcado foi internalizado eficientemente. Proteína de fusão de RLI radiomarcada também se uniu a células TF1β (Fig. 6E). Observou-se componente de ligação específico isolado com Kd de 250 pM e capacidade máxima (4000 sítios /célula) novamente comparável com a quantidade de sítios de ligação com afinidade intermediária de IL-15. Uma vez ligado, RLI também foi internalizado eficientemente (Fig. 6F).

DISCUSSÃO

[0397] Demonstrou-se anteriormente que a exclusão de exon 2 de IL-15Rα humano anula completamente a ligação de IL-15, o que indica o papel dispensável do domínio sushi em reconhecimento de citocinas (25). A presente invenção demonstra que a remoção da extremidade C-terminal (exons 3 a 5) da parte extracelular de IL-15Rα (no contexto da proteína de fusão sIL-15Rα-IL-2) resulta em redução de dez vezes a sua afinidade de ligação para IL-15, conforme

observado por meio de SPR, e redução de 3,5 vezes da sua afinidade conforme observado em teste de competição.

[0398] Em termos de termodinâmica, a redução de dez vezes da afinidade foi calculada para corresponder a perda de 10% da energia livre de interação de IL-15 com IL-15Rα. Desta forma, o domínio estrutural N-terminal codificado por exon 2 (domínio sushi) contém a maior parte (90%), mas não toda a capacidade de ligação de IL-15. Dados recentes do nosso laboratório indicam que domínio codificado por exon 3 também contribui com a ligação de IL-15.

[0399] O sIL-15Rα-sushi produzido em *E. coli* apresentou afinidade que foi de três a quatro vezes mais baixa que a de sIL-15Rα-sushi-IL-2 produzido em células CHO. Esta diferença não pode ser explicada por diferenças na posição de glicosilação das duas proteínas, pois o domínio sushi não contém nenhum sítio potencial para glicosilações N ou O-ligadas (2). É portanto provável devido a diferenças das dobras estruturais das duas proteínas.

[0400] Embora competindo com a ligação de IL-15 à membrana IL-15Rα, concluiu-se que sIL-15Rα-sushi exerce efeitos agonistas aumentando a ação de IL-15 através do complexo de IL-15β/γ. Estudos sobre células que expressam apenas receptores de IL-15 com afinidade intermediária (Mo-7, 32Dβ) ou receptores de IL-15 com afinidade alta e intermediária (TF-1β, Kit 225) demonstraram que a ação agonista de sIL-15Rα-sushi foi dirigida especificamente ao complexo de IL-15Rβ/γ: (i) não apresentou efeito na ausência de IL-15, (ii) uniu-se a células TF-1β na presença de IL-15 com uma única classe de afinidade de sítios de ligação, cuja densidade foi comparável com a de sítios de ligação de IL-15 intermediários, (iii) sobre células Mo-7 e células TF-1β, ela aumentou a afinidade de IL-15 para o complexo de IL-15Rβ/γ embora não tenha afetado a ligação de IL-15 ao complexo de alta afinidade sobre células TF-1β, (iv) ela aumentou a eficiência da ação biológica de IL-15 (proliferação, prevenção contra apoptose) por meio de IL-15Rβ/γ sobre células

Mo-7, mas não apresentou efeito sobre os mesmos efeitos biológicos mediados por meio do receptor de alta afinidade sobre células TF-1β.

[0401] A funcionalidade desta ação agonista foi adicionalmente sustentada pelo fato de que sIL-15Rα-sushi, uma vez ligado em conjunto com IL-15 a IL-15Rβ/γ sobre células Mo-7, foi eficientemente internalizado em células. A sua potência foi fortalecida no contexto das proteínas de fusão ILR e RLI: (i) RLI ligado a IL-15Rβ/γ com afinidade quase vinte vezes melhor que o próprio IL-15, (ii) a ligação de RLI foi seguida por rápida internalização da proteína de fusão, (iii) as proteínas de fusão RLI ou ILR foram muito mais potentes que IL-15 nos testes funcionais. As curvas de reação à dosagem das duas proteínas de fusão sobre células Mo-7 foram comparáveis com as de IL-15 através do receptor de alta afinidade sobre células TF-1β ou Kit 225, o que indica que essas proteínas de fusão reconstituíram quase completamente a reação de alta afinidade sobre células que expressam apenas o receptor com afinidade intermediária.

[0402] Os resultados indicam, portanto, que sIL-15Rα-sushi e IL-15 compõem complexo que aumenta cooperativamente as suas afinidades de ligação ao receptor de IL-15Rβ/γ. Por outro lado, sIL-15Rα-sushi não é capaz de afetar a ligação e a bioatividade de IL-15, pois este último já está associado ao complexo receptor de alta afinidade de membrana. O fato de se sIL-15Rα-sushi possa ainda ligar-se a IL-15 já comprometido nesse complexo de alta afinidade não pode, entretanto, ser excluído e poderá ser testado com a disponibilidade de células que expressam principalmente receptor de alta afinidade, ou seja, células que expressam níveis similares das três subunidades receptoras.

[0403] O nosso laboratório demonstrou anteriormente que sIL-15Rα expresso em células COS ou produzido naturalmente por células IL-15Rα positivas comporta-se como antagonistas poderosos unindo IL-15 com alta afinidade (Kd = 166 pM) e inibindo a proliferação induzida por IL-15 de células Kit 225 sob baixas concentrações (IC50 de 3 a 10 pM) (19). Estes resultados são

contrários a presente invenção, o que demonstra que sIL-15Rα-sushi não apresenta efeito sobre a proliferação de células Kit 225 ou de células TF-1β e é agonista sobre células Mo-7.

[0404] Outro resultado contrastante é relatório recente que demonstra que mistura de rIL-15 com quimera homodimérica de sIL-15Rα (sem exon 3)-Fc humana recombinante poderá induzir efeito antiapoptótico sobre células Mo-7, enquanto rIL-15 isoladamente na mesma dose não apresentou efeito (26).

[0405] Em tentativa de explicar estas diferenças de ação, é proposto modelo na Fig. 7 do presente pedido de patente. No contexto da reação de IL-15 com alta afinidade, sIL-15Rα age como concorrente de IL-15Rα de membrana para o recrutamento de IL-15 (Fig. 7A). O complexo de sIL-15Rα-sushi com IL-15, por outro lado, é capaz de associar-se a IL-15Rβ/γ de membrana e aumentar o efeito biológico de IL-15 (Fig. 7B). Para explicar a ausência de efeito inibidor de sIL-15Rα-sushi no contexto do receptor de alta afinidade, existem duas alternativas (Fig. 7C). Segundo a primeira alternativa, sIL-15Rα-sushi possui afinidade mais baixa para IL-15 (Kd = 1,5 nM, este documento) que possui sIL-15Rα (Kd = 160 pM) (19) e, portanto, não é capaz de concorrer eficientemente com IL-15Rα de membrana sobre células Kit 225 ou TF-1β. Conforme a segunda alternativa, sIL-15Rα-sushi pode concorrer com IL-15Rα de membrana para se ligar a IL-15 e formar complexos com IL-15Rβ/γ similares aos formados sobre células Mo-7. Esses complexos são menos eficientes, pois necessitam de concentrações mais altas de IL-15 para que sejam ativados (IC50 = 750 pM em vez de 20 pM para receptores de alta afinidade, Figs. 2 e 5). Dado o fato de que IL-15Rβ/γ encontram-se em excesso a IL-15Rα em células Kit 225 ou TF-1β, a eficiência mais baixa desses complexos poderá ser compensada pela sua densidade mais alta (cerca de três mil receptores com afinidade intermediária em vez de cem receptores com alta afinidade sobre

células TF-1β, cf. Fig. 6). Isso resultaria em ausência de alterações observáveis em termos de efeitos biológicos. A nossa observação de que sIL-15Rα-sushi não afeta a ligação de alta afinidade de IL-15 sobre células TF-1β (Fig. 6B) favorece, entretanto, a primeira alternativa.

[0406] As diferenças funcionais entre sIL-15Rα e sIL-15Rα-sushi indicam que a extremidade C-terminal de sIL-15Rα desempenha papel fundamental para competir com IL-15Rα de membrana e, portanto, para a ação antagonista de sIL-15Rα. Esta extremidade impediria a associação de IL-15Rα solúvel com IL-15Rβ/γ, ou permitiria essa associação, mas resultaria em conformação inadequada de IL-15Rβ/γ para funcionamento. Mecanismo similar foi proposto no caso de cadeia γ comum solúvel (27). A atividade inibidora desta cadeia γ solúvel (correspondente à parte extracelular inteira da cadeia γ) foi abolida por meio de remoção da sua parte C-terminal ou por meio de mutações do motivo WSXWS, duas regiões não envolvidas na ligação de citocinas.

[0407] Os efeitos agonistas de sushi são reminiscentes dos efeitos agonistas descritos para receptores solúveis dentro da família IL-6 estendida de citocinas (nomeadamente, sIL-6R, sIL-11R, sCNTFR e a subunidade IL-12p40) (28). Essa ação agonista no caso de IL-15R, entretanto, não poderá ser antecipada enquanto todos os receptores solúveis até aqui descritos na família γc (sIL-2Rα, sIL-2Rβ, sIL-4R) e o próprio sIL-15Rα comportarem-se como antagonistas de citocinas (19, 29). Os resultados do presente pedido identificam, portanto, o domínio sushi solúvel de IL-15Rα como agonista inesperado e eficiente nesta família.

[0408] O conceito de trans sinalização de citocinas foi utilizado em primeiro lugar no caso de IL-6, em que se demonstrou que IL-6R solúvel aumenta a sensibilidade de células que reagem a IL-6 à ação de IL-6 e faz com que células que expressam gp130 mas não IL-6R de membrana reajam a IL-6 (30). Este conceito foi estendido a outros membros da família de citocinas gp130 (IL-11R,

CNTFR, CLC) (31-34). No caso de IL-15, foi exibido mecanismo de transapresentação de citocinas (12), em que IL-15 produzido por monócitos/células dendríticas é associado a IL-15Rα de membrana, expresso pelas mesmas células, e pode estimular a proliferação de células observadoras IL-15Rβ/γ$^+$ IL-15Rα$^-$. Relatórios recentes sugeriram que a transapresentação é mecanismo dominante *in vivo*, que necessita da expressão de IL-15 e IL-15Rα pelas mesmas células (13, 14, 35, 36). Ele possui alguma similaridade com o conceito de trans sinalização, pelo fato de que complexo de IL-15/IL-15Rα transpresentado pode sensibilizar células IL-15Rβ/γ$^+$ IL-15Rα$^-$ a concentrações fisiológicas de IL-15. Neste particular, IL-15Rα de membrana age como agonista da ação de IL-15 aumentando a sua avidez para o complexo de IL-15Rβ/γ e a eficiência de sinalização (12). Nossos dados demonstram que sIL-15Rα-sushi comporta-se de forma similar e sensibiliza células IL-15Rβ/γ$^+$ IL-15Rα$^-$ à ação de IL-15. Isso sugere que o domínio sushi de IL-15Rα de membrana é fundamental para transpresentação. Demonstramos que sIL-15Rα produzido por células que expressam IL-15Rα e que engloba a parte extracelular completa de IL-15Rα é inibidor da ação de IL-15 (19). Provavelmente constitui mecanismo de retroalimentação negativa que limita os efeitos biológicos de IL-15. Por outro lado, o sIL-15Rα-sushi descrito neste estudo exibe efeito agonista. Caso esse sushi solúvel seja gerado por células que expressam IL-15Rα, ele poderá participar do mecanismo de transapresentação de IL-15. A existência desses domínios sushi solúveis produzidos naturalmente ainda não foi descrita, mas é sustentada pelos fatos de que (i) diferentes isoformas de IL-15Rα de membrana foram descritas, incluindo algumas que não incluem a extremidade (codificada pelos exons 3 a 5) que liga o domínio sushi ao domínio de transmembrana (3, 25, 37) e (ii) foi demonstrada a geração de correspondentes solúveis para alguns deles por meio de divisão (19). Desta forma, sIL-15Rα e sIL-15Rα-sushi poderão

apresentar efeitos reguladores opostos e, como tal, ambos participam da sintonia da magnitude e duração da ação biológica de IL-15.

[0409] A presente invenção também demonstra que o uso de ligante flexível para produzir proteína de fusão tal como ILR ou RLI é abordagem válida no caso de IL-15. Foi gerado modelo molecular de IL-15 com o domínio sushi (Fig. 2) que ajudou a projetar ligante flexível que permite ligar o terminal C de IL-15 ao terminal N de sushi (proteína de fusão ILR) ou vice-versa (proteína de fusão RLI). O modelo também previu que o ligante não estava mascarando as áreas de IL-15 que se demonstrou estarem envolvidas na ligação às cadeias IL-15Rβ e γ. Conforme discutido acima, as duas proteínas de fusão resultaram ser muito mais ativas que IL-15 e a combinação de IL-15 mais sIL-15Rα-sushi na ativação do complexo de IL-15Rβ/γ sobre células Mo-7. Sobre células TF-1β e, no contexto de ativação do receptor de alta afinidade, a proteína de fusão ILR foi tão ativa quanto IL-15 e a proteína de fusão RLI foi até dez vezes mais ativa, com EC50 de até 1,2 pM na indução da proliferação celular. Devido à sua alta atividade, essas proteínas de fusão hiper-IL-15 aparentemente constituem ferramentas valiosas para a expansão de subconjuntos de linfócitos, especialmente aquelas (células T de memória CD8, NK) para as quais a transapresentação de IL-15 foi sugerida para que seja o processo de ativação fisiológica (13). Elas são, portanto, moléculas adjuvantes muito eficientes em estratégias terapêuticas destinadas à cura de pacientes com câncer, imunodeficiências ou doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M. *et al* (1994), *Science* 264, 965-968.

2. Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D. e Anderson, D.

(1994), *Embo J.* 13, 2822-2830.

3. Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. *et al* (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 29862-29869.

4. Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E. e Waldmann, T. A. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4935-4939.

5. Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K. e Caligiuri, M. A. (1994), *J. Exp. Med.* 180, 1395-1403.

6. Wilkinson, P. C. e Liew, F. Y. (1995), *J. Exp. Med.* 181, 1255-1259.

7. Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S. e Peschon, J. J. (2000), *J. Exp. Med.* 191, 771-780.

8. Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Boone, D. L., Chien, M. e Ma, A. (2001), *J. Exp. Med.* 194, 1187-1194.

9. Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A. e Tagaya, Y. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11445-11450.

10. Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. e Marrack, P. (2000), *Science* 288, 675-678.

11. Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R. e Strom, T. B. (2001), *Nat. Med.* 7, 114-118.

12. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A. e Tagaya, Y. (2002), *Immunity* 17, 537-547.

13. Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Ma,

A. e Boone, D. L. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4724-4729.

14. Schluns, K. S., Nowak, E. C., Cabrera-Hernandez, A., Puddington, L., Lefrançois, L. e Aguila, H. L. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5616-5621.

15. Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A. e Tagaya, Y. (2005), *Blood* 105, 721-727.

16. Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B. e Campbell, I. D. (1991), *J. Mol. Biol.* 219, 717-725.

17. Schulz, O., Sewell, H. F. e Shakib, F. (1998), *J. Exp. Med.* 187, 271-275.

18. Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C. e Lin, R. H. (2001), *Cancer Res.* 61, 237-242.

19. Mortier, E., Bernard, J., Plet, A. e Jacques, Y. (2004), *J. Immunol.* 173, 1681-1688.

20. Ruchatz, H., Leung, B. P., Wei, X. Q., McInnes, I. B. e Liew, F. Y. (1998), *J. Immunol.* 160, 5654-5660.

21. Smith, X. G., Bolton, E. M., Ruchatz, H., Wei, X., Liew, F. Y. e Bradley, J. A. (2000), *J. Immunol.* 165, 3444-3450.

22. Farner, N. L., Gan, J., de Jong, J. L., Leary, T. P., Fenske, T. S., Buckley, P., Dunlap, S. e Sondel, P. M. (1997), *Cytokine* 9, 316-327.

23. Bernard, J., Harb, C., Mortier, E., Quemener, A., Meloen, R. H., Vermot-Desorches, C., Wijdeness, J., van Dijken, P., Grotzinger, J., Sloostra, J. W., Plet, A. e Jacques, Y. (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 24313-24322.

24. Matsumoto, M., Misawa, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Hayashi, H. e Kobayashi, Y. (2003), *Protein Expr. Purif.* 31, 64-71.

25. Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A. e Jacques, Y. (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 26978-26984.

26. Giron-Michel, J., Giuliani, M., Fogli, M., Brouty-Boye, D., Ferrini, S., Baychelier, F., Eid, P., Lebousse Kerdiles, C., Durali, D., Biassoni, R., Charpentier, B., Vasquez, A., Chouaib, S., Caignard, A., Moretta, L. e Azzarone, B. (2005), *Blood*.

27. Meissner, U., Blum, H., Schnare, M., Rollinghoff, M. e Gessner, A. (2001), *Blood* 97, 183-191.

28. Jones, S. A. e Rose-John, S. (2002), *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 251-263.

29. Heaney, M. L. e Golde, D. W. (1998), *J. Leukoc. Biol.* 64, 135-146.

30. Rose-John, S. e Heinrich, P. C. (1994), *Biochem. J.* 300 (Pt 2), 281-290.

31. Pflanz, S., Tacken, I., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C. e Muller-Newen, G. (1999), *FEBS Lett.* 450, 117-122.

32. Davis, S., Aldrich, T. H., Ip, N. Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P. S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H. *et al* (1993), *Science* 259, 1736-1739.

33. Karow, J., Hudson, K. R., Hall, M. A., Vernallis, A. B., Taylor, J. A., Gossler, A. e Heath, J. K. (1996), *Biochem. J.* 318 (Pt. 2), 489-495.

34. Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F. e Gascan, H. (2000), *Nat. Neurosci.* 3, 867-872.

35. Sandau, M. M., Schluns, K. S., Lefrançois, L. e Jameson, S. C. (2004), *J. Immunol.* 173, 6537-6541.

36. Koka, R., Burkett, P. R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Lodolce, J. P., Boone, D. L. e Ma, A. (2003), *J. Exp. Med.* 197, 977-984.

37. Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Krause, H., Paus,

R. e Bulfone-Paus, S. (2003), *J. Immunol.* 170, 5045-5055.

38. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J. e Rose-John, S. (1997), *Nat. Biotechnol.* 15, 142-145.

TABELA 4

LISTA DE SEQ ID Nº

[0410] hIL-15R alfa = IL-15R alfa humano

[0411] hIL-2 = IL-2 humano

SEQ ID Nº	
1	**cDNA de IL-15R alfa (1610 bp)**
2	CDS de hIL-15R alfa (83..883 de SEQ ID Nº 1)
3	**proteína hIL-15R alfa (267 aa)**
4	CDS de **peptídeo de sinal hIL-15R alfa** (83..172 de SEQ ID Nº 1)
5	peptídeo de sinal hIL-15R alfa (1..30 de SEQ ID Nº 3)
6	CDS de mat_peptídeo de hIL-15R alfa (173..883 de SEQ ID Nº 1)
7	mat_peptídeo de hIL-15R alfa (31..267 de SEQ ID Nº 3)
8	Exon 1 de hIL-15R alfa (1..170 de SEQ ID Nº 1)
9	Exon 2 de hIL-15R alfa (171..365 de SEQ ID Nº 1)
10	Exon 3 de hIL-15R alfa (366..464 de SEQ ID Nº 1)
11	Exon 4 de hIL-15R alfa (465..665 de SEQ ID Nº 1)
12	Exon 5 de hIL-15R alfa (666..698 de SEQ ID Nº 1)
13	CDS de **domínio sushi de hIL-15R alfa**; de C1 a C4 (179..361 de SEQ ID Nº 1)
14	domínio sushi de hIL-15R alfa; de C1 a C4 (179..361 de SEQ ID Nº 1)
15	CDS de [**it** + domínio sushi de hIL-15R alfa] (173..361 de SEQ ID Nº 1)
16	[it + domínio sushi de hIL-15R alfa] (31..93 de SEQ ID Nº 3)
17	CDS + [**t** + domínio sushi de hIL-15R alfa] (176..361 de SEQ ID Nº 1)
18	[t + domínio sushi de hIL-15R alfa] (32..93 de SEQ ID Nº 3)
19	CDS de região de **articulação** de hIL-15R alfa (362..403 de SEQ ID

SEQ ID Nº	
	Nº 1)
20	região de articulação de hIL15-R alfa (94..107 de SEQ ID Nº 3; irdpalvhqrpapp)
21	CDS de [domínio sushi de hIL-15R alfa + **j**] (179..364 de SEQ ID Nº 1)
22	[domínio sushi de hIL-15R alfa + i] (33..94 de SEQ ID Nº 3)
23	CDS de [**it** + domínio sushi de hIL-15R alfa + **i**] (173..364 de SEQ ID Nº 1)
24	[it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i] (31..94 de SEQ ID Nº 3)
25	CDS de [**t** + domínio sushi de hIL-15R alfa + **i**] (176..364 de SEQ ID Nº 1)
26	[t + domínio sushi de hIL-15R alfa + i] (32..94 de SEQ ID Nº 3)
27	CDS de [**it** + domínio sushi de hIL-15R alfa + **i** + **rd**] (173..370 de SEQ ID Nº 1)
28	[it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i + rd] (31..96 de SEQ ID Nº 3)
29	CDS de [**it** + domínio sushi de hIL-15R alfa **+ i + rd + 11 aa codificados por exon 3** (173..403 de SEQ ID Nº 1)
30	[it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i + rd + 11 aa codificados por exon 3] (31..107 de SEQ ID Nº 3)
31	CDS de **região rica em sítios de glicosilação** de hIL-15R alfa (404..709 de SEQ ID Nº 1)
32	Região rica em sítios de glicosilação de hIL-15R alfa (108..209 de SEQ ID Nº 3)
33	codificação de sequências para a **parte codificada por exon 3** da **região rica em sítios de glicosilação** de IL-15R alfa humano (404..464 de SEQ ID Nº 1)
34	Parte codificada por exon 3 da região rica em sítios de glicosilação de IL-15R alfa humano (108..127 de SEQ ID Nº 3)
35	CDS de [**it** + domínio sushi de hIL-15R alfa **+ i + todos os aa codificados por exon 3**] (173..464 de SEQ ID Nº 1)
36	[it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i + todos os aa codificados por exon 3] (31..127 de SEQ ID Nº 3)
37	CDS de fragmento de hIL-15R alfa extracelular (83..967 de SEQ ID Nº 1)
38	Fragmento de hIL-15R alfa extracelular solúvel (1..205 de SEQ ID Nº 3)
39	CDS de **hIL-15R alfa extracelular solúvel** (83..709 de SEQ ID Nº 1)
40	hIL15-R alfa extracelular solúvel (1..209 de SEQ ID Nº 3)

SEQ ID Nº	
41	CDS de fragmento de hIL-15R alfa extracelular com peptídeo de sinal excluído solúvel (173..697 de SEQ ID Nº 1)
42	Fragmento de hIL-15R alfa extracelular com peptídeo de sinal solúvel (31..205 de SEQ ID Nº 3)
43	CDS de hIL-15R alfa extracelular com peptídeo de sinal excluído solúvel (173..709 de SEQ ID Nº 1)
44	hIL-15R alfa extracelular com peptídeo de sinal excluído solúvel (31..209 de SEQ ID Nº 3)
45	cDNA de hIL-15 (1496 bp)
46	Proteína precursora de hIL-15 (162 aa)
47	CDS de hIL-15 do tipo selvagem maduro (517..858 de SEQ ID Nº 45)
48	**hIL-15 do tipo selvagem** maduro (49..162 de SEQ ID Nº 46)
49	Sequência de ácidos nucléicos do ligante 20
50	Sequência de aminoácidos do ligante 20
51	Sequência de ácidos nucléicos do ligante 26
52	Sequência de aminoácidos do ligante 26
53	Sequência de ácidos nucléicos de marcador Flag e sítio de ligação de Xa
54	Sequência de aminoácidos de marcador Flag e sítio de ligação de Xa
55	Sequência de ácidos nucléicos de marcador Flag e sítio de ligação Xa
56	Sequência de aminoácidos de marcador Flag e sítio de ligação Xa
57	CDS de peptídeo de sinal de preprolactina bovina
58	Peptídeo de sinal de preprolactina bovina
59	**Sequência de ácidos nucléicos de proteína de fusão RLI**
60	**Proteína de fusão RLI**
61	**Sequência de ácidos nucléicos de proteína de fusão ILR**
62	**Proteína de fusão ILR**
63	cDNA de hIL-2 (1047 bp)
64	CDS de hIL-2 maduro (355..753 de SEQ ID Nº 63)
65	hIL-2 maduro (133 aa)

SEQ ID Nº	
66	Sequência de ácidos nucléicos de fragmento de hIL-15R alfa que contém sushi, marcada com IL-2 (peptídeo de sinal de hIL-15R alfa + it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i + rd + ligante lq + hIL-2)
67	Fragmento de hIL-15R alfa que contém sushi, marcado com IL-2 (peptídeo de sinal de hIL-15R alfa + it + domínio sushi de hIL-15R alfa + i + rd + ligante lq + hIL-2)
68	Sequência de ácidos nucléicos de fragmento de hIL-15R alfa extracelular, marcada com IL-2 (peptídeo de sinal de hIL-15R alfa + fragmento de região extracelular de hIL-15R alfa + ligante lq + hIL-2)
69	Fragmento de hIL-15R alfa extracelular, marcado com IL-2 (peptídeo de sinal de hIL-15R alfa + fragmento de região extracelular de hIL-15R alfa + ligante lq + hIL-2)
70	Primer senso de cadeia beta (GAGAGACTGGATGGACCC)
71	Primer reverso de cadeia beta (AAGAAACTAACTCTTAAAGAGGC)
72	cDNA de IL-15R alfa de camundongo (*Mus musculus*) (792 bp)
73	Proteína IL-15R alfa de camundongo (263 aa)
74	Região extracelular de IL-15R alfa de camundongo (1..205 de SEQ ID Nº 73)
75	Domínio sushi de IL-15R alfa de camundongo (36..96 de SEQ ID Nº 73)
76	Região de articulação de IL-15R alfa de camundongo (97..109 de SEQ ID Nº 73)
77	Região de extremidade de IL-15R alfa de camundongo (110..205 de SEQ ID Nº 73)
78	cDNA de IL-15R alfa de chimpanzé (*Pan troglodytes*) (1035 bp)
79	Proteína IL-15R alfa de chimpanzé (344 aa)
80	Região extracelular de IL-15R alfa de chimpanzé (1..286 de SEQ ID Nº 79)
81	Domínio sushi de IL-15R alfa de chimpanzé (13..73 de SEQ ID Nº 79)
82	Região de articulação de IL-15R alfa de chimpanzé (74..88 de SEQ ID Nº 79)
83	Região de extremidade de IL-15R alfa de chimpanzé (89..286 de SEQ ID Nº 79)
84	cDNA de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (765 bp)
85	Proteína IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (254 aa)
86	Região extracelular de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (1..182 de SEQ ID Nº 85)
87	Domínio sushi de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (24..84 de SEQ ID Nº 85)
88	Região de articulação de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (85..96 de SEQ ID Nº 85)

SEQ ID Nº	
89	Região de extremidade de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* (97..182 de SEQ ID Nº 85)
90	Exon 3 de IL-15R alfa de *Mus musculus*
91	Exon 3 de IL-15R alfa de *Pan troglodytes*
92	Exon 3 de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*
93	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa humano
94	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Mus musculus*
95	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Pan troglodytes*
96	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*
97	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Mus musculus*
98	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Pan troglodytes*
99	Parte codificada por exon 3 de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus*
100	Primer senso para cadeia gama (5’ GAAGAGCAAG CGCCATGTTG 3’)
101	Primer antisenso para cadeia gama (5’ TCAGGTTTCAGGCTTTAGGG 3’)

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO DESTINADO A ESTIMULAR A VIA DE SINALIZAÇÃO DE IL-15R BETA/GAMA, de forma a induzir e/ou estimular a ativação e/ou proliferação de células IL-15R beta/gama-positivas, tais como células T e/ou NK, caracterizado por compreender pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama, ligada direta ou indiretamente por meio de covalência a pelo menos um polipeptídeo que contém o domínio sushi da região extracelular de IL-15R alfa, sendo que:

- a mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama é IL-15 humano, em que a sequência de aminoácidos do mencionado IL-15 humano é a sequência de SEQ ID Nº 48; e

- a sequência de aminoácidos do mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi compreende a sequência do domínio sushi de IL-15R alfa humano e a região de articulação do mencionado IL-15R alfa, em que o mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi é o polipeptídeo de SEQ ID Nº 30.

2. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender peptídeo de sinal, ligado direta ou indiretamente ao mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi.

3. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pela mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama não se ligar a IL-2R alfa.

4. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo mencionado pelo menos um polipeptídeo que contém sushi ser ligado à mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama por meio de ligante peptídico que compreende pelo menos um, mas menos de trinta aminoácidos.

5. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 4,

caracterizado pela sequência de aminoácidos do mencionado ligante peptídico ser a sequência de SEQ ID Nº 50 ou Nº 52.

6. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo mencionado polipeptídeo que contém sushi encontrar-se na posição N-terminal relativa à mencionada pelo menos uma entidade de ligação de IL-15R beta/gama.

7. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pela sua sequência de aminoácidos ser a sequência de SEQ ID Nº 60.

8. ADJUVANTE PARA COMPOSIÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA, caracterizado por compreender um composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender um composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. FÁRMACO, caracterizado por compreender um composto, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 7.

11. FÁRMACO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por compreender adicionalmente pelo menos um antígeno de tumor.

168

Fig. 1A

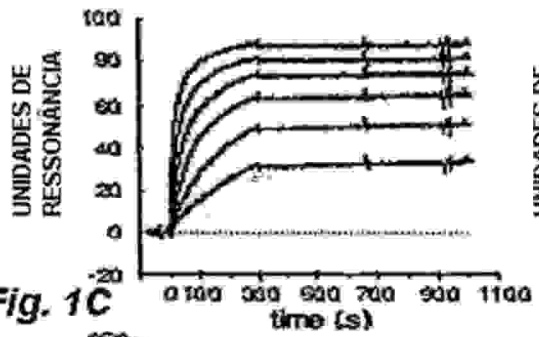


Fig. 1B

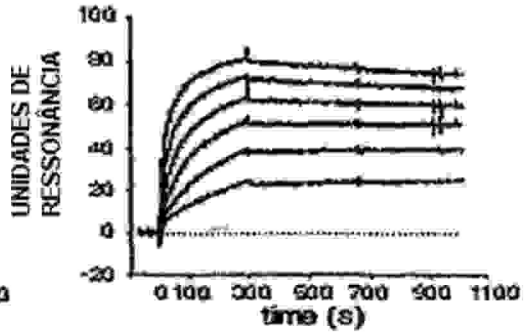


Fig. 1C

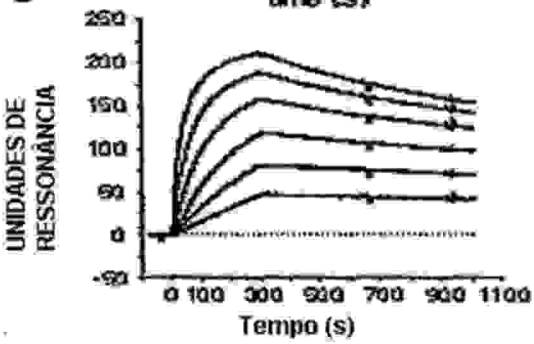


Fig. 1D

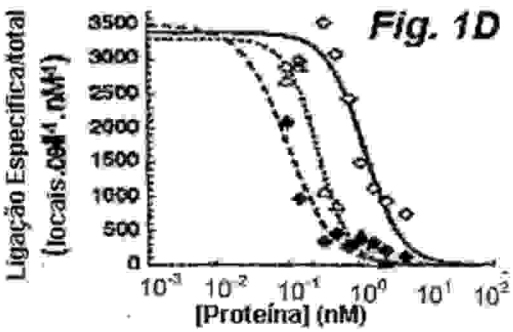
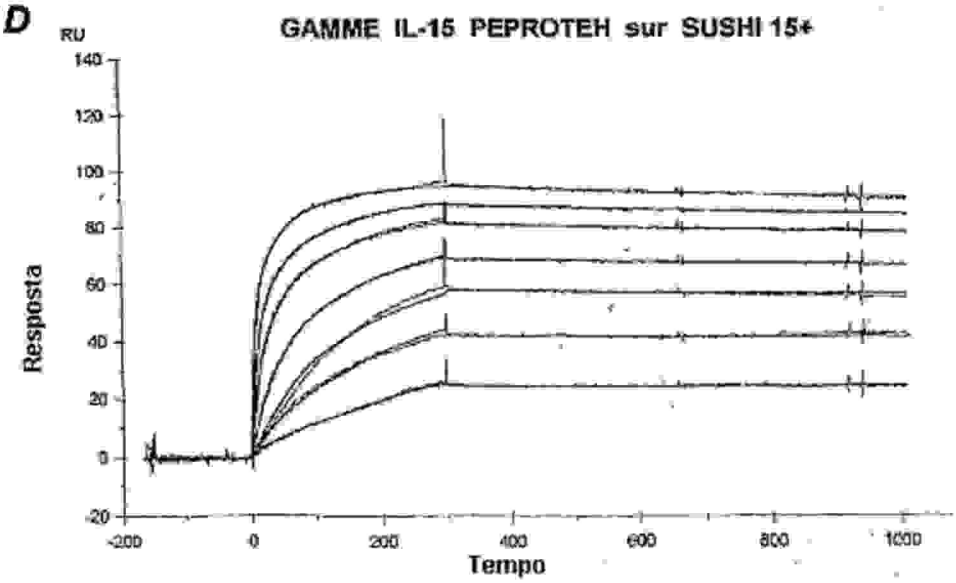


Fig. 1D



169

Fig. 2A

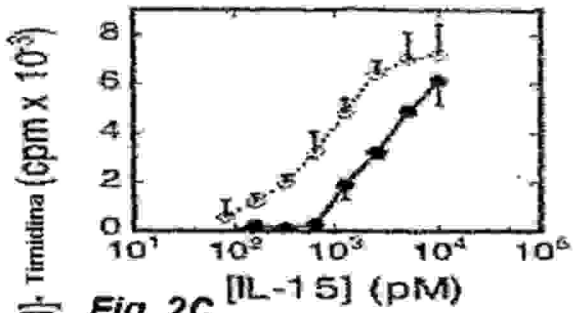


Fig. 2B

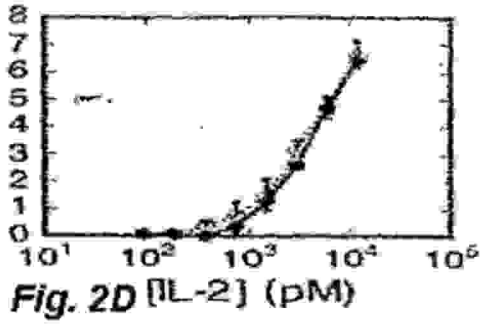


Fig. 2C

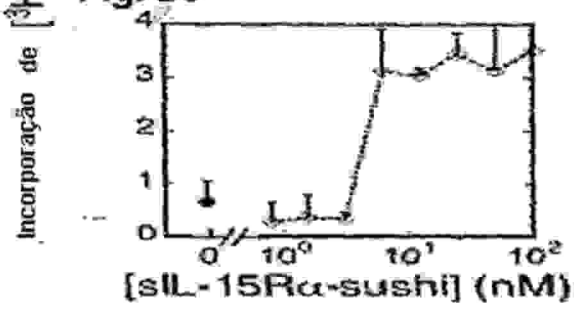


Fig. 2D

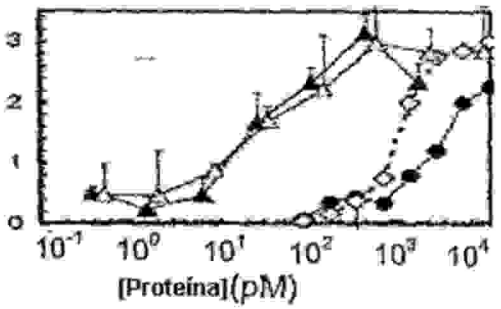


Fig. 2E

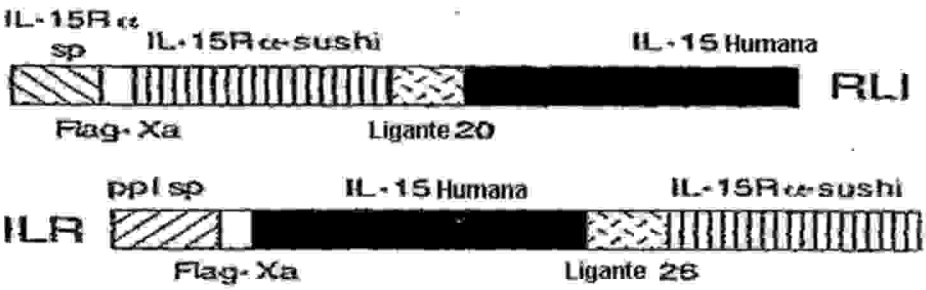


Fig. 2F

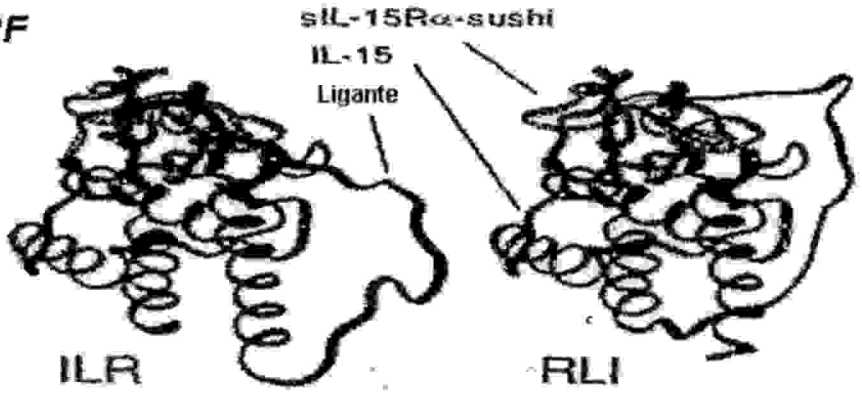


Fig. 3A

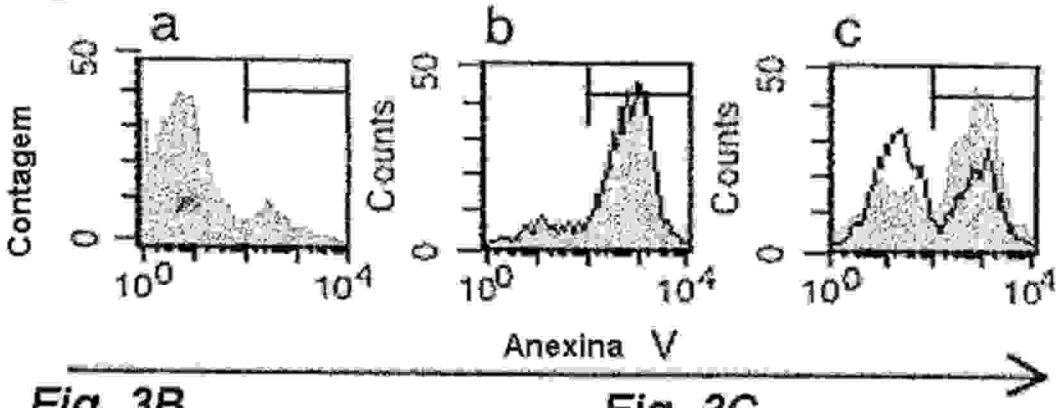


Fig. 3B

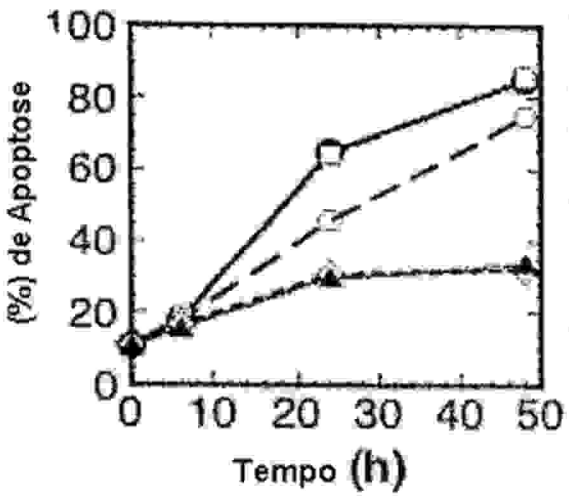


Fig. 3C

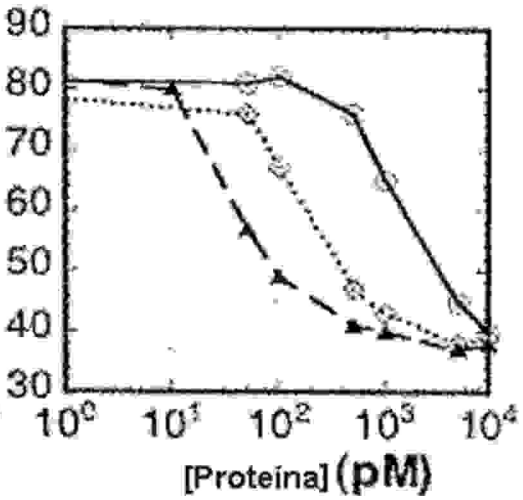


Fig. 4A

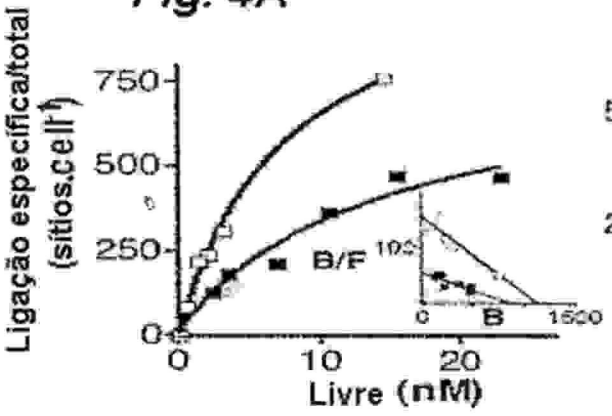


Fig. 4B

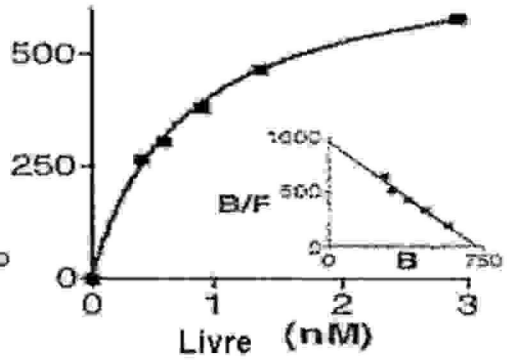


Fig. 4C

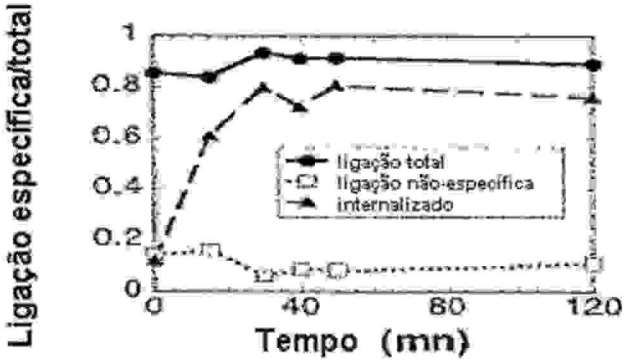


Fig. 5A

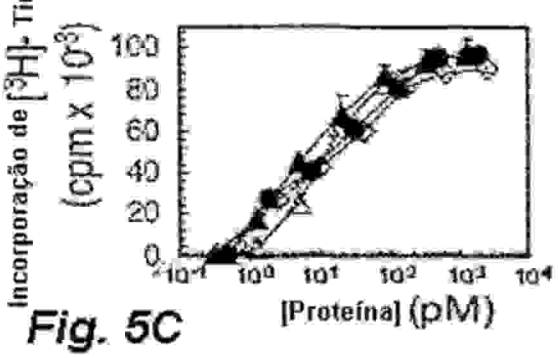


Fig. 5B

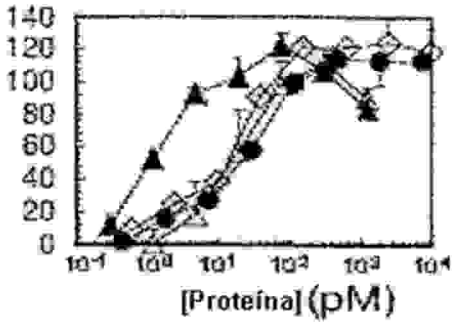


Fig. 5C

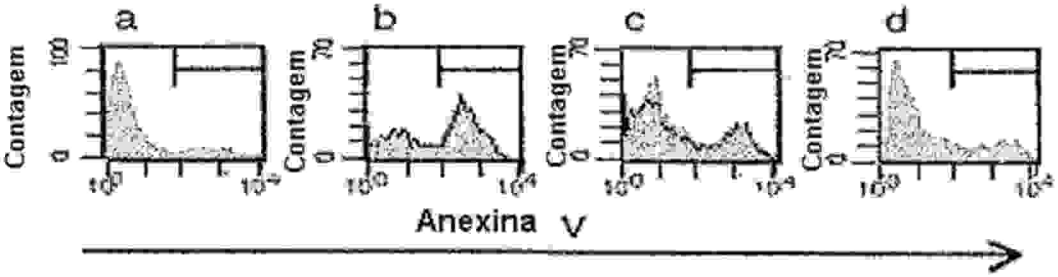


Fig. 5D

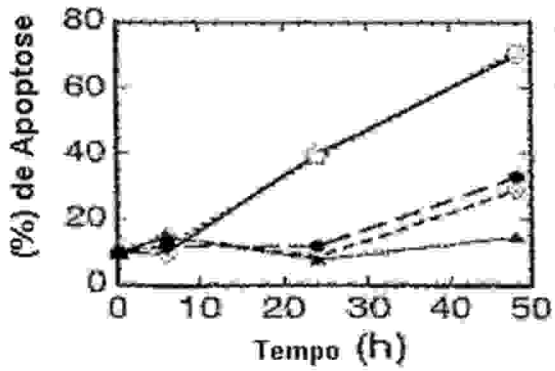


Fig. 5E

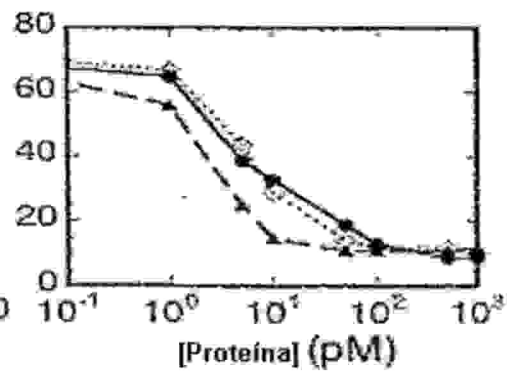


Fig. 6A

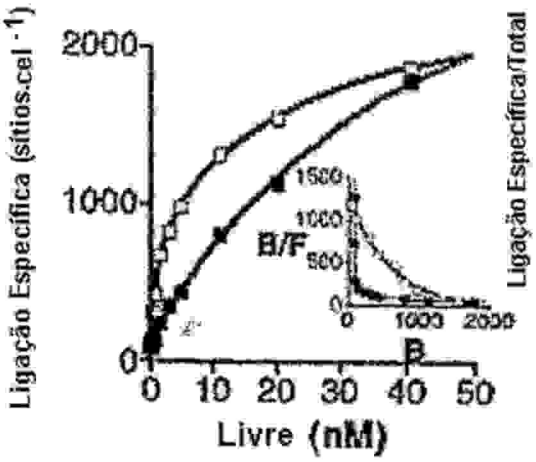


Fig. 6B

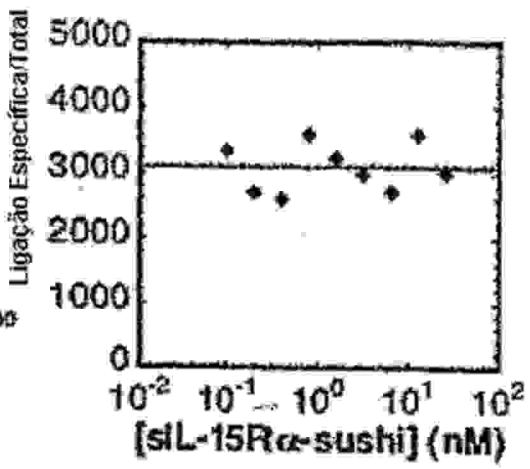


Fig. 6C

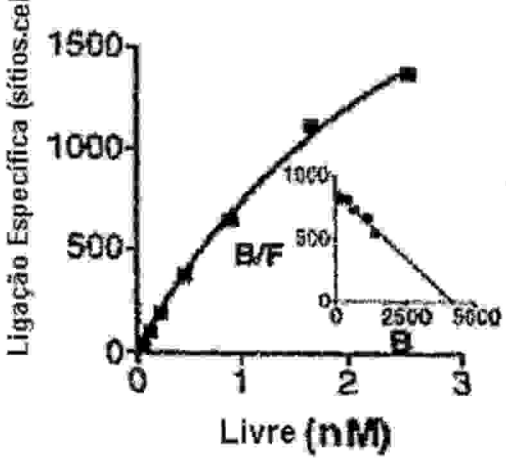


Fig. 6D

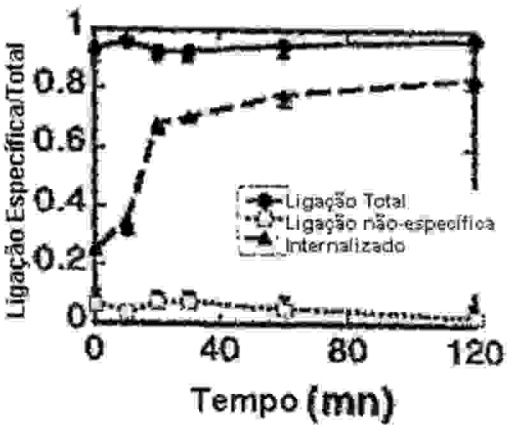


Fig. 6E

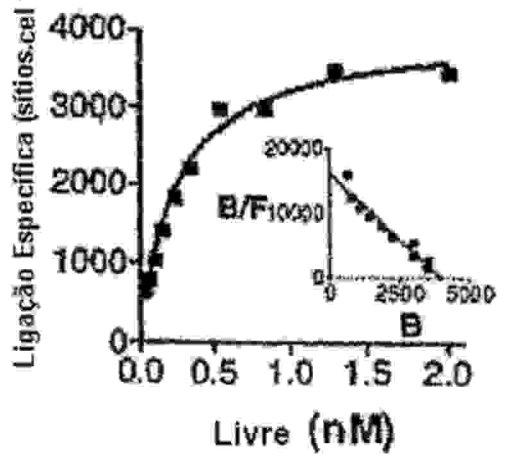


Fig. 6F

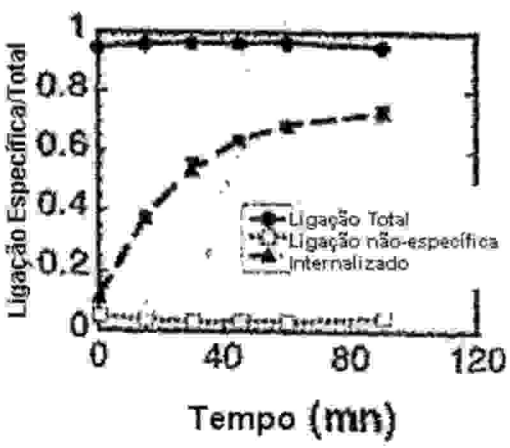


Fig. 7A

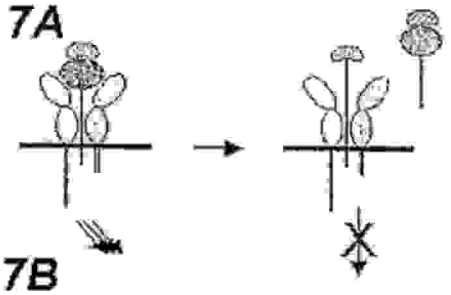


Fig. 7B

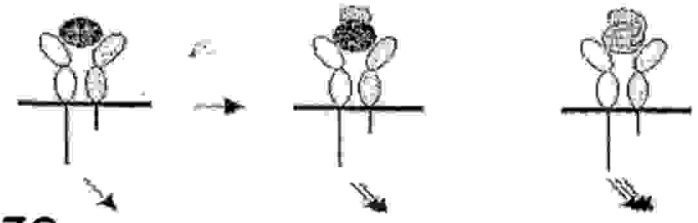
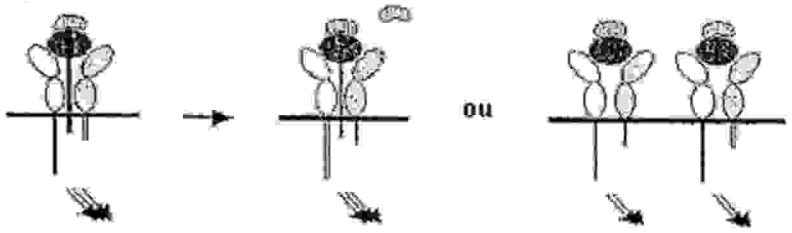
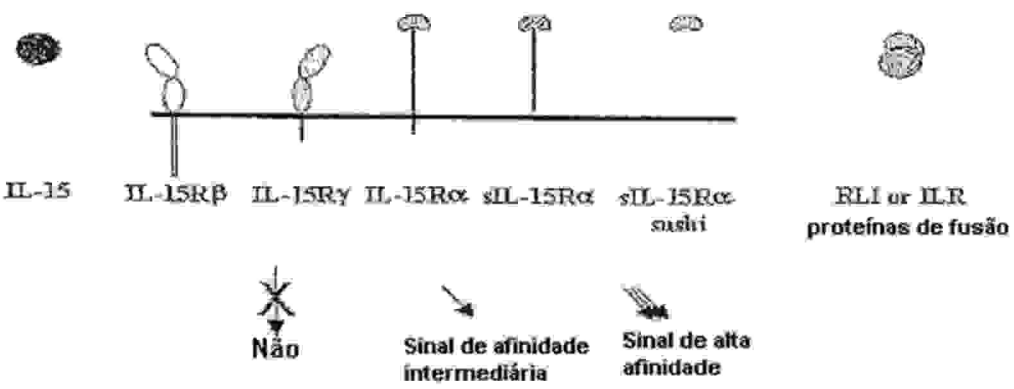


Fig. 7C





RNAm do precursor da cadeia alfa do receptor de interleucina-15 humano (IL15R alfa)

cds completo (1610 bp)
Número de Acesso U31628 (Versão U31628.1 GI:1125055)

```
   1 cccagagcag cgctcgccac ctccccccgg cctgggcagc gctcgcccgg ggagtccagc
  61 ggtgtcctgt ggagctgccg ccatggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
 121 tctccccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gcatcacgtg
 181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
 241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
 301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
 361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
 421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctctgga aaagagcccg cagcttcatc
 481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
 541 gccttcaaaa tcacctttcc caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
 601 cacccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
 661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt
 721 cctgctgtgt gggctgagcg ctgtgtctct cctggcatgc tacctcaagt caaggcaaac
 781 tccccccgctg gccagcgttg aaatggaagc catggaggct ctgccggtga cttgggggac
 841 cagcagcaga gatgaagact tggaaaactg ctctcaccac ctatgaaact cggggaaacc
 901 agcccagcta agtccggagt gaaggagcct ctctgctttа gctaaagacg actgagaaga
 961 ggtgcaagga agcgggctcc aggagcaagc tcaccaggcc tctcagaagt cccagcagga
1021 tctcacggac tgccgggtcg gcgcctcctg cgcgagggag caggttctcc gcattcccat
1081 gggcaccacc tgcctgcctg tcgtgccttg gacccagggc ccagcttccc aggagagacc
1141 aaaggcttct gagcaggatt tttatttcat tacagtgtga gctgcctgga atacatgtgg
1201 taatgaaata aaaaccctgc cccgaatctt ccgtcctca tcctaacttg cagttcacag
1261 agaaaagtga catacccaaa gctctctgtc aattacaagg cttctcctgg cgtgggagac
1321 gtctacaggg aagacaccag cgtttgggct tctaaccacc ctgtctccag ctgctctgca
1381 cacatggaca gggacctggg aaaggtggga gagatgctga gcccagcgaa tcctctccat
1441 tgaaggattc aggaagaaga aaactcaact cagtgccatt ttacgaatat atgcgtttat
1501 atttatactt ccttgtctat tatatctata cattatatat tatttgtatt ttgacattgt
1561 accttgtata aacaaaataa aacatctatt ttcaatattt ttaaaatgca
```

SEQ ID NO:1

Fig. 8

83..883 da IL15-R alfa SEQ ID NO:1 = CDS =

```
 83                          atggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
121 tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gcatcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttggga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcacctttcc caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 caccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct ccccaccagc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt
721 cctgctgtgt gggctgagcg ctgtgtctct cctggcatgc tacctcaagt caaggcaaac
781 tccccccgctg gccagcgttg aaatggaagc catggaggct ctgccggtga cttgggggac
841 cagcagcaga gatgaagact tggaaaactg ctctcaccac cta                SEQ ID NO:2
```

Cadeia alfa do receptor de interleucina-15 humana (267 aa)

NÚMERO DE ACESSO AAC50312 (VERSÃO AAC50312.1 GI:1125056)

```
  1 maprrargcr tlqlpalll lllrppatrg itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdttvaist stvllcglsa vsllacylks rqtpplasve
241 meamealpvt wgtssrdedl encshhl                          SEQ ID NO:3
```

Fig. 9

83..172 da IL-15Ralfa SEQ ID NO:1 = CDS do sig_peptídeo

```
 83                                atggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
121 tctccccgcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gc
```

SEQ ID NO:4

1..30 da proteína da IL15-Ralfa SEQ ID NO:3 = sig_peptídeo

```
  1 maprrargcr tlglpallll lllrppatrg
```

SEQ ID NO:5

173..883 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = CDS do mat_peptídeo

```
173                                                             atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggcactcaca gcatccgcct cccaccagcc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt
721 cctgctgtgt gggctgagcg ctgtgtctct cctggcatgc tacctcaagt caaggcaaac
781 tccccccgctg gccagcgttg aaatggaagc catggaggct ctgccggtga cttgggggac
841 cagcagcaga gatgaagact tggaaaactg ctctcaccac cta
```

SEQ ID NO:6

31..267 da proteína IL15-Ralfa SEQ ID NO:3 = mat_peptídeo

```
 31                                itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdttvaist stvllcglsa vsllacylks rqtpplasve
241 meamealpvt wgtssrdedl encshhl
```

SEQ ID NO:7

Fig. 10

1..170 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = éxon 1 da IL15-Ralfa humana =

```
  1 cccagagcag cgctcgccac ctcccccggg cctgggcagc gctcgcccgg ggaccctcgg
 61 ggtgtcctgt ggagctgccg ccatggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
121 tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg
```

SEQ ID NO:8

171..365 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = éxon 2 da IL15-Ralfa humana =

```
171                                                        gcatcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 catta
```

SEQ ID NO :9

366..464 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = éxon 3 da IL15-Ralfa humana

```
366     gagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgga aaag
```

SEQ ID NO :10

465..665 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = éxon 4 da IL15-Ralfa humana =

```
465                                                    agcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
661 gccag
```

SEQ ID NO:11

666..698 da IL15-Ralfa SEQ ID NO:1 = éxon 5 da IL15-Ralfa humana =

```
666     gtgtg tatccacagg gccacagcga caccactg
```

SEQ ID NO:12

Fig. 11

179..361 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para o domínio sushi da IL-15Ralfa humana =

```
179                                                                  tg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 c                                                    SEQ ID NO :13
```

33..93 da proteína da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
domínio sushi da IL-15Ralfa humana =

```
33                          cpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkc                  SEQ ID NO:14
```

173..361 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificada para (it + o domínio sushi da IL-15Ralfa humana) =

```
173                                                          atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 c                                                    SEQ ID NO:15
```

31..93 da proteína da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana =

```
31                          itcpppmsve hadiwvkays lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkc                  SEQ ID NO:16
```

Fig. 12

176..361 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (t + domínio sushi da IL-15Ralfa humana =

```
176                                                              acgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaacccccа gtctcaaatg
361 c
```

SEQ ID NO: 17

32..93 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
t + domínio sushi da IL-15Ralfa humana =

```
32                          tcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkc
```

SEQ ID NO: 18

Fig. 13

362..403 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para região de articulação da IL-15Ralfa humana =

362 attagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccc SEQ ID NO: 19

94..107 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
região da articulação da IL-15Ralfa humana =

94 irdpalvhqrp app SEQ ID NO: 20

362..370 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para um fragmento da região de articulação da IL-15Ralfa humana =

362 attagagac

94..96 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
fragmento da região de articulação da IL-15Ralfa humana =

94 ird

362..364 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para um fragmento da região de articulação da IL-15Ralfa humana =

362 att

94..94 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
fragmento da região de articulação da IL-15Ralfa humana =

94 i

Fig. 14

179..364 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (o domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i) =

```
179                                                                  tg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
364 catt                                                  SEQ ID NO: 21
```

33..94 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i=

```
33                          cpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkci                 SEQ ID NO: 22
```

173..364 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (o domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i) =

```
173                                                               atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 catt                                                  SEQ ID NO: 23
```

31..94 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i =

```
31                          itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkci                 SEQ ID NO: 24
```

Fig. 15

176..364 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (t + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i) =

```
176                                                          acgtg
181 ccctccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaacccccа gtctcaaatg
361 catt                                                  SEQ ID NO: 25
```

32..94 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
t + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i =

```
 33                          tcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkci                SEQ ID NO: 26
```

173..370 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + ird) =

```
173                                                        atcacgtg
181 ccctccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaacccccа gtctcaaatg
361 cattagagac                                           SEQ ID NO :27
```

31..96 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =
it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + ird =

```
 31                          itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcird               SEQ ID NO:28
```

Fig. 16

173..403 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =

sequência codificadora para (it + domínio sushi da IL-15Ralfa + região de articulação) =

```
173                                                          atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattgagacc cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccc
```

SEQ ID NO :29

31..107 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO :3 =

it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + região de articulação =

```
31                              itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv  hqrpapp
```

SEQ ID NO:30

Fig. 17

região rica em sítios de glicosilação da IL-15Ralfa humana

sequência de ácido nucléico =
404..709 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =

```
 404                                                        tccacag taacgacggc
 421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc cccttctgga aaagagcccg cagcttcatc
 481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
 541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
 601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
 661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcc
```

SEQ ID NO: 31

sequência de aminoácidos =
108..209 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:3 =

```
 108                                                          stv ttagvtpqpe
 121 alspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
 181 knweltasas hqppgvypqg hsdttvais
```

SEQ ID NO: 32

Fig. 18

404..464 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência da parte codificada por éxon3 da região rica em sítios de glicosilação da IL-15Ralfa humana =

```
404                                                    tccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgga aaa g
```

SEQ ID NO: 33

108..127 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO :3 =
éxon3 da região rica em sítios de glicosilação da IL-15Ralfa humana =

```
108                                                        stv ttagvtpqpe
121 slspsgk
```

SEQ ID NO: 34

173..464 da IL-15Ralfa humana SEQ ID NO:1 =
sequência codificadora para (it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i + todos os aminoácidos codificados pelo éxon3) =

```
173                                                            atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggaqtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaacccccа gtctcaaatg
361 cattgagacc cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgga aaag
```

SEQ ID NO :35

31..127 da proteína IL-15Ralfa humana SEQ ID NO :3 =
it + domínio sushi da IL-15Ralfa humana + i + todos os aminoácidos codificados pelo éxon3

```
 31                                    itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkaqts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv  hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgk
```

SEQ ID NO:36

Fig. 19

83..697 da IL-15R alfa humana =
Seqüência codificadora para um fragmento de domínio extracelular solúvel de IL-15 Ralfa =

```
 83                         atggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
121 tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gcatcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc cccttctgga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccact
```

SEQ ID NO:37

1..205 da IL-15R alfa humana =
Fragmento de domínio extracelular solúvel de IL-15 Ralfa humana =

```
  1 maprrargcr tlglpallll lllrppatrg itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdtt
```

SEQ ID NO:38

Fig. 20

83 . . 709 da IL-15Ralfa humana =
Seqüência codificadora para um domínio extracelular solúvel de IL-15Ralfa =

```
 83                                atggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
121 tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgagcgcgg gcatcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct ccccaccagcc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcc
```

SEQ ID NO: 39

1 . . 209 da IL-15Ralfa humana =
Um domínio extracelular solúvel de IL-15Ralfa =

```
  1 maprrargcr tlglpallll lllrppatrg itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdttvais
```

SEQ ID NO: 40

Fig. 21

173 . . 697 da IL-15Ralfa humana =
Seqüência codificadora de fragmento de domínio extracelular de IL-15Ralfa humano solúvel com peptídeo de sinal excluído

```
173                                                         atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctqcacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc cccttctgga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtcccgggct cccàgctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca ncatccgcct cccaccagcc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccact
```

SEQ ID NO:41

31 . . 205 da IL-15R alfa humana =
fragmento de domínio extracelular de IL-15Ralfa humano solúvel com peptídeo de sinal excluído

```
 31                                          itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdtt
```

SEQ ID NO:42

Fig. 22

173 . . 709 da IL-15Ralfa humana =
Seqüência codificadora de domínio extracelular de IL-15Ralfa humano solúvel com peptídeo de sinal excluído =

```
173                                                          atcacgtg
181 ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
241 cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
301 ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
361 cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
421 aggggtgacc ccacagccag agagcctctc cccttctgga aaagagcccg cagcttcatc
481 tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtccccgggct cccagctgat
541 gccttcaaaa tcaccttcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg
601 cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
661 gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcc
```

SEQ ID NO:43

31 . . 209 da IL-15Ralfa humana =
Um domínio extracelular de IL-15Ralfa humano solúvel com peptídeo de sinal excluído =

```
 31                                                itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
 61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkcirdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgkepa asspssnnta attaaivpgs qlmpskspst gtteisshes shgtpsqtta
181 knweltasas hqppgvypqg hsdttvais
```

SEQ ID NO:44

Fig. 23

Interleucina 15 de *Homo Sapiens (IL15)*, transcrição de variante 3, RNAm (1496 bp)

NÚMERO DE ACESSO NM_000585 (VERSÃO NM_000585.2 GI:26787979) =

```
   1 gactccgggt ggcaggcgcc cgggggaatc ccagctgact cgctcactgc cttcgaagtc
  61 cggcgccccc cgggagggaa ctgggtggcc gcaccctccc ggctgcggtg gctgtcgccc
 121 cccaccctgc agccaggact cgatggagaa tccattccaa tatatggcca tgtggctctt
 181 tggagcaatg ttccatcatg ttccatgctg ctgctgacgt cacatggagc acagaaatca
 241 atgttagcag atagccagcc catacaagat cgtattgtat tgtaggaggc atcgtggatg
 301 gatggctgct ggaaacccct tgccatagcc agctcttctt caatacttaa ggatttaccg
 361 tggctttgag taatgagaat ttcgaaacca catttgagaa gtatttccat ccagtgctac
 421 ttgtgtttac ttctaaacag tcattttcta actgaagctg gcattcatgt cttcattttg
 481 ggctgtttca gtgcagggct tcctaaaaca gaagccaact gggtgaatgt aataagtgat
 541 ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct atgcatattg atgctacttt atatacggaa
 601 agtgatgttc accccagttg caaagtaaca gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa
 661 gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc
 721 ctagcaaaca acagtttgtc ttctaatggg aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt
 781 gaggaactgg aggaaaaaaa tattaaagaa tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa
 841 atgttcatca acacttcttg attgcaattg attcttttta aagtgtttct gttattaaca
 901 aacatcactc tgctgcttag acataacaaa acactcggca tttcaaatgt gctgtcaaaa
 961 caagtttttc tgtcaagaag atgatcagac cttggatcag atgaactctt agaaatgaag
1021 gcagaaaaat gtcattgagt aatatagtga ctatgaactt ctctcagact tactttactc
1081 atttttttaa tttattattg aaattgtaca tatttgtgga ataatgtaaa atgttgaata
1141 aaaatatgta caagtgttgt tttttaagtt gcactgatat tttacctctt attgcaaaat
1201 agcatttgtt taagggtgat agtcaaatta tgtattggtg gggctgggta ccaatgctgc
1261 aggtcaacag ctatgctggt aggctcctgc cagtgtggaa ccactgacta ctggctctca
1321 ttgacttcct tactaagcat agcaaacaga ggaagaattt gttatcagta agaaaaagaa
1381 gaactatatg tgaatcctct tctttatact gtaatttagt tattgatgta taaagcaact
1441 gttatgaaat aaagaaattg caataactgg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

SEQ ID NO: 45

Fig. 24

Isoforma 1 precursora 15 da interleucina 15 *[Homo Sapiens]* (162 aa) =

ACESSO NP_000576 (VERSÃO NP_000576.1 GI:10835153) =

[CDS 373..858 of SEQ ID NO :45] =

```
  1 mriskphlrs isiqcylcll lnshflteag ihvfilgcfs aglpkteanw vnvisdlkki
 61 edliqsmhid atlytesdvh pskvtamkc fllelqvisl esgdasihdt venliilann
121 slssngnvte sgckeceele eknikeflqs fvhivqmfin ts
```

SEQ ID NO: 46

Seqüência codificadora para IL-15 humana madura do tipo selvagem =

517..858 de SEQ ID NO:45 =

```
517                                          aact gggtgaatgt aataagtgat
541 ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct atgcatattg atgctacttt atatacggaa
601 agtgatgttc accccagttg caaagtaaca gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa
661 gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc
721 ctagcaaaca acagtttgtc ttctaatggg aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt
781 gaggaactgg aggaaaaaaa tattaaagaa tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa
841 atgttcatca acacttct
```

SEQ ID NO: 47

IL-15 humana madura do tipo selvagem =

49..162 de SEQ ID NO:46 =

```
 49                                                  nw vnvisdlkki
 61 edliqsmhid atlytesdvh pskvtamkc fllelqvisl esgdasihdt venliilann
121 slssngnvte sgckeceele eknikeflqs fvhivqmfin ts
```

SEQ ID NO: 48

Fig. 25

LIGANTE 20

Seqüência de ácido nucléico =

agcggcggctcaggggggtggaggatctggtggtggaagtggaggtggcgggtctctgcag

SEQ ID NO: 49

Seqüência de aminoácidos =

sggsggggsggggsggggslq

SEQ ID NO: 50

LIGANTE 26

Seqüência de ácido nucléico =

tctggtggcggatcaggggggtggcggatctggcgggggtggaagtggaggtggcgggtctggcggaggttcactgcag

SEQ ID NO: 51

Seqüência de aminoácidos =

sgggsggggsggggsggggsgggslq

SEQ ID NO: 52

Fig. 26

Sítio de marca Flag e local de união Xa :

Seqüência de ácido nucléico
gactacaaggatgacgatgacaagatagaaggtagg SEQ ID NO: 53

Seqüência de aminoácidos
dykddddkiegr SEQ ID NO: 54

Sítio de marca Flag e local de união Xa :

Seqüência de ácido nucléico
accacgcgtgactacaaggatgacgatgacaagatagaaggtagg SEQ ID NO:55

Seqüência de aminoácidos
ttrdykddddkiegr SEQ ID NO:56

Peptídeo de sinal de preprolactina bovina:

Seqüência de ácido nucléico
atggacagca aaggttcgtc gcagaaagca gggtcccgcc tgctcctgct gctggtggtg tcaaatctac
tcttgtgcca gggtgtggtc tcc SEQ ID NO:57

Seqüência de aminoácidos
mdskgssqkagsrllllvvsnlllcggvvs SEQ ID NO:58

Seqüência Kozak

Seqüência Kozak da IL-15R :
gcc gcc

Seqüência Kozak da prepolactina :
gcc acc

Fig. 27

Proteínas de fusão [domínio de IL-15Ralfa + IL15]:

Proteína de fusão RLI:
= peptídeo de sinal de IL-15R alfa + marca Flag e local de união de Xa + it + sushi + i + rd + onze aminoácidos codificados pelo éxon3 + ligante 20 + IL-15 humana madura do tipo selvagem

Seqüência de ácidos nucléicos:

= Seqüência Kozak + SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 52 + SEQ ID NO: 29 + SEQ ID NO: 49 + SEQ ID NO: 47 + STOP codon =

gccgccatggccccgcggcgggcgcgcggctgccggaccctcggtctcccggcgctgctactgctgctgctgctccggccgccggc
gacgcggggcgactacaaggatgacgatgacaagatagaaggtaggatcacatgccctcccccccatgtccgtggaacacgcagaca
tctgggtcaagagctacagcttgtactccagggagcggtacatttgtaactctggtttcaagcgtaaagccggcacgtccagcctg
acagagtgcgtgttgaacaaggccacgaatgtcgcccactggacaacccccagtctcaaatgcattagagaccctgccctggttca
ccaaaggccagcgccacccagcggcggctcaggggtggaggatctggtggtggaagtggaggtggcgggtctctgcagaactggg
tgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaaagtgatgtt
caccccagttgcaaagtaacagcaatgaagtgctttctcttggagttacaagttatttcacttgagtccggagatgcaagtattca
tgatacagtagaaaatctgatcatcctagcaaacaacagtttgtcttctaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtg
aggaactggaggaaaaaaatattaaagaatttttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttcttag

SEQ ID NO: 59

Seqüência de aminoácidos:

= SEQ ID NO: 5 + SEQ ID NO: 54 + SEQ ID NO: 30 + SEQ ID NO: 50 + SEQ ID NO: 48 =

maprrargcrtlglpallllllrppatrgdykddddkiegritcpppmsvehadiwvksyslysreryicns
gfkrkagtssltecvlnkatnvahwttpslkcirdpalvhqrpappsggsggggsggggsggggslqnwvnvis
dlkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcfllelqvislesgdasihdtvenliilannslssngnv
tesgckeceeleeknikeflqsfvhivqmfints

SEQ ID NO: 60

Fig. 28

Proteínas de fusão [domínio sushi da IL-15Ralfa + IL15]

Proteína de fusão RLI:
= peptídeo de sinal de preprolactina bovina + marca Flag e local de ligação Xa + IL-15 humana madura do tipo selvagem + ligante 26 + it + sushi + i + rd + onze aminoácidos codificados pelo exón3

Seqüência de ácidos nucléicos:

= seqüência Kozak + SEQ ID NO: 57 + SEQ ID NO: 55 + SEQ ID NO: 47 + SEQ ID NO: 51 + SEQ ID NO: 29 + STOP codon =

gccaccatggacagcaaaggttcgtcgcagaaagcagggtcccgcctgctcctgctgctggtggtgtcaaatctactcttgtgcca
gggtgtggtctccaccacgcgagactacaaggatgacgatgacaagatagaagggcgtaactgggtgaatgtaataagtgatttga
aaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaaagtgatgttcaccccagttgcaaagtaaca
gcaatgaagtgctttcttggagttacaagttatttcacttgagtccggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgat
catcctagcaaacaacagtttgtcttctaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaactggaggaaaaaaata
ttaaagaatttttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacactagttctggtggcggatcaggggtggcggatct
ggcgggggtggaagtggaggtggcgggtctggcggaggttcactgcagatcacatgccctccccccatgtccgtggaacacgcaga
catctgggtcaagagctacagcttgtactccagggagcggtacatttgtaactctggtttcaagcgtaaagccggcacgtccagcc
tgacagagtgcgtgttgaacaaggccacgaatgtcgcccactggacaacccccagtctcaaatgcattagagaccctgccctggtt
caccaaaggccagcgccaccctga

SEQ ID NO: 61

Seqüência de aminoácidos:

= SEQ ID NO: 58 + SEQ ID NO: 56 + SEQ ID NO: 48 + SEQ ID NO: 52 + SEQ ID NO: 30 =

mdskgssqkagsrllllllvvsnlllcqgvvsttrdykddddkiegrnwvnvisdlkkiedliqsmhidatlyt
esdvhpsckvtamkcfllelqvislesgdasihdtvenliilannslssngnvtesgckeceeleeknikefl
qsfvhivqmfintssgggsggggsggggsggggsggggslqitcpppmsvehadiwvksyslysreryicnsgf
krkagtssltecvlnkatnvahwttpslkcirdpalvhqrpapp

SEQ ID NO: 62

Fig. 29

Interleucina 2 humana seqüência de ácido nucléico =

Interleucina 2 de *Homo Sapiens*, RNAm (1047 bp) =

NÚMERO DE ACESSO NM 000586 (VERSÃO NM 000586.2 GI:28178860)

```
   1 cgaattcccc tatcacctaa gtgtgggcta atgtaacaaa gagggatttc acctacatcc
  61 attcagtcag tctttggggg tttaaagaaa ttccaaagag tcatcagaag aggaaaaatg
 121 aaggtaatgt tttttcagac aggtaaagtc tttgaaaata tgtgtaatat gtaaaacatt
 181 ttgacacccc cataatattt ttccagaatt aacagtataa attgcatctc ttgttcaaga
 241 gttccctatc actctcttta atcactactc acagtaacct caactcctgc cacaatgtac
 301 aggatgcaac tcctgtcttg cattgcacta agtcttgcac ttgtcacaaa cagtgcacct
 361 acttcaagtt ctacaaagaa aacacagcta caactggagc atttactgct ggatttacag
 421 atgattttga atggaattaa taattacaag aatcccaaac tcaccaggat gctcacattt
 481 aagttttaca tgcccaagaa ggccacagaa ctgaaacatc ttcagtgtct agaagaagaa
 541 ctcaaacctc tggaggaagt gctaaattta gctcaaagca aaaactttca cttaagaccc
 601 agggacttaa tcagcaatat caacgtaata gttctggaac taaagggatc tgaaacaaca
 661 ttcatgtgtg aatatgctga tgagacagca accattgtag aatttctgaa cagatggatt
 721 acctttttgtc aaagcatcat ctcaacactg acttgataat taagtgcttc ccacttaaaa
 781 catatcaggc cttctattta tttaaatatt taaattttat atttattgtt gaatgtatgg
 841 tttgctacct attgtaacta ttattcttaa tcttaaaact ataaatatgg atcttttatg
 901 attcttttttg taagccctag gggctctaaa atggtttcac ttatttatcc caaaatattt
 961 attattatgt tgaatgttaa atatagtatc tatgtagatt ggttagtaaa actatttaat
1021 aaatttgata aatataaaaa aaaaaaa
```

SEQ ID NO: 63

Fig. 30

Seqüência codificadora para IL-2 humana madura do tipo selvagem =
355..753 de SEQ ID NO:63 =

```
355                                                         gcacct
361 acttcaagtt ctacaaagaa aacacagcta caactggagc atttactgct ggatttacag
421 atgattttga atggaattaa taattacaag aatcccaaac tcaccaggat gctcacattt
481 aagttttaca tgcccaagaa ggccacagaa ctgaaacatc ttcagtgtct agaagaagaa
541 ctcaaacctc tggaggaagt gctaaattta gctcaaagca aaaactttca cttaagaccc
601 agggacttaa tcagcaatat caacgtaata gttctggaac taaagggatc tgaaacaaca
661 ttcatgtgtg aatatgctga tgagacagca accattgtag aatttctgaa cagatggatt
721 acctttttgtc aaagcatcat ctcaacactg act
```

SEQ ID NO: 64

Seqüência de aminoácidos da IL-2 humana madura do tipo selvagem

```
aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnla
qsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt
```

SEQ ID NO: 65

LIGANTE IL-2:

seqüência de ácido nucléico =

```
ctgcag
```

seqüência de aminoácidos =

```
lq
```

Fig. 31

Fragmento que contém sushi de IL-15Ralfa, marcado com IL-2:

Peptídeo de sinal da IL-15R alfa + it + sushi + i + rs + lq +IL-2

Seqüência de ácidos nucléicos

= seqüência Kozak + SEQ ID NO:4 + SEQ ID NO:27 + ligante IL-2 + SEQ ID NO:64 + STOP codon =

gccgccatggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gcatcacgtg
ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt cgagcctgac
ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg
cattagagac ctgcaggcacct acttcaagtt ctacaaagaa aacacagcta caactggagc
atttactgct ggatttacag
atgattttga atggaattaa taattacaag aatcccaaac tcaccaggat gctcacattt
aagttttaca tgcccaagaa ggccacagaa ctgaaacatc ttcagtgtct agaagaagaa
ctcaaacctc tggaggaagt gctaaattta gctcaaagca aaaactttca cttaagaccc
agggacttaa tcagcaatat caacgtaata gttctggaac taaagggatc tgaaacaaca
ttcatgtgtg aatatgctga tgagacagca accattgtag aatttctgaa cagatggatt
acctttgtc aaagcatcat ctcaacactg acttga

SEQ ID NO: 66

Seqüência de aminoácidos:

= SEQ ID NO:5 + SEQ ID NO:28 + lq + SEQ ID NO:65 =

maprrargcrtlglpallllllrppatrgitcpppmsvehadiwvksyslysreryicnsgfkrkagtss
ltecvlnkatnvahwttpslkcirdlgaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfym
pkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefln
rwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 67

Fig. 32

Fragmento de região extracelular da IL-15Ralfa , marcado com IL-2 :

= peptídeo de sinal IL15-R alfa humana + fragmento de partes extracelulares de IL15-Ralfa + lq + IL-2

Seqüência de ácido nucléico:

= seqüência Kozak + SEQ ID NO:4 + SEQ ID NO:37 + ligante IL-2 + SEQ ID NO:64 + STOP codon =

gccgccatggcccc gcggcgggcg cgcggctgcc ggaccctcgg
tctcccggcg ctgctactgc tgctgctgct ccggccgccg gcgacgcggg gcatcacgtg
cctcccccca atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgtactc
cagggagcgg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac
ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg acaaccccca gtctccaaatg
cattagagcc cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca ccctccacag taacgacggc
aggggtgacc ccacagccag agagcctctc ccctttctgg aaagagcccg cagcttcatc
tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtccctgggt cccagctgat
gccttcaaaa tcacctttcc acaggaccac agagataagc agtcatgagt cctccaacgg
cacccccctct cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgcct cccaccagcc
gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactctg caggcacctc cttcaagtt
ctacaaagaa aacacagcta caactggagc atttactgct ggatttacag

atgattttga atggaattaa taattacaag aatcccaaac tcaccaggat gctcacattt
aagttttaca tgcccaagaa ggcccacagaa ctgaaacatc ttcagtgtct agaagaagaa
ctcaaacctc tggaggaagt gctaaattta gctcaaagca aaaacttcca cttaagaccc
agggacttaa tcagcaatat caacgtaata gttctggaac taaagggatc tgaaacaaca
ttcatgtgtg aatatgctga tgagacagca accattgtag aatttctgaa cagatggatt
acctttttgtc aaagcatcat ctcaacactg acttga

Seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 68

= SEQ ID NO:5 + SEQ ID NO:38 + lq + SEQ ID NO:65 =

maprrargcrtlglpallllllrppatrgitcpppmsvehadiwvksyslysreryicnsgfkrkagtss
ltecvlnkatnvahwttpslkcirdpalvhqrpappstvttagvtpqpeslspsgkepaasspssnntaatt
paivpgsqlmpskspstgtteisshesshgtpsqttaknweltapashqppgvypqghsdttlqaptssstk
ktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhl
rprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

SEQ ID NO: 69

Fig. 33

Precursor da cadeia alfa do receptor de interleucina 15 de camundongo (IL15Ralfa), transcrição da variante 1, RNAm (792 bp)

NÚMERO DE ACESSO NM_008358 (VERSÃO NM_008358.1 GI:6680408)

```
   1 atggcctggc cgcagctccg gggctatgga gtccaggcca ttcctgtgtt gctgctgctg
  61 ctgttgctac tgttgctccc gctgagggtg acgccgggca ccacgtgtcc agctcccgta
 121 tctattgagc atgctgacat ccgggtcaag aattacagtg tgaactccag ggagaggtat
 181 gtctgtaact ctggctttaa gcggaaagct ggaacatcca ccctgattga gtgtgtgatc
 241 aacaagaaca caaatgttgc ccactggaca actcccagcc tcaagtgcat cagagacccc
 301 tccctagctc actacagtcc agtgccaaca gtagtgacac caaaggtgac ctcacagcca
 361 gagagccccc ccccctctgc aaaagagcca gaagctttct ctcccaaatc agatacgtca
 421 atgaccacag agacagctat tatgcctggc tccaggctga caccatccca aacaacttct
 481 gcaggaacta cagggacagg cagtcacaag tcctcccgag ccccatctct tgcagcaaca
 541 atgaccttgg agcctacagc ctccacctcc ctcaggataa cagagatttc tccccacagt
 601 tccaaaatga cgaaagtggc catctctaca tcggtcctct tggttggtgc aggggttgtg
 661 atggctttcc tggcctggta catcaaatca aggcagcctt ctcagccgtg ccgtgttgag
 721 gtggaaacca tggaaacagt accaatgact gtgagggcca gcagcaagga ggatgaagac
 781 acaggagcct aa
```

SEQ ID NO: 72

Precursor da cadeia alfa do receptor de interleucina 15 de camundongo (IL15Ralfa) (263 aa)

ACESSO Q60819 (VERSÃO Q60819 GI:59799764)

```
   1 maspglvgyg vqaipvllll illllplrv tpgttcpppv sishadirvk nysvnsrery
  61 vcnsgfkrka gtstliecvi nknrnvahwt tpslkcirdp slahyspvpt vvtpkvtsqp
 121 espspsakep eafspksdta mttetaimpq srltpsqtts agttgtgshk ssrapslaat
 181 mtleptasts lriteispha skmtkvaist svllvgagvv maflawyiks rqpsqpcrve
 241 vetmetvpmt vrasskeded tga
```

SEQ ID NO: 73

Fig. 34

1 . . 205 de proteína IL-15Ralfa de camundongo SEQ ID NO: 73 =

região extracelular de IL-15Ralfa de rato =

```
  1 maspqlrgyg vqaipvllll lllllplrv tpgttcpppv siehadirvk nysvnsrery
 61 vcnsgfkrka gtstliecvi nkntnvahwt tpslkcirdp slahyspvpt vvtpkvtsgp
121 espspsakep eafspksdta mttetaimpg srltpsqtts agttgtgshk ssrapslaat
181 mtleptasts lriteisphs skmtk
```

SEQ ID NO: 74

36 . . 96 de proteína IL-15Ralfa de camundongo SEQ ID NO: 73 =

domínio sushi da IL-15Ralfa de camundongo =

```
 36              cpppv siehadirvk nysvnsrery
 61 vcnsgfkrka gtstliecvi nkntnvahwt tpslkc
```

SEQ ID NO: 75

97..109 de proteína IL-15Ralfa de camundongo SEQ ID NO: 73

região de articulação de IL15-Ralfa de camundongo

```
 97 irdp slahyspvp
```

SEQ ID NO: 76

110..205 de proteína IL-15Ralfa de camundongo SEQ ID NO: 73 =

região de extremidade de IL15-Ralfa de camundongo =

```
110                                                  t vvtpkvtsgp
121 espspsakep eafspksdta mttetaimpg srltpsqtts agttgtgshk ssrapslaat
181 mtleptasts lriteisphs skmtk
```

SEQ ID NO: 77

Fig. 35

Pan troglodytes (chimpanzé) semelhante ao receptor de interleucina 15, alfa (LOC466284), RNAm (1035 bp)

ACESSO XM_521684 (VERSÃO XM_521684.1 GI:55634956)

```
   1 atggagaaat tcacctggca cacaagaggc atcacgtgcc ctcccccat gtccgtggaa
  61 cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac
 121 tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc
 181 acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgccctggtt
 241 ctccaaaggc cagtgccacc ctccacagta acgacggcag ggatgacccc acagccagag
 301 agcctctccc cttctggaaa aggttccgtg gctgtcacaa tggaagacac attttcatg
 361 gagagggaac agcacagtta cgccacaccc ttacagtgca ggggcagcca ccttccaggg
 421 aaggacaagg aagacaggga agacgctgaa cacaaggcag cctctgttcc tgagcgcaag
 481 ctcatcagga cgctttcctc ccacacagcg cggagagttc aggccagagc ccaggcttcc
 541 cgtgtttcac acgcagccgc tccgagcgtc ctcggccagc gcagcttcac ctgctctcag
 601 ctgagcctcc agcagcccgc agcttcatct cccagctcaa acaccacagc ggccacaaca
 661 gcagctattg tcccgggctc ccagctgatg ccttcaaaat cacctccac aggaaccaca
 721 gagataggca gtcatgagtc ctcccacggc acccctctc agacaacagc caagacctgg
 781 gaactcacag catctgcctc ccaccagccg ccaggtgtgt atccacaggg ccacagcgac
 841 accactgtgg ctatctccac gtccactgtc ctgctgtgtg ggctgagcgc tgtgtctctc
 901 ctggcatgct acctcaagtc aaggcaaact ccccccgctgg ccagcgttga aatggaagcc
 961 atggaggctc tgccggtgac tgggggggacc agcagcagag atgaagactt ggaaaactgc
1021 tctcaccacc tatga
```

SEQ ID NO: 78

Semelhante ao receptor de interleucina 15, alfa *[Pan troglodytes]*

ACESSO XP_521684 (VERSÃO XP_521684.1 GI:55634957)

```
   1 mekftwhtrg itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn sgfkrkagts sltecvlnka
  61 tnvehwttps lkcirdpalv lqrpvppstv ttagmtpqpe slspsgkgsv avtmedtffm
 121 ereqhsyatp lqcrgshlpg kdkedrddae hkaasvperk lirtlssbta rrvqaraqas
 181 rvshaaapsv lgqrsftcsq lslqqpaass pssnttaatt aaivpgsqlm pskspstgtt
 241 eigshesshg tpsqttaktw eltasashqp pgvypqghsd ttvaiststv llcglsavsl
 301 lacylksrqt pplasvemea mealpvtggt ssrdedlenc shhl
```

SEQ ID NO: 79

Fig. 36

1..286 de IL-15Ralpha de símios SEQ ID NO: 79 =

região extracelular de IL-15Ralpha de símios =

```
  1 mekftwhtrg itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn sgfkrkagts sltecvlnka
 61 tnvahwttps lkcirdpalv lqrpvppstv ttagmtpqpe slspsgkgsv avtmedtffm
121 ereqhsyatp lqcrgshlpg kdkedredae hkaasvperk lirtlsshta rrvqaraqas
181 rvshaaapsv lgqrsftcsq lslqqpaass pssnttaatt aaivpgsqlm pskspstgtt
241 eigshesshg tpsqttaktw eltasashqp pgvypqghsd ttvais
```

SEQ ID NO: 80

13..73 de proteína de IL-15Ralpha de símios SEQ ID NO: 79 =

domínio sushi de IL-15R alfa de símios =

```
 13 cpppmsve hadiwvksys lysreryicn sgfkrkagts sltecvlnka
 61 tnvahwttps lkc
```

SEQ ID NO: 81

74..88 de IL-15Ralpha de símios SEQ ID NO: 79 =

região de articulação de IL15-R alfa de símios =

```
 74 irdpalv lqrpvpps
```

SEQ ID NO: 82

89..286 de IL-15Ralpha de símios SEQ ID NO: 79 =

região de extremidade de IL15-R alfa de símios =

```
 61                                tv ttagmtpqpe slspsgkgsv avtmedtffm
121 ereqhsyatp lqcrgshlpg kdkedredae hkaasvperk lirtlsshta rrvqaraqas
181 rvshaaapsv lgqrsftcsq lslqqpaass pssnttaatt aaivpgsqlm pskspstgtt
241 eigshesshg tpsqttaktw eltasashqp pgvypqghsd ttvais
```

SEQ ID NO: 83

Fig. 37

Rattus norvegicus semelhante ao precursor do receptor de interleucina 15 (LOC502145), RNAm, (765bp) ACESSO XM_577598 (VERSÃO XM_577598.1 GI:62663873)

```
   1 atggagcatc acagaggatc gtggaaatta tggggaccca acagggaaga catcgagaag
  61 ggcatcacgt gcccaacgcc catatctatt gaacacgcag acatccgggt caagaattac
 121 agtgtgaact ccagggaggg gtatgtctgt aactctggct tcaagcggaa agcaggcaca
 181 tccaccctga acgagtgcgt gatcaataag aacacgaatg tggccactg gacaactccc
 241 aacctcaagt gtatcaagcc agaagcttta tctcccaaat cagatatcac agtggccaca
 301 gagacagcta ttgtgcctgg ctccaggctg acaccatccc aagcagttcc tgcaggaact
 361 acagggacgg gcagcacaaa gtcctcccca gcccctctc ttgtaacaac aatgacttg
 421 gagcctacag ccttccacct cctcaggata acagagattt ctccgcacag ttccgaaatg
 481 acaaaaggtg agtattttct ttttgttgat gtgtttataa ccagggcact acaaagcaga
 541 cccagcatgc tcattcagcct ggtccaggcc actctagcac agtcgccagc agtatgcct
 601 ttgcctgcca gaaatgtctc cgttagagag caagcattct agccgcytcg tgttgaggtg
 661 gaaaccatgg aaacagtacc aatgactgtg agggcccgca gcaaggagga cgtagaccac
 721 acgacttcag aaactcaggg agaccagccc acgtgcggag tctga
```

SEQ ID NO: 84

Semelhante ao precursor de receptor de interleucina 15 *[Rattus norvegicus, (254 aa)*, ACESSO XP_577598 (VERSÃO XP_577598.1 GI:62663874)

```
   1 mehhreswkl wgcnrediek gitcptpisi ehadirvkny svnszeryvc nsqfkrkaqt
  61 stltacvink ntnvshwtip nlkcikpeal apksdttvat etaivpgsrl tpsqaasagt
 121 tgtgrhkssp apslaptmtl eptastsiri teisphssem tkgeyflfd vfitralqsr
 181 pamlislvga tlaqspavcp lprrnvsvra qasqprrvev etmetvmtv rarakededh
 241 ttsetqydqp trgv
```

SEQ ID NO: 85

Fig. 38

1..182 de proteína de IL-15Ralfa de rato SEQ ID NO: 85 =

região extracelular de IL-15R alfa de rato =

```
  1 mehhraswkl wgpnrediek gitcptpisi ehadirvkny svnsreryvc nsgfkrkagt
 61 stltecvink ntnvahwttp nlkcikpeal spksdttvat etaivpgsrl tpsqaasagt
121 tgtgrhkssp apslattmtl eptastslri teisphssem tkgeyfllfd vfitralqsr
181 ps
```

SEQ ID NO: 86

24..84 de proteína de IL-15Ralfa de rato SEQ ID NO: 85 =

domínio sushi de IL-15R alfa de rato =

```
  1 cptpisi ehadirvkny svnsreryvc nsgfkrkagt
 61 stltecvink ntnvahwttp nlkc
```

SEQ ID NO: 87

85..96 de IL-15Ralfa de rato SEQ ID NO: 85 =

região de articulação de IL-15Ralfa de rato =

```
 85 ikpeal spksdt
```

SEQ ID NO: 88

97..182 de IL-15R alfa de rato SEQ ID NO: 85 =

região de extremidade de IL-15Ralfa de rato =

```
 97                                          tvat etaivpgsrl tpsqaasagt
121 tgtgrhkssp apslattmtl eptastslri teisphssem tkgeyfllfd vfitralqsr
181 ps
```

SEQ ID NO: 89

Fig. 39

éxon 3 de IL-15Ralfa de camundongo =
293 . . 385 de proteína IL-15Ralfa de camundongo SEQ ID NO: 72 =

```
293                                                                 gagacccc
301 tccctagctc actacagtcc agtgccaaca gtagtgacac caaaggtgac ctcacagcca
361 gagagcccct ccccctctgc aaaag
```

SEQ ID NO: 90

éxon 3 DE il-15R alfa de símios =
224 . . 322 de proteína IL-15Ralfa de *Pan troglodytes* SEQ ID NO:78 =

```
224                                                       gagaccc tgccctggtt
241 ctccaaaggc cagtgccacc ctccacagta acgacggcag ggatgacccc acagccagag
301 agcctctccc cttctggaaa ag
```

SEQ ID NO: 91

éxon 3 de IL-15R alfa de rato =
257 . . 454 de proteína de IL-15R alfa de *Rattus norvegicus* SEQ ID NO:84 =

```
257                     agcc agaagcttta tctcccaaat cagataccac agtggccaca
301 gagacagcta ttgtgcctgg ctccaggctg acaccatccc aagcagcttc tgcaggaact
361 acagggacgg gcagacacaa gtcctccccа gccccatctc ttgcaacaac aatgaccttg
421 gagcctacag cctccacctc cctcaggata acag
```

SEQ ID NO: 92

Fig. 40

Parte codificadora por éxon 3 da IL-15Ralfa =
Articulação + parte codificada por éxon 3 da extremidade da IL-15R alfa

Parte codificada por éxon 3 da IL-15Ralfa humana =

95..127 de SEQ ID NO: 40 =

```
 95                                rdpalv hqrpappstv ttagvtpqpe
121 slspsgk
```

SEQ ID NO:93

Parte codificada por éxon 3 da IL-15Ralfa de camundongo =

98..128 de SEQ ID NO:74 =

```
 98                                                rdp slahyspvpt vvtpkvtsqp
121 espspsak
```

SEQ ID NO: 94

Parte codificada por éxon 3 da IL-15Ralfa de símios =

75..107 de SEQ ID NO:80 =

```
 75 rdpalv lqrpvppstv ttagmtpqpe slspsgk
```

SEQ ID NO: 95

Parte codificada por éxon 3 da IL-15Ralfa de rato =

86..151 de SEQ ID NO:86 =

```
 86                                      kpeal spksdttvat etaivpgsri tpsqaasagt
121 tgtgrhkssp apslattmtl eptastslri t
```

SEQ ID NO: 96

Fig. 41

Parte codificada poréxon 2 da IL-15R alfa (contém o domínio sushi):

Parte codificada por éxon 2 da IL-15Ralfa humana =

31..94 de SEQ ID NO: 40 =

```
31                                itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn
61 sgfkrkagts sltecvlnka tnvahwttps lkci
```

SEQ ID NO: 24

Parte codificada por éxon 2 da IL-15R alfa de camundongo =

32..97 de SEQ ID NO:74 =

```
33                                              gttcpppv siehadirvk nysvnsrery
61 vcnsgfkrka gtstliecvi nkntnvahwt tpslkci
```

SEQ ID NO: 97

Parte codificada por éxon 2 da IL-15R alfa de símios =

10..74 de SEQ ID NO:80 =

```
10              g itcpppmsve hadiwvksys lysreryicn sgfkrkagts sltecvlnka
61 tnvahwttps lkci
```

SEQ ID NO: 98

Parte codificada por éxon 2 da IL-15Ralfa de rato =

21..85 de SEQ ID NO:86 =

```
21                                gitcptpisi ehadirvkny svnsreryvc nsgfkrkagt
61 stltecvink ntnvahwttp nlkci
```

SEQ ID NO: 99

Fig. 42