

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 583**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2019** **PCT/US2019/019637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2019** **WO19165453**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2019** **E 19758302 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 3758729**

54 Título: **Conjugados de IL-15 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.02.2018 US 201862635133 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2025

73 Titular/es:

SYNTHORX, INC. (100.00%)
55 Corporate Drive
Bridgewater NJ 08807, US

72 Inventor/es:

CAFFARO, CAROLINA E.;
PTACIN, JEROD y
MILLA, MARCOS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 010 583 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de IL-15 y usos de los mismos

5 **REFERENCIA CRUZADA**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 62/635,133, presentada el 26 de febrero de 2018.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Distintas poblaciones de células T modulan el sistema inmunitario para mantener la homeostasis inmunitaria y la tolerancia. Por ejemplo, las células T reguladoras (Treg) previenen respuestas inadecuadas del sistema inmunitario al prevenir la autorreactividad patológica, mientras que las células T citotóxicas se dirigen y destruyen las células infectadas y/o las células cancerosas. En algunas realizaciones, la modulación de las diferentes poblaciones de células T proporciona una opción para el tratamiento de una enfermedad o indicación. <insértese la página 1a>

SUMARIO DE LA INVENCION

20 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. También se conserva por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En el presente documento, en ciertas realizaciones, se divulgan conjugados de IL-15 y su uso en el tratamiento de un cáncer. En algunas realizaciones, también se describen en el presente documento métodos para modular la interacción entre los receptores de IL-15 e IL-15 para estimular o expandir poblaciones específicas de células T. En casos adicionales, en el presente documento se describen más detalladamente composiciones y kits farmacéuticos que comprenden uno o más conjugados de IL-15 descritos en el presente documento.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan polipéptidos de interleucina 15 (IL-15) modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural modificado postraduccionalmente, en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α), en donde la disminución de la afinidad de unión es relativa a la afinidad de unión entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje y el IL-15R α , y en donde la interacción del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 2/interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) no se ve afectada significativamente. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, W2, V3, N4, I6, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90, y E93; Y26, E46, V49, E53, y L25; A23, T24, E89, y E93; D22, L44, Q48, y E90; L25, E53, N77, y S83; o L25 y E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E89, E53, E93, V49, E46, Y26, L25, T24, A23, D22, 121 y L52, en donde las posiciones de los residuos corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del documento WO 2015/153753 A1 describe conjugados que comprenden una fracción IL-15 (es decir, una fracción que tiene al menos alguna actividad similar a la IL-15 humana) y un polímero hidrosoluble, no peptídico.

Deiters, Alexander, et al. describen una metodología de PEGilación basada en la incorporación específica del sitio de *para*-azidofenilalanina en proteínas en levadura (Deiters, Alexander, et al. "Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14,23 (2004): 5743-5745).

55 Han, Kai-ping, et al. describen la expresión celular de ovario de hámster chino (CHO) de un complejo soluble (IL-15 N72D:IL-15RaSu/Fc) que consiste en el superagonista IL-15 N72D y una proteína de fusión dimérica de dominio sushi-IgG1 Fc de IL-15Ra (Han, Kai-ping, et al. "IL-15: IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization." *Cytokine* 56.3 (2011): 804-810).

60 Guo, Yin, et al. es un artículo de revisión dirigido a la inmunobiología del complejo IL-15/IL-15Ra como agente antitumoral y antiviral (Guo, Yin, et al. "Immunobiology of the IL-15/IL-15Ra complex as an antitumor and antiviral agent." *Cytokine & growth factor reviews* 38 (2017): 10-21).

65 El documento EP 3 064 507 A1 describe proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión y un polipéptido IL-15 que tienen una afinidad reducida por IL-15Ra. El al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83, en donde las posiciones del residuo

corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46, Y26, V49, E53 y T24, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46, V49, E53 y T24, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre Y26, V49, E53 y T24, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V49, E53 y T24, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46 y E26, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E46, en donde la posición del residuo corresponde a la posición establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es Y26, en donde la posición del residuo corresponde a la posición establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es V49, en donde la posición del residuo corresponde a la posición establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E53, en donde la posición del residuo corresponde a la posición establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es T24, en donde las posiciones del residuo corresponden a la posición establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O- 4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc-p-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L- fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina o N6-(2-azidoetoxi)-carbonil-L-lisina. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural establecido en la Figura 2C. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 modificado mediante un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado se conjuga con una fracción conjugante a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un polímero hidrosoluble, una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende: polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmecrilamida), poli(hidroxiálquilmecrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolininas (POZ), poli(N-acrilolmorfolina), o una combinación de las mismas; o un polisacárido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende PEG. En algunas realizaciones, el PEG es un PEG lineal o un PEG ramificado. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende un glicano. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o almidón de hidroxietilo (HES). En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un ácido graso saturado. En algunas realizaciones, el ácido graso saturado comprende ácido hexadecanoico, ácido tetradecanoico o ácido 15-azidopentadecanoico. En algunas realizaciones, la proteína comprende una albúmina, una transferrina, una transtiretina o una porción Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homoc aminoácido rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida directamente a al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida indirectamente a al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada a través de un engarce. En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce homobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce homobifuncional comprende el reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidiltartrato (DST), disulfosuccinimidiltartrato (sulfo DST), etilenglicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidilglutarato (DSG), N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC), dimetiladipimidato (DMA), dimetilpimelimidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), como, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, éter 1,4-butanodiol diglicidílico, dihidrazida de ácido adipico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenilo, ácido diyodo-p-xileno sulfónico, N,N'-etil-bis(yodoacetamida) o N,N'-hexametil-bis(yodoacetamida). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce heterobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce heterobifuncional comprende N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga hidrosoluble (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBs),

N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidil 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-(((4-yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carbonil)amino)hexanoato (sIACX), p-nitrofenil yodoacetato (NPIA), reticulantes reactivos con carbonilo y reactivos con sulfhidrilo como hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidosalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOs), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4(4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidil 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidil 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA) o p-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce dipeptídico escindible o no escindible. En algunas realizaciones, el engarce dipeptídico comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala o Val-Lys. En algunas realizaciones, el engarce comprende un grupo maleimida. En algunas realizaciones, el engarce comprende un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobencioxycarbonilo (PABC), un derivado o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, la fracción conjugante es capaz de prolongar la semivida sérica del polipéptido IL-15 modificado. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en la afinidad de unión a IL-15Rα con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión a IL-15Rα es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-15 de longitud completa. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 humano recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado con la disminución de la afinidad de unión a IL-15Rα es capaz de expandir las poblaciones de células T efectoras (Teff) y células asesinas naturales (NK).

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan polipéptidos de interleucina 15 (IL-15) modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural modificado postraduccionalmente, en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que no afecta significativamente a la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α) o el receptor de IL-2/interleucina 15 βγ (IL-2/IL-15R βγ). En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende una semivida prolongada. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 y E93; Y26, E46, V49, E53 y L25; A23, T24, E89 y E93; D22, L44, Q48 y E90; L25, E53, N77 y S83; o L25 y E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre M1, S18, H20, K36, K41, G55, D56, S75, S76, N77, G78, V80, T81, S83 y K86, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O- 4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina o N6-(2-azidoetoxi)-carbonil-L-lisina. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural establecido en la Figura 2C. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 modificado mediante un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado se conjuga con una fracción conjugante a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un polímero hidrosoluble, una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende: polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida),

poli(hidroxiacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolin (POZ), poli(N-acrilomorfolina), o una combinación de las mismas; o un polisacárido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende PEG. En algunas realizaciones, el PEG es un PEG lineal o un PEG ramificado. En algunas realizaciones, los polímeros hidrosolubles comprenden un glicano. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisiálico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o almidón de hidroxietilo (HES). En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un ácido graso saturado. En algunas realizaciones, el ácido graso saturado comprende ácido hexadecanoico, ácido tetradecanoico o ácido 15-azidopentadecanoico. En algunas realizaciones, la proteína comprende una albúmina, una transferrina, una transtiretina o una porción Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homocisteína rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida directamente al al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida indirectamente a al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada a través de un engarce. En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce homobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce homobifuncional comprende el reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidiltartrato (DST), disulfosuccinimidiltartrato (sulfo DST), etilenglicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidilglutarato (DSG), N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC), dimetiladipimidato (DMA), dimetilpimelimidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), como, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, éter 1,4-butanodiol diglicídico, dihidrazida de ácido adípico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenilo, ácido diyodo-p-xileno sulfónico, N,N'-etilen-bis(yodoacetamida) o N,N'-hexameten-bis(yodoacetamida). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce heterobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce heterobifuncional comprende N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga hidrosoluble (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil(4-yodoactil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoactil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidil 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-(((4-yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIACX), p-nitrofenil yodoacetato (NPIA), reticulantes reactivos con carbonilo y reactivos con sulfhidrilo como hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidosalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenziloisuccinimida (ANB-NOs), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4(4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidil 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidil 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA) o p-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce dipeptídico escindible o no escindible. En algunas realizaciones, el engarce dipeptídico comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala o Val-Lys. En algunas realizaciones, el engarce comprende un grupo maleimida. En algunas realizaciones, el engarce comprende un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobencioxycarbonilo (PABC), un derivado o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-15 de longitud completa. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 humano recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado con la disminución de la afinidad de unión a IL-15R α es capaz de expandir las poblaciones de células T efectoras (Teff) y células asesinas naturales (NK).

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan polipéptidos de interleucina 15 (IL-15) modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural modificado postraduccionalmente, en donde el

al menos un aminoácido no natural está en una posición residual que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 2/interleucina 15 β (IL-2/IL-15R β) pero no afecta la interacción con el receptor de interleucina 15 α (IL-15 α). En algunas realizaciones, en donde la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, 16, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114; E28, P33, S102, y V104; o I6 y V31. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69 y N72. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N4, S7, K11 y D61; D8, E64, N65, 168 y N72; o N1, T62 y L69. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina o N6-(2-azidoetoxi)-carbonil-L-lisina. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural establecido en las Figs. 1-3. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 modificado mediante un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado se conjuga con una fracción conjugante a través del al menos un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un polímero hidrosoluble, una proteína o un polipéptido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende: polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacetacrilamida), poli(hidroxiálquilmacetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolin (POZ), poli(N-acrilolmorfolina), o una combinación de las mismas; o un polisacárido. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende PEG. En algunas realizaciones, el PEG es un PEG lineal o un PEG ramificado. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble comprende un glicano. En algunas realizaciones, el polisacárido comprende dextrano, ácido polisialico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, heparán sulfato (HS), dextrina o almidón de hidroxietilo (HES). En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un ácido graso saturado. En algunas realizaciones, el ácido graso saturado comprende ácido hexadecanoico, ácido tetradecanoico o ácido 15-azidopentadecanoico. En algunas realizaciones, la proteína comprende una albúmina, una transferrina, una transtiretina o una porción Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un péptido XTEN, un polímero de homocisteína rico en glicina (HAP), un polipéptido PAS, un polipéptido similar a la elastina (ELP), un péptido CTP o un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida directamente a al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida indirectamente a al menos un aminoácido no natural de la IL-15 modificada a través de un engarce. En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce homobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce homobifuncional comprende el reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidiltartrato (DST), disulfosuccinimidiltartrato (sulfo DST), etilenglicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidilglutarato (DSG), N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC), dimetiladipimidato (DMA), dimetilpimelimidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), como, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, éter 1,4-butanodioldiglicídico, dihidrazida de ácido adípico, carbodihidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenilo, ácido diyodo-p-xileno sulfónico, N,N'-etilen-bis(yodoacetamida) o N,N'-hexametilén-bis(yodoacetamida). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce heterobifuncional. En algunas realizaciones, el engarce heterobifuncional comprende N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-SPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga hidrosoluble (sulfo-LC-SPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil(4-yodoacteil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoacteil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster de N-(y-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster de N-(y-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidil 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-(((4-yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIACX), p-nitrofenil yodoacetato (NPIA), reticulantes reactivos con carbonilo y reactivos con sulfhidrilo como hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidosalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-

azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxisuccinimida (ANB-NOs), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4(4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidil 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidil 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (AsBA) o p-azidofenil glioxal (APG). En algunas realizaciones, el engarce comprende un engarce dipeptídico escindible o no escindible. En algunas realizaciones, el engarce dipeptídico comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala o Val-Lys. En algunas realizaciones, el engarce comprende un grupo maleimida. En algunas realizaciones, el engarce comprende un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobencioxycarbonilo (PABC), un derivado o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, la fracción conjugante es capaz de prolongar la semivida sérica del polipéptido IL-15 modificado. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en la afinidad de unión a IL-15R α con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión a IL-15R α es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un fragmento funcionalmente activo de un polipéptido IL-15 de longitud completa. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un polipéptido IL-15 humano recombinante. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado con la disminución de la afinidad de unión a IL-15R α es capaz de expandir las poblaciones de células T efectoras (Teff) y células asesinas naturales (NK).

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan conjugados de interleucina 15 (IL-15) que comprenden: Un polipéptido IL-15 aislado y purificado; y una fracción conjugante que se une al polipéptido IL-15 aislado y purificado en una posición de aminoácido seleccionada entre N4, E46, D61, E64, N65, I68 y L69, en donde la numeración de los restos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es N4. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es E46. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es D61. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es E64. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es N65. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es I68. En algunas realizaciones, la posición de aminoácido es L69. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido se muta a cisteína. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido se muta a lisina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido seleccionado entre N4, E46, N65 y L69 se muta adicionalmente a un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAc-p-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfofoserina, fosfonoserina, fosfotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina o N6-(2-azidoetoxi)-carbonil-L-lisina. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural establecido en la Figura 2C. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 tiene una afinidad disminuida a la subunidad α del receptor de IL-15 (IL-15R α) con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en la afinidad de unión a IL-15R α con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida a IL-15R α es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la fracción conjugante deteriora o bloquea la unión de IL-15 con IL-15R α .

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden: un polipéptido IL-15 modificado o un conjugado de IL-15; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración parenteral.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan métodos para tratar una enfermedad o afección proliferativa en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido IL-15 modificado o un conjugado de IL-15. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección proliferativa es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas realizaciones, el cáncer de tumor sólido es cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer ocular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica. En algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica es leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma extraganglionar de células B de zona marginal, linfoma ganglionar de células B de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grado no de Burkitt, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL),

linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma esplénico de zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de efusión o granulomatosis linfomatoide. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado o el conjugado de IL-15 y el agente terapéutico adicional se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado o el conjugado de IL-15 y el agente terapéutico adicional se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado o el conjugado de IL-15 se administra antes del agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado o el conjugado de IL-15 se administra después de la administración del agente terapéutico adicional. En algunos ejemplos, el sujeto es un ser humano.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan métodos de expansión de poblaciones de células T efectoras (Teff) y células asesinas naturales (NK), que comprenden: (A) poner en contacto una célula con un polipéptido IL-15 modificado o un conjugado de IL-15; y (b) hacer interaccionar la IL-15 con subunidades de IL-15R β e IL-15R γ para formar un complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$; en donde el conjugado de IL-15 tiene una afinidad disminuida con la subunidad IL-15R α , y en donde el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula la expansión de células Teff y NK. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 comprende un polipéptido IL-15 aislado y purificado y una fracción conjugante que se une al polipéptido IL-2 aislado y purificado en un residuo de aminoácido seleccionado entre N4, E46, N65 y L69, en donde la numeración de los restos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en la afinidad de unión a IL-15R α con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida a IL-15R α es aproximadamente IL-15R α 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la fracción conjugante deteriora o bloquea la unión de IL-15 con IL-15R α .

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan kits que comprenden un polipéptido IL-15 modificado, un conjugado de IL-15 o una composición farmacéutica.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan kits que comprenden una molécula de ácido polinucleico que codifica un polipéptido IL-15 modificado o un polipéptido IL-15.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varios aspectos de la divulgación se establecen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación por referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la divulgación y cuyos dibujos adjuntos:

la Fig. 1 ilustra aminoácidos no naturales ejemplares. Esta figura se adapta de la Fig. 2 de Young et al., "Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon," J. of Biological Chemistry 285(15): 11039-11044 (2010);

las FIG. 2A-FIG. 2B ilustran aminoácidos no naturales ejemplares. La FIG. 2A ilustra derivados de lisina ejemplares. La FIG. 2B ilustra derivados de fenilalanina ejemplares.

Las FIG. 3A-FIG. 3D ilustran aminoácidos no naturales ilustrativos. Estos aminoácidos no naturales (UAA) se han codificado genéticamente en proteínas (FIG. 3A - UAA #1-42; FIG. 3B - UAA # 43-89; FIG. 3C - UAA # 90-128; FIG. 3D - UAA N.º 129-167). Las FIG. 3A-FIG. 3D se adoptan de la Tabla 1 de Dumas et al., Chemical Science 2015, 6, 50-69.

La FIG. 4 ilustra un gráfico de cromatografía de intercambio aniónico.

La FIG. 5 ilustra un gráfico de cromatografía en fase inversa.

La FIG. 6 ilustra los valores de EC50 para conjugados de IL-15 ejemplares con potencia nativa en el ensayo de proliferación de CTLL2. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

La FIG. 7 ilustra los valores de EC50 para conjugados de IL-15 ilustrativos con potencia reducida en el ensayo de proliferación de CTLL2. Como se muestra aquí, la pegilación específica del sitio contribuye a la farmacología in vitro. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

La FIG. 8 ilustra los valores de EC50 para IL-15 ejemplar conjugada con diferentes tamaños de PEG. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

Las FIG. 9A- FIG. 9C muestran unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un compuesto conjugado con IL-15 que se une a IL-15R α . La FIG. 9A: rHuIL-15; la FIG. 9B: conjugados de IL15 N77PEG30 y S83PEG30; y la FIG. 9C: conjugados de IL 15 E46PEG30 y E53PEG30.

La FIG. 10 muestra unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un IL-15 N77PEG30 que se une a IL-15R α e IL-2R β .

La FIG. 11 muestra unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un IL-15 E53PEG30 que se une a IL-15R α e IL-2R β .

Las FIG. 12A- FIG. 12D ilustran fosforilación de STATS en células T NK y CD8+ tras la estimulación con conjugados IL-15 PEG ejemplares. Las FIG. 12A y FIG. 12C: extensión de la semivida (S83PEG30 y N77PEG30); las FIG. 12B y FIG. 12D: interacción modulada con IL-15R α (V49PEG30, E53PEG30 y L25PEG30).

La FIG. 13 muestra perfiles de concentración en plasma de rHuIL-15, IL-15 S83PEG30, IL-15 V49PEG30 IL-15 L25 PEG30 e IL-15 N77 PEG30 a 0,3 mg/kg.

Las FIG. 14A- FIG. 14D muestran el porcentaje de fosforilación de STAT5 en células T CD8+ (FIG. 14A), células de memoria CD8 (FIG. 14B), células NK (FIG. 14C) y células Treg (FIG. 14D) en ratones dosificados con rHuIL-15 o compuestos PEGilados.

Las FIG. 15A- FIG. 15D muestran una expresión aumentada del marcador molecular de proliferación temprana Ki67 en T CD8+ (FIG. 15A), células NK (FIG. 15B), células Tmem CD8+ (FIG. 15C) pero no Treg (FIG. 15D) en animales dosificados con compuestos pegilados.

Las FIG. 16A- FIG. 16C muestran la inducción de la proliferación de células T CD8+ (FIG. 16A), células NK (FIG. 16B) y células T de memoria CD8 (FIG. 16C).

Las FIG. 17A-FIG. 17B muestran una expresión de Ki67 acrecentada en células NK (FIG. 17A) y células T CD8+ (FIG. 17B) con una dosis acrecentada del compuesto IL-15 L25PEG30 en ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El cáncer es un grupo complejo de enfermedades que implican un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o diseminar a otras partes del cuerpo. Las terapias contra el cáncer, como la radiación y la quimioterapia, dirigidas a los impulsores y vías del cáncer, pueden tener éxito. En algunos casos, las células cancerosas son capaces de adaptarse a estas terapias, lo que limita la eficacia de dichas terapias. La inmunoterapia, a diferencia de la cirugía, la quimioterapia o la radiación, estimula el sistema inmunitario a reconocer y destruir células tumorales.

Se utilizan varias citocinas en inmunoterapia por su capacidad para desencadenar una respuesta inmunitaria. Sin embargo, las inmunoterapias actuales que utilizan citocinas dan lugar a varios efectos adversos, incluyendo toxicidad y proliferación celular incontrolada. En el presente documento se proporcionan citocinas o conjugados de citocinas modificadas para su uso en el tratamiento del cáncer con capacidad para estimular o expandir poblaciones específicas de células T y NK, lo que da como resultado un tratamiento mejorado y una reducción de eventos adversos.

Las citocinas comprenden una familia de proteínas de señalización celular tales como quimiocinas, interferonas, interleucinas, linfocinas y factores de necrosis tumoral. Las citocinas son producidas por células inmunitarias tales como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y mastocitos, células endoteliales, fibroblastos y diferentes células estromales. En algunos casos, las citocinas modulan el equilibrio entre las respuestas inmunitarias humores y basadas en células.

Las interleucinas son proteínas de señalización que modulan el desarrollo y diferenciación de linfocitos T y B y células hematopoyéticas. Las interleucinas son producidas por linfocitos T CD4 auxiliares, monocitos, macrófagos y células endoteliales. En algunos casos, hay aproximadamente 15 interleucinas, interleucinas 1-13, interleucina 15 e interleucina 17.

La interleucina-15 (IL-15) es una citocina pleiotrópica cuya estructura es una glicoproteína de 14-15 kDa. La transcripción, la traducción y la secreción de IL-15 se regulan a través de múltiples mecanismos complejos. Las proteínas del receptor de IL-15 e IL-15 α (IL-15R α , CD215) se coexpresan predominantemente por monocitos activados y células dendríticas (DC). La transcripción del heterodímero IL-15/IL-15R α se produce después de la interacción de monocitos/DC con interferonas de tipo 1 o tipo 2 (IFN) o ligadura CD40 o agentes que actúan a través de receptores tipo Toll (TLR) que activan NF- κ B. Además, la expresión de la proteína IL-15/IL-15R α se controla predominantemente a los niveles de traducción y secreción.

IL-15 señala a través de un receptor heterotrimérico que comprende una cadena α única (IL-15R α), una subunidad β compartida (IL-15R β , CD132) con IL-2 (CD122) y una subunidad γ común (CD132; IL-15R γ) compartida con varias citocinas. IL-15R α tiene una alta afinidad por IL-15 con una K_d aproximadamente 10^{-11} M. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. También se divulga por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para modular las respuestas de células T y, posteriormente, para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para simular la proliferación de células T CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ y CD8⁺ su diferenciación en subconjuntos de células T efectoras definidas. En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para simular la generación y proliferación de células asesinas naturales (NK). En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para promover el mantenimiento y la supervivencia de las células T CD8 de memoria, las células T CD8 sin tratamiento previo y las células NK. En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para inducir la formación de células T CD8 de memoria. En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 se utiliza para cebar la activación específica de la diana de células NK. En algunas realizaciones, la señalización de IL-15 no da como resultado la expansión de Treg.

En el presente documento, en algunas realizaciones, se describen polipéptidos IL-15 modificados para modular las respuestas de células T y, posteriormente, para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende una disminución de la unión con el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α). En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es relativa a la afinidad de unión entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje y el IL-15R α . En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado tiene poco o ningún efecto sobre la interacción del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 2/interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$). En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende una o más modificaciones que tienen poco o ningún efecto sobre la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con el α IL-15R e IL-15R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende una disminución de la unión con IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ y la interacción IL-15R α no se ve afectada.

En el presente documento se describen polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 con capacidad mejorada para estimular una respuesta antitumoral. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 tienen un perfil de seguridad mejorado. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 comprenden una pegilación específica del sitio para aumentar la semivida. En algunas realizaciones, la pegilación específica del sitio aumenta la semivida y tiene poco o ningún efecto sobre la actividad biológica. En algunas realizaciones, la señalización de los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 está sesgada a IL-15R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 comprenden una pegilación específica del sitio para aumentar la semivida y reducir la toxicidad. En algunas realizaciones, la pegilación específica del sitio da como resultado una menor dosificación de los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15. En algunas realizaciones, la toxicidad se reduce mediante los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 que bloquean la interacción de IL-15R α . En algunas realizaciones, la actividad de los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 se limita a un sitio tumoral. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 comprenden una pegilación específica del sitio de tal manera que no se requiere la presentación transversal de IL-15 para la proliferación y función de células asesinas naturales (NK) y efectoras. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 modificados o conjugados de IL-15 comprenden una pegilación específica del sitio de tal manera que se inhibe o prohíbe el aclaramiento.

Polipéptidos IL-15 modificados y conjugados de IL-15

En el presente documento, en algunas realizaciones, se describen polipéptidos IL-15 modificados. En algunos casos, la modificación es a un aminoácido natural. En algunos casos, la modificación es a un aminoácido no natural. En algunos casos, en el presente documento se describe un polipéptido IL-15 aislado y modificado que comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, el polipéptido IL-15 es una IL-15 de mamífero aislada y purificada, por ejemplo, una proteína IL-15 humana. En algunos casos, el polipéptido IL-15 es una proteína IL-15 humana. En algunos casos, el polipéptido IL-15 comprende aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2. En algunos casos, el polipéptido IL-15 comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 2.

En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado es una variante truncada. En algunos casos, el truncamiento es una delección N-terminal. En otros casos, el truncamiento es una delección C-terminal. En casos adicionales, el truncamiento comprende delecciones tanto N-terminales como C-terminales. Por ejemplo, el truncamiento puede ser una eliminación de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos del extremo N o del extremo C, o ambos extremos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 2 residuos. En algunos casos,

el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 3 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 4 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 5 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 6 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 7 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 8 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 9 residuos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado comprende una eliminación N-terminal de al menos o aproximadamente 10 residuos.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado es un fragmento funcionalmente activo. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-15 5-114, 10-114, 15-114, 20-114, 1-110, 5-110, 10-110, 15-110, 20-110, 1-105, 5-105, 10-105, 15-105, 20-105, 1-100, 5-100, 10-100, 15-100, o 20-100, en donde las posiciones del residuo se refieren a las posiciones de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-15 5-114, 10-114, 15-114 o 20-114, en donde las posiciones de los residuos hacen referencia a las posiciones de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-15 1-110, 5-110, 10-110, 15-110 o 20-110, en donde las posiciones de los residuos se refieren a las posiciones de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-15 1-105, 5-105, 10-105, 15-105 o 20-105, en donde las posiciones de los residuos se refieren a las posiciones de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el fragmento funcionalmente activo comprende la región IL-15 1-100, 5-100, 10-100, 15-100 o 20-100, en donde las posiciones de los residuos se refieren a las posiciones de la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el fragmento de IL-15 funcionalmente activo comprende una delección interna. En algunos casos, la delección interna comprende una región de bucle. En algunos casos, la delección interna comprende una eliminación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más residuos.

En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento comprende al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, T27, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, A39, K41, L44, L45, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, y S114 en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, 167, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, y F110. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97, y E98. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69 y N72. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 Y E93. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre Y26, E46, V49, E53 y L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N4, S7, K11 y D61. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25, E53, N77 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25 y E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46, Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E46 y Y26. En algunas realizaciones, la posición del

residuo del al menos un aminoácido no natural es E46. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es Y26. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es V49. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es N77. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83. Una secuencia de aminoácidos ejemplar para IL-15 se ilustra en la Tabla 1 a continuación.

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
IL-15 (forma madura)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA MKCFLELQVISLESQDASIHDVTENLIILANNSLSSNGN VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	1
IL-15 GenBank: CAA71044.1 (precursor)	MDFQVQIFSFLISASVIMSRANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA MKCFLELQVISLESQDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	2

En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra próximo al extremo N. Como se utiliza en el presente documento, próximo se refiere a un residuo ubicado al menos a 1 residuo de distancia del residuo N-terminal y hasta aproximadamente a 50 residuos de distancia del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 10, 20, 30, 40 o 50 residuos del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 10 residuos del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 20 residuos del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 30 residuos del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 40 residuos del residuo N-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 50 residuos del residuo N-terminal.

En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural es el residuo N-terminal.

En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra próximo al extremo C. Como se utiliza en el presente documento, próximo se refiere a un residuo situado al menos a 1 residuo de distancia del residuo C-terminal y hasta aproximadamente a 50 residuos de distancia del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 10, 20, 30, 40 o 50 residuos del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 10 residuos del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 20 residuos del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 30 residuos del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 40 residuos del residuo C-terminal. En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural se encuentra dentro de los primeros 50 residuos del residuo C-terminal.

En algunos casos, el al menos un aminoácido no natural es el residuo C-terminal.

En algunas realizaciones, los polipéptidos IL-15 modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural, en donde una posición de residuo del al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 con el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α). En algunas realizaciones, la disminución en la afinidad de unión es relativa a la afinidad de unión entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje y el IL-15R α . En algunas realizaciones, la unión del polipéptido IL-15 modificado a IL-15R α no afecta a la interacción del polipéptido IL-15 modificado con el receptor de interleucina 2/interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) o mejora la interacción del polipéptido IL-15 modificado con IL-2/IL-15R $\beta\gamma$. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 y E93, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no

natural se selecciona entre Y26, E46, V49, E53 y L25, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre A23, T24, E89 y E93, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D22, L44, Q48 y E90, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es Y26. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E46. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es V49. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E53. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es L25. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende además un PEG. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 y E93. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende además un PEG para una semivida aumentada. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada de E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, 167, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, y F110, para una semivida aumentada. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada entre N71, N72 y N77. En algunos casos, el residuo conjugado con el PEG se muta a un aminoácido natural. En otros casos, el residuo conjugado con el PEG se muta a un aminoácido no natural. En casos adicionales, la mutación en N71, N72 o N77 mejora aún más una condición de CMC (por ejemplo rendimiento, pureza, estabilidad, agregación disminuida y/o mejora del plegamiento de proteínas), la potencia o una combinación de los mismos.

En algunos casos, los polipéptidos IL-15 modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural, en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con IL-2/IL-15R β , IL-15R γ o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IL-15 modificada tiene poco o ningún efecto sobre la interacción con IL-15R α . En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E28, S29, D30, V31, H32, P33, D61, T62, E64, N65, 168, L69, N72, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con IL-2/IL-15R β . En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69 y N72, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N4, S7, K11 y D61. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D8, E64, N65, 168 y N72. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N1, T62 y L69. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es N4. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es S7. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es K11. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es D61. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que disminuye selectivamente la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con IL-2/IL-15R γ . En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, 16, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 y S114. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E28, P33, S102 y V104. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre I6 y V31. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es V3. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es K10. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es S29. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es D30. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es H32. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es H105. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es Q108. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es M109. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es I111. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es N112. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es T113. En algunos casos, la posición residual del al menos un aminoácido no natural es S114. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende además un PEG. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada de N1, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E28, S29, D30, V31, H32, P33, D61, T62, E64, N65, 168, L69, N72, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende además un PEG para una semivida aumentada. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, I67, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, y F110 para una semivida aumentada. En algunos casos, el PEG se conjuga en una posición de residuo seleccionada entre N71, N72 y N77. En algunos casos, el residuo conjugado con el PEG se muta a un

aminoácido natural. En otros casos, el residuo conjugado con el PEG se muta a un aminoácido no natural. En casos adicionales, la mutación en N71, N72 o N77 mejora aún más una condición de CMC (por ejemplo rendimiento, pureza, estabilidad, agregación disminuida y/o mejora del plegamiento de proteínas), la potencia o una combinación de los mismos.

En algunos casos, los polipéptidos IL-15 modificados que comprenden al menos un aminoácido no natural, en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición de residuo que no afecta a la afinidad de unión del polipéptido IL-15 modificado con el IL-15R α e IL-15R β . En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado comprende además un PEG para una semivida aumentada. En algunas realizaciones, la IL-15 modificada comprende un PEG sin cambios en la actividad biológica. En algunas realizaciones, el residuo se modifica para la extensión de la semivida. En algunos casos, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, I67, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, I96, K97, E98, L100, Q101, y F110, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97, y E98, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre E13, L15, M19, H20, K36, V37, T38, S54, H60, I67, N71, G78, K86, E87, y Q101, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre I21, S34, C35, L44, V63, S73, L74, E82, C85, C88, L91, I96, L100, y F110, donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N71, N72 y N77, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre N77 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es D14. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es Q17. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S18. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es K41. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S51. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es L52. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es G55. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es D56. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es A57. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S58. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S75. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S76. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es N77. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es N79. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es V80. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es T81. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es G84. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E92. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es K94. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es N95. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es K97. En algunas realizaciones, la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural es E98. En algunos casos, la mutación en N71, N72 o N77 comprende una mutación en un aminoácido natural. En algunos casos, la mutación en N71, N72 o N77 mejora aún más una condición de CMC (por ejemplo rendimiento, pureza, estabilidad, agregación disminuida, y/o mejorar el plegamiento de proteínas), la potencia o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 que comprende al menos un aminoácido no natural se conjuga adicionalmente con una fracción conjugante para generar un conjugado de IL-15. En algunos casos, la posición de aminoácido del al menos un aminoácido no natural es en N1, W2, V3, N4, I6, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, T27, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, A39, K41, L44, L45, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, I67, I68, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, I96, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, o S114, donde las posiciones de residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la posición de aminoácido del al menos un aminoácido no natural es en N1, W2, V3, N4, I6, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, I67, I68, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, I96, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, o S114. En algunos casos, la fracción conjugante está unida a al menos un aminoácido no natural. En algunos casos, la fracción conjugante está unida al residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal. En algunos casos, la fracción conjugante está unida directamente a al menos un aminoácido no natural o a un resto terminal.

En otros casos, la fracción conjugante está unida indirectamente a al menos un aminoácido no natural o a un resto terminal a través de un engarce descrito más abajo.

En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-15 o el conjugado de IL-15 a una subunidad del receptor de IL-15 α (IL-15R α) con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 10 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 20 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 40 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 50 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 60 %.

En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 80 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 90 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 95 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es 100 %.

En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-15 o el conjugado de IL-15 a una subunidad del receptor de IL-15 α (IL-15R α) con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 1 vez. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 2 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 4 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 5 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 6 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 8 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 10 veces.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 no interacciona con IL-15R α .

En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-15 o el conjugado de IL-15 a una subunidad del receptor de IL-2 (IL-2R) con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. En algunas realizaciones, la subunidad IL-2R es IL-2R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 10 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 20 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 40 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 50 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 60 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 80 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 90 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 95 %. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es 100 %.

En algunas realizaciones, la afinidad disminuida del polipéptido IL-15 o el conjugado de IL-15 con una subunidad del receptor de IL-2 (IL-2R) en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje es aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En algunas realizaciones, la subunidad IL-2R es IL-2R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 1 vez. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 2 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 4 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 5 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 6 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 8 veces. En algunas realizaciones, la afinidad disminuida es aproximadamente 10 veces.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 no interacciona con IL-2R α .

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada. En algunos casos, la semivida mejorada se compara con una semivida de una proteína IL-15 de tipo salvaje o un conjugado IL-15 de tipo salvaje.

En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 14 días, 21 días, 28 días, 30 días o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 90 minutos o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 2 horas o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida de potenciación del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 3 horas o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 4 horas o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 5 horas o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es al menos 6 horas o más larga que la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado de IL-15 de tipo salvaje.

[illegible]

En algunos casos, la semivida mejorada del polipéptido IL-15 o conjugado de IL-15 es de aproximadamente 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 14 días, 21 días, 28 días o 30 días en comparación con la semivida de la proteína IL-15 de tipo salvaje o el conjugado IL-15 de tipo salvaje. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 90 minutos. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 2 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 3 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 4 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 5 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 6 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 7 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 8 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 9 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 10 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 11 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 12 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 18 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 24 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 36 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 48 horas. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 3 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 4 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 5 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 6 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 7 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 10 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de

aproximadamente 12 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 14 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 21 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 28 días. En algunos casos, el polipéptido IL-15 biológicamente activo o conjugado de IL-15 tiene una semivida mejorada de aproximadamente 30 días.

En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado conserva una potencia de señalización significativa con el complejo de señalización del receptor de interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-15R $\beta\gamma$). En algunos casos, la potencia de señalización se compara con una potencia de señalización entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje e IL-15R $\beta\gamma$. En algunos casos, una diferencia en la potencia de señalización del receptor entre el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ modificado y el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje es inferior a 1000 veces, inferior a 500 veces, inferior a 200 veces, inferior a 100 veces, inferior a 50 veces, inferior a 10 veces, inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces, o inferior a 1 vez. En algunos casos, una diferencia en la potencia de señalización del receptor entre el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ modificado y el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje es mayor de 10 veces, mayor de 20 veces, mayor de 30 veces, mayor de 40 veces, mayor de 50 veces, mayor que 100 veces, mayor que 200 veces, mayor que 300 veces, mayor que 400 veces o mayor que 500 veces. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado es un agonista parcial, por ejemplo un agonista que activa un receptor (por ejemplo un complejo de señalización de IL-15 $\beta\gamma$) pero solo tiene una eficacia parcial en el receptor con respecto a un agonista completo. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado es un agonista completo, por ejemplo un agonista que activa un receptor (por ejemplo un complejo de señalización IL-15 $\beta\gamma$) a una respuesta máxima.

En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide mediante un valor de EC50. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado proporciona un valor de EC50 que es inferior a 1000 veces, inferior a 500 veces, inferior a 200 veces, inferior a 100 veces, inferior a 50 veces, inferior a 10 veces, inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces, o inferior a 1 vez diferente que un valor de EC50 del complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado proporciona un valor de EC50 que es mayor de 10 veces, mayor de 20 veces, mayor de 30 veces, mayor de 40 veces, mayor de 50 veces, más de 100 veces, más de 200 veces, más de 300 veces, más de 400 veces o más de 500 veces diferente de un valor de EC50 del complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje.

En algunos casos, la potencia de señalización del receptor se mide mediante un valor de ED50. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado proporciona un valor de ED50 que es inferior a 1000 veces, inferior a 500 veces, inferior a 200 veces, inferior a 100 veces, inferior a 50 veces, inferior a 10 veces, inferior a 5 veces, inferior a 4 veces, inferior a 3 veces, inferior a 2 veces, o inferior a 1 vez diferente que un valor de EC50 del complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje. En algunos casos, el polipéptido IL-15 modificado proporciona un valor de ED50 que es mayor que 10 veces, mayor que 20 veces, mayor que 30 veces, mayor que 40 veces, mayor que 50 veces, mayor que 100 veces, mayor que 200 veces, mayor que 300 veces, mayor que 400 veces o mayor que 500 veces diferente de un valor de EC50 del complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ de tipo salvaje.

En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 está modificado (por ejemplo pegilado) para prolongar la semivida, mejorar la estabilidad, mejorar el rendimiento de purificación, mejorar la pureza, disminuir la agregación, mejorar el plegamiento de proteínas, o una combinación de las mismas, durante la etapa de química, fabricación y controles (CMC). En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica en una posición de aminoácido: N71, N72 o N77, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica en el residuo N77, por ejemplo mediante pegilación, para prolongar la semivida, mejorar la estabilidad, mejorar el rendimiento de purificación, mejorar la pureza, disminuir la agregación, mejorar el plegamiento de proteínas, o una combinación de las mismas, durante la etapa de CMC. En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en la posición N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, o S114. En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en una posición D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90, o E93, en donde la modificación deteriora la interacción con IL-15R α . En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en una posición N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69 o N72, en donde la modificación deteriora la interacción con IL-15R β . En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en una posición V3, 16, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, 1111, N112, T113, o S114, en donde la modificación deteriora la interacción con IL-15R γ . En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en una posición E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, I67, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, o F110, en donde la modificación mejora la extensión de la semivida. En algunos casos, el polipéptido IL-15 se modifica adicionalmente en una o más de las posiciones anteriores para deteriorar la interacción con IL-15R α , deteriorar la interacción con IL-15R β , deteriorar la interacción con IL-15R γ , mejorar la extensión de la semivida o una combinación de los mismos.

Precusores del conjugado de IL-15

En el presente documento se divulgan precursores del conjugado de IL-15, que comprenden un polipéptido de IL-15 modificado, en donde uno o más aminoácidos se han mutado a partir del aminoácido de tipo salvaje. Dichos precursores se utilizan a menudo con los métodos descritos en el presente documento para el tratamiento de enfermedades o afecciones. En algunas realizaciones, un precursor de IL-15 no está conjugado. Dichas mutaciones comprenden de forma variada adiciones, deleciones o sustituciones. En algunos casos, la adición comprende la inclusión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos en el extremo N, el extremo C o una región interna del polipéptido IL-15. En casos adicionales, la deleción comprende la deleción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos del extremo N, el extremo C o dentro de una región interna del polipéptido IL-15.

Aminoácidos naturales y no naturales

El aminoácido no natural del polipéptido IL-15 modificado de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, un residuo de aminoácido divulgado en el presente documento (por ejemplo, dentro de un polipéptido IL-15) se muta a lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina o tirosina antes de unirse a (o reaccionar con) una fracción conjugante. Por ejemplo, la cadena lateral de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, el ácido glutámico, serina, treonina o tirosina pueden unirse a una fracción conjugante divulgada en el presente documento. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a cisteína, lisina o histidina. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a cisteína. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a lisina. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a histidina. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a tirosina. En algunos casos, el residuo de aminoácido se muta a triptófano. En algunos casos, el residuo de aminoácido se encuentra próxima al extremo C de Nor, en el extremo N o C, o en una posición de residuo interno. En algunos casos, el residuo de aminoácido es el residuo N o C-terminal y la mutación es a cisteína o lisina. En algunos casos, el residuo de aminoácido se encuentra próximo al resto N o C-terminal (por ejemplo dentro de 50, 40, 30, 20 o 10 restos del residuo N o C-terminal) y la mutación es a cisteína o lisina.

En algunos casos, se añade un residuo de aminoácido al resto N o C-terminal, es decir, el polipéptido IL-15 comprende un residuo de aminoácido adicional en el extremo N o C y el residuo de aminoácido adicional es cisteína o lisina. En algunos casos, el residuo de aminoácido adicional es cisteína. En algunos casos, el aminoácido adicional se conjuga con una fracción conjugante.

En algunas realizaciones, un residuo de aminoácido descrito en el presente documento (por ejemplo, dentro de un polipéptido IL-15) se muta en un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural no se conjuga con una fracción conjugante. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 divulgado en el presente documento comprende un aminoácido no natural, en donde la IL-15 se conjuga con la proteína, en donde el punto de unión no es el aminoácido no natural.

En algunas realizaciones, un residuo de aminoácido divulgado en el presente documento (por ejemplo, dentro de un polipéptido IL-15) se muta en un aminoácido no natural antes de unirse a una fracción conjugante. En algunos casos, la mutación a un aminoácido no natural previene o minimiza una respuesta de antígeno propio del sistema inmunitario. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido distinto de los 20 aminoácidos que se producen naturalmente en la proteína. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales incluyen: p-acetil-L-fenilalanina, p-yodo-L-fenilalanina, p-metoxifenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-boronofenilalanina, O-propargiltirosina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfotirosina, p-bromofenilalanina, selenocisteína, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, N6-[(2-azidoetoxi)carbonil]-L-lisina (AzK), un análogo no natural de un aminoácido tirosina; un análogo no natural de un aminoácido glutamina; un análogo no natural de un aminoácido fenilalanina; un análogo no natural de un aminoácido serina; un análogo no natural de un aminoácido treonina; un alquilo, arilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o aminoácido sustituido, o una combinación de los mismos; un aminoácido con un reticulante fotoactivable; un aminoácido etiquetado en espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido de unión a metal; un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoencapsulado y/o fotoisomerizable; un aminoácido de biotina o que contiene un análogo de biotina; un aminoácido que contiene ceto; un aminoácido que comprende polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado; un aminoácido escindible químicamente o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral prolongada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido por azúcar; un aminoácido que contiene azúcar enlazado al carbono; un aminoácido activo redox; un ácido que contiene α -hidroxi; un aminotioácido; un aminoácido disustituido α , α ; un β -aminoácido; un aminoácido cíclico distinto de prolina o histidina, y un aminoácido aromático distinto de fenilalanina, tirosina o triptófano.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un grupo reactivo selectivo o un grupo reactivo para el etiquetado selectivo del sitio de un polipéptido diana. En algunos casos, la química es una reacción biortogonal (por ejemplo reacciones biocompatibles y selectivas). En algunos casos, la química es una reacción de formación de triazol de alquilo-azida catalizada con Cu(I) o "libre de cobre", la ligadura de Staudinger, la reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA), química de "foto-clíc" o un proceso mediado por metátesis de olefina y acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura o Sonogashira.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un grupo fotorreactivo, que se reticula, tras la irradiación con, por ejemplo, UV.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido fotoencapsulado.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de aminoácido para-sustituido, meta-sustituido u *orto*-sustituido.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-yodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-metoxifenilalanina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O- 4-alilo-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina o isopropil-L-fenilalanina.

En algunos casos, el aminoácido no natural es 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina o 3-yodotirosina.

En algunos casos, el aminoácido no natural es fenilselenocisteína.

En algunos casos, el aminoácido no natural es una benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoílo o derivado de fenilalanina que contiene azida.

En algunos casos, el aminoácido no natural es una benzofenona, cetona, yoduro, metoxi, acetilo, benzoílo o derivado de lisina que contiene azida.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende una cadena lateral aromática.

En algunos casos, el aminoácido no natural no comprende una cadena lateral aromática.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo azido.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aceptor de Michael. En algunos casos, los grupos aceptores de Michael comprenden un resto insaturado capaz de formar un enlace covalente a través de una reacción de adición 1,2. En algunos casos, los grupos aceptores de Michael comprenden alquenos o alquinos deficientes en electrones. En algunos casos, los grupos aceptores de Michael incluyen, pero sin limitación, alfa,beta insaturados: cetonas, aldehídos, sulfóxidos, sulfonas, nitrilos, iminas o aromáticos.

En algunos casos, el aminoácido no natural es deshidroalanina.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo aldehído o cetona.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende un grupo aldehído o cetona.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende uno o más átomos de O, N, Se o S en la posición beta, gamma o delta. En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que comprende átomos O, N, Se o S en la posición gamma.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina en donde el átomo N épsilon se reemplaza con un átomo de oxígeno.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina que no es lisina modificada postraduccionalmente de origen natural.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido que comprende una cadena lateral, en donde el sexto átomo de la posición alfa comprende un grupo carbonilo. En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido que comprende una cadena lateral, en donde el sexto átomo de la posición alfa comprende un grupo carbonilo, y el quinto átomo de la posición alfa es un nitrógeno. En algunos casos, el aminoácido no natural es un

aminoácido que comprende una cadena lateral, en donde el séptimo átomo de la posición alfa es un átomo de oxígeno.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de serina que comprende selenio. En algunos casos, el aminoácido no natural es selenoserina (ácido 2-amino-3-hidroselenopropanoico). En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-3-((2-((3-(benciloxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil)propanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-3-(fenilselanil)propanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural comprende selenio, en donde la oxidación del selenio da como resultado la formación de un aminoácido no natural que comprende un alqueno.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo ciclooctinilo.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo transcicloctenilo.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo norbornenilo.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo ciclopropenilo.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo diazirina.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un grupo tetrazina.

En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina, en donde el nitrógeno de la cadena lateral está carbamilado. En algunos casos, el aminoácido no natural es un derivado de lisina, en donde el nitrógeno de la cadena lateral está acilado. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((terc-butoxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((terc-butoxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-Boc-N6-metilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-acetilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es pirrolisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-trifluoroacetilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((benciloxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((p-yodobenciloxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido hexanoico 2-amino-6-1[(p-nitrobenciloxi)carbonil]amino I. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-prolilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es 2-amino-6-(((ciclopentiloxi)carbonil)amino)ácido hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(ciclopentanocarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(tetrahidrofurano-2-carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(3-etiniltetrahidrofurano-2-carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((prop-2-in-1-ilo)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((2-azidociclopentiloxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((2-azidoetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((2-nitrobenciloxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-(((2-ciclooctiniloxi)carbonil)amino)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-aminobut-3-inoil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-6-((2-aminobut-3-inoil)oxi)hexanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(aliloxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(butenil-4-oxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(pentenil-5-oxicarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((but-3-in-1-ilo)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es n6-((pent-4-in-1-ilo)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(tiazolidina-4-carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-8-oxonanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es ácido 2-amino-8-oxooctanoico. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(2-oxoacetil)lisina.

En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-propionilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-butililisina, en algunos casos, el aminoácido no natural es N6-(but-2-enoil)lisina, en algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((biciclo[2,2,1]hept-5-en-2-ilo)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((spiro[2.3]hex-1-en-5-ilmetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((4-(1-(trifluorometil)cicloprop-2-en-1-il)bencil)oxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilmetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es cisteinilisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((2-(3-metil-3H-diazirin-3-il)etoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((3-(3-metil-3H-diazirin-3-il)propoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((meta nitrobeniloxi)N6-metilcarbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi)carbonil)lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural es N6-((ciclohept-3-en-1-ilo)carbonil)-L-lisina.

En algunos casos, el aminoácido no natural es 2-amino-3-((((((ácido benciloxi)carbonil)amino)metil)selanil)propanoico.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un codón de parada ámbar, ópalo u ocre reutilizado.

5 En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un codón de 4 bases.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un codón de sentido raro reutilizado o un codón de sentido común reutilizado.

10 En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un codón sintético que comprende un ácido nucleico no natural.

En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora en la IL-15 mediante un par ortogonal de sintetasa/ARNt modificado. Dichos pares ortogonales comprenden una sintetasa no natural que es capaz de cargar el ARNt no natural con el aminoácido no natural, al tiempo que minimiza la carga de a) otros aminoácidos endógenos sobre el ARNt no natural y b) aminoácidos no naturales sobre otros ARNt endógenos. Dichos pares ortogonales comprenden ARNt que son capaces de ser cargados por la sintetasa no natural, evitando al mismo tiempo ser cargados con otros aminoácidos endógenos por sintetasa endógenas. En algunas realizaciones, dichos pares se identifican a partir de diversos organismos, tales como bacterias, levaduras, arqueas o fuentes humanas. En algunas realizaciones, un par ortogonal de sintetasa/ARNt comprende componentes de un solo organismo. En algunas realizaciones, un par de sintetasa ortogonal/ARNt comprende componentes de dos organismos diferentes. En algunas realizaciones, un par de sintetasa ortogonal/ARNt que comprende componentes que antes de la modificación promueven la traducción de dos aminoácidos diferentes. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una alanina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una arginina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una asparagina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una sintetasa de ácido aspártico modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una cisteína sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una glutamina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una sintetasa de ácido glutámico modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una alanina glicina modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una histidina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una leucina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una isoleucina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una lisina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una metionina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una fenilalanina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una prolina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una serina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una treonina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una triptófano sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una tirosina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una valina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, una sintetasa ortogonal es una fosfoserina sintetasa modificada. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de alanina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de arginina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de asparagina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de ácido aspártico modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de cisteína modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de glutamina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de ácido glutámico modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es una alanina glicina modificada. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de histidina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de leucina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt isoleucina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de lisina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de metionina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de prolina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de serina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt treonina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de triptófano modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de tirosina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt valina modificado. En algunas realizaciones, un ARNt ortogonal es un ARNt de fosfoserina modificado.

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un par de aminoácido (aaRS o RS)-ARNt sintetasa-ARNt. Los pares de aaRS-ARNt ejemplares incluyen, pero sin limitación, pares *Methanococcus jannaschii* (*Mj-Tyr*) aaRS/ARNt, pares *E. coli* TyrRS (*Ec-Tyr*)/*B. stearothermophilus* ARNt_{CUA}, pares *E. coli* LeuRS (*Ec-Leu*)/*B. stearothermophilus* ARNt_{CUA} y pares pirrolisil-ARNt. En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora en la citocina (por ejemplo, el polipéptido IL) mediante un par *Mj-Tyr*RS/ARNt. Los UAA ejemplares que se pueden incorporar mediante un par *Mj-Tyr* RS/ARNt incluyen, pero sin limitación, derivados de fenilalanina para-sustituidos tales como *p*-aminofenilalanina y *p*-metoxifenilalanina; derivados de tirosina meta-sustituidos tales como 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina y 3-yodotirosina; fenilselenocisteína; *p*-boronofenilalanina; y *o*-nitrobenciltirosina.

En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un par *Ec-Tyr*/ARNt_{CUA} o *Ec-Leu*/ARNt_{CUA}. Los UAA ilustrativos que se pueden incorporar mediante un par *Ec-Tyr*/ARNt_{CUA} o *Ec-Leu*/ARNt_{CUA} incluyen, pero sin limitación, derivados de fenilalanina que contienen sustituyentes de benzofenona, cetona, yoduro o azida; *O*-propargiltirosina; ácido α -aminocaprílico, *O*-metiltirosina, *O*-nitrobenzil cisteína; y ácido 3-(naftaleno-2-ilamino)-2-aminopropanoico.

En algunos casos, el aminoácido no natural se incorpora en el polipéptido IL-15 mediante un par pirrolisil-ARNt. En algunos casos, el PyIRS se obtiene a partir de un arqueobacteriano, por ejemplo de un arqueobacteriano metanogénico. En algunos casos, el PyIRS se obtiene a partir de *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* o *Methanosarcina acetivorans*. Los UAA ilustrativos que se pueden incorporar mediante un par pirrolisil-ARNt incluyen, pero sin limitación, lisinas sustituidas por amida y carbamato tales como ácido 2-amino-6-((R)-tetrahidrofurano-2-carboxamida)hexanoico, *N*- ϵ -D-prolil-L-lisina y *N*- ϵ -ciclopentiloxycarbonil-L-lisina; *N*- ϵ -acrilolil-L-lisina; *N*- ϵ -[(1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etoxi)carbonil]-L-lisina; y *N*- ϵ -(1-metilciclopro-2-enecarboxamido)lisina.

En algunos casos, un aminoácido no natural se incorpora a un polipéptido IL-15 mediante una sintetasa divulgada en los documentos US 9.988.619 y US 9.938.516. Los UAA ilustrativos que se pueden incorporar mediante tales sintetasas incluyen aminoácidos no naturales para-metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo, heteroaralquilo y otros. En algunas realizaciones, dichos UAA comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, tiazolilo, tiofenilo u otro heterociclo. Dichos aminoácidos en algunas realizaciones comprenden azidas, tetrazinas u otro grupo químico capaz de conjugarse con un compañero de acoplamiento, tal como una fracción hidrosoluble. En algunas realizaciones, dichas sintetasas se expresan y se utilizan para incorporar UAA en citocinas in vivo. En algunas realizaciones, dichas sintetasas se utilizan para incorporar UAA en citocinas utilizando un sistema de traducción libre de células.

En algunos casos, un aminoácido no natural se incorpora en un polipéptido IL-15 mediante una sintetasa de origen natural. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural se incorpora a una citocina por un organismo que es auxotrófico para uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, las sintetasas correspondientes al aminoácido auxotrófico son capaces de cargar el ARNt correspondiente con un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es selenocisteína, o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es selenometionina, o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural es un aminoácido aromático, en donde el aminoácido aromático comprende un haluro de arilo, tal como un yoduro. En realizaciones, el aminoácido no natural es estructuralmente similar al aminoácido auxotrófico.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la **FIG. 1**.

En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado o análogo de lisina o fenilalanina. En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado de lisina o un análogo de lisina. En algunos casos, el aminoácido no natural comprende una pirrolisina (PyL). En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un derivado de fenilalanina o un análogo de fenilalanina. En algunos casos, el aminoácido no natural es un aminoácido no natural descrito en Wan, et al., "Pyrrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool," *Biochem Biophys Acta* 1844(6): 1059-4070 (2014). En algunos casos, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la **FIG.2** (por ejemplo la **FIG. 2A** y la **FIG. 2B**).

En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un aminoácido no natural ilustrado en la **FIG. 3A** - **FIG. 3D** (adoptado de la Tabla 1 de Dumas *et al.*, *Chemical Science* 2015, **6**, 50-69).

En algunas realizaciones, un aminoácido no natural incorporado en un polipéptido IL-15 se divulga en los documentos US 9,840,493; US 9,682,934; US 2017/0260137; US 9,938,516; o US 2018/0086734. Los UAA ejemplares que se pueden incorporar mediante tales sintetasas incluyen para-metilazido-L-fenilalanina, aralquilo, heterociclilo y heteroaralquilo, y aminoácidos no naturales derivados de lisina. En algunas realizaciones, dichos UAA comprenden piridilo, pirazinilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo, tiazolilo, tiofenilo u otro heterociclo. Dichos aminoácidos en algunas realizaciones comprenden azidas, tetrazinas u otro grupo químico capaz de conjugarse con un compañero de acoplamiento, tal como una fracción hidrosoluble. En algunas realizaciones, una UAA comprende una azida unida a una fracción aromática a través de un engarce alquilo. En algunas realizaciones, un engarce alquilo es un engarce C₁-C₁₀. En algunas realizaciones, una UAA comprende una tetrazina unida a una fracción aromática a través de un engarce alquilo. En algunas realizaciones, una UAA comprende una tetrazina unida a una fracción aromática a través de un grupo amino. En algunas realizaciones, una UAA comprende una tetrazina unida a una fracción aromática a través de un grupo alquilamino. En algunas realizaciones, una UAA comprende una azida unida al nitrógeno terminal (por ejemplo N6 de un derivado de lisina, o N5, N4 o N3 de un derivado que comprende una cadena lateral de alquilo más corta) de una cadena lateral de aminoácidos a través de una cadena de alquilo. En algunas realizaciones, una UAA comprende una tetrazina unida al nitrógeno terminal de una cadena lateral de aminoácidos a través de una cadena de alquilo. En algunas realizaciones, una UAA comprende una azida o tetrazina unida a una amida a través de un engarce alquilo. En algunas realizaciones, la UAA es un carbamato o amida que contiene azida o tetrazina de 3-aminoalanina, serina, lisina o derivado de las mismas. En algunas realizaciones, dichos UAAs se incorporan en citocinas in vivo. En algunas realizaciones, dichos UAAs se incorporan en citocinas en un sistema libre de células.

Fracciones de conjugación

La fracción de conjugación del polipéptido IL-15 de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En determinadas realizaciones, en el presente documento se divulgan fracciones conjugantes que están unidas a uno o más polipéptidos IL-15 modificados descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la fracción conjugante es una molécula que perturba la interacción de la IL-15 con su receptor. En algunas realizaciones, la fracción conjugante es cualquier molécula que, cuando se une a IL-15, permite que el conjugado de IL-15 module una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida a la IL-15 a través de un enlace covalente. En algunos casos, una IL-15 descrita en el presente documento se une a una fracción conjugante con un grupo triazol. En algunos casos, una IL-15 descrita en el presente documento se une a una fracción conjugante con un grupo dihidropiridazina o piridazina. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un polímero hidrosoluble. En otros casos, la fracción conjugante comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma. En casos adicionales, la fracción conjugante comprende un péptido. En casos adicionales, la fracción conjugante comprende un ácido nucleico. En casos adicionales, la fracción conjugante comprende una molécula pequeña. En casos adicionales, la fracción conjugante comprende un bioconjugado (por ejemplo un agonista de TLR tal como un agonista de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 o TLR9; o un ligando sintético tal como Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poli I:C, poli A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA o flagelina). En algunos casos, la fracción conjugante aumenta la semivida sérica y/o mejora la estabilidad. En algunos casos, la fracción conjugante reduce la interacción de citocinas con uno o más dominios o subunidades receptoras de citocinas. En casos adicionales, la fracción conjugante bloquea la interacción de IL-15 con uno o más dominios o subunidades de IL-15 con sus receptores afines. En algunas realizaciones, los conjugados de IL-15 descritos en el presente documento comprenden múltiples fracciones conjugantes. En algunas realizaciones, una fracción conjugante se une a un aminoácido natural o natural en el polipéptido IL-15. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 comprende una fracción conjugante unido a un aminoácido natural. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 se une a un aminoácido no natural en el péptido de citocinas. En algunas realizaciones, una fracción conjugante se une al aminoácido terminal N o C del polipéptido IL-15. En el presente documento se divulgan varios sitios de combinaciones, por ejemplo, una primera fracción conjugante se une a un aminoácido natural o no natural en el polipéptido IL-15, y una segunda fracción conjugante se une al aminoácido terminal N o C del polipéptido IL-15. En algunas realizaciones, una sola fracción conjugante se une a múltiples restos del polipéptido IL-15 (por ejemplo una base). En algunas realizaciones, una fracción conjugante está unida a los aminoácidos terminales N y C del polipéptido IL-15.

Polímeros hidrosolubles

La fracción de conjugación del polipéptido IL-15 de la invención comprende un polímero hidrosoluble. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble es un polímero no peptídico, no tóxico y biocompatible. Como se utiliza en el presente documento, una sustancia se considera biocompatible si los efectos beneficiosos asociados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo un agente activo tal como una fracción de IL-15) en relación con tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) superan cualquier efecto perjudicial evaluado por un clínico, por ejemplo, un médico. En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble es además no inmunógeno. En algunas realizaciones, una sustancia se considera no inmunógena si el uso previsto de la sustancia in vivo no produce una respuesta inmunitaria no deseada (por ejemplo la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmunitaria, dicha respuesta no se considera clínicamente significativa o importante según lo evaluado por un clínico, por ejemplo un médico, un toxicólogo o un especialista en desarrollo clínico.

En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble se caracteriza por tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 300 extremos. Los polímeros hidrosolubles ejemplares incluyen, pero sin limitación, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol ("PEG"), polipropilenglicol ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina ("POZ") (que se describen en el documento WO 2008/106186), poli(N-acrilolmorfolina) y combinaciones de cualquiera de las anteriores.

En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble no se limita a una estructura particular. En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble es lineal (por ejemplo un extremo enmascarado, por ejemplo PEG alcoxi o un PEG bifuncional), ramificado o multibrazo (por ejemplo PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de polioliol), una arquitectura dendrítica (o estrella), cada uno con o sin uno o más enlaces degradables. Además, la estructura interna del polímero hidrosoluble se puede organizar en cualquier número de patrones de repetición diferentes y se puede seleccionar del grupo constituido por homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero en bloque.

En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del polímero hidrosoluble en el conjugado de IL-21 es de aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 150.000 Daltons. Los intervalos ejemplares incluyen, por ejemplo, pesos moleculares medios en peso en el intervalo de más de 5.000 Daltons a aproximadamente 100.000

- Daltons, en el rango de aproximadamente 6.000 Daltons a aproximadamente 90.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el rango de más de 10.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 53.000 Daltons a aproximadamente 85.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 25.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 29.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons, en el rango de aproximadamente 35.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons y en el rango de aproximadamente 40.000 Daltons a aproximadamente 120.000 Daltons.
- Los pesos moleculares promedio en peso ejemplares para el polímero hidrosoluble incluyen aproximadamente 100 Daltons, aproximadamente 200 Daltons, aproximadamente 300 Daltons, aproximadamente 400 Daltons, aproximadamente 500 Daltons, aproximadamente 600 Daltons, aproximadamente 700 Daltons, aproximadamente 750 Daltons, aproximadamente 800 Daltons, aproximadamente 900 Daltons, aproximadamente 1.000 Daltons, aproximadamente 1.500 Daltons, aproximadamente 2.000 Daltons, aproximadamente 2.200 Daltons, aproximadamente 2.500 Daltons, aproximadamente 3.000 Daltons, aproximadamente 4.000 Daltons, aproximadamente 4.400 Daltons, aproximadamente 4.500 Daltons, aproximadamente 5.000 Daltons, aproximadamente 5.500 Daltons, aproximadamente 6.000 Daltons, aproximadamente 7.000 Daltons, aproximadamente 7.500 Daltons, aproximadamente 8.000 Daltons, aproximadamente 9.000 Daltons, aproximadamente 10.000 Daltons, aproximadamente 11.000 Daltons, aproximadamente 12.000 Daltons, aproximadamente 13.000 Daltons, aproximadamente 14.000 Daltons, aproximadamente 15.000 Daltons, aproximadamente 20.000 Daltons, aproximadamente 22.500 Daltons, aproximadamente 25.000 Daltons, aproximadamente 30.000 Daltons, aproximadamente 35.000 Daltons, aproximadamente 40.000 Daltons, aproximadamente 45.000 Daltons, aproximadamente 50.000 Daltons, aproximadamente 55.000 Daltons, aproximadamente 60.000 Daltons, aproximadamente 65.000 Daltons, aproximadamente 70.000 Daltons y aproximadamente 75.000 Daltons. También se pueden utilizar versiones ramificadas del polímero hidrosoluble (por ejemplo un polímero hidrosoluble de 40.000 Daltons ramificado comprendido por dos polímeros de 20.000 Daltons) que tienen un peso molecular total de cualquiera de los anteriores. En una o más realizaciones, el conjugado no tendrá ninguna fracción de PEG unida, ya sea directa o indirectamente, con un PEG que tiene un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 6.000 Daltons.
- Los PEG normalmente comprenderán un número de monómeros de $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ [o monómeros de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$, dependiendo de cómo se defina el PEG]. Tal como se utiliza en el presente documento, el número de unidades repetitivas se identifica mediante el subíndice "n" en " $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$." Por lo tanto, el valor de (n) normalmente cae dentro de uno o más de los siguientes intervalos: de 2 a aproximadamente 3400, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2300, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2270, de aproximadamente 136 a aproximadamente 2050, de aproximadamente 225 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 450 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 1200 a aproximadamente 1930, de aproximadamente 568 a aproximadamente 2727, de aproximadamente 660 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 795 a aproximadamente 2730, de aproximadamente 909 a aproximadamente 2730, and de aproximadamente 1.200 a aproximadamente 1.900. Para cualquier polímero dado en el que se conozca el peso molecular, es posible determinar el número de unidades repetitivas (es decir, "n") dividiendo el peso molecular promedio total del polímero por el peso molecular del monómero repetitivo.
- En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble es un polímero enmascarado en posición terminal, es decir, un polímero que tiene al menos un extremo enmascarado con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C_{1-6} inferior, o un grupo hidroxilo. Cuando el polímero es PEG, por ejemplo, se puede utilizar un metoxi-PEG (comúnmente denominado mPEG), que es una forma lineal de PEG en donde un extremo del polímero es un grupo metoxi $(-\text{OCH}_3)$, mientras que el otro extremo es un hidroxilo u otro grupo funcional que puede modificarse químicamente de manera opcional.
- En algunas realizaciones, los polímeros hidrosolubles ejemplares incluyen, pero sin limitación, PEG discreto lineal o ramificado (dPEG) de Quanta Biodesign, Ltd; PEG lineales, ramificados o bifurcados de Nektar Therapeutics; derivados de PEG lineales, ramificados o en forma de Y de JenKem Technology.
- En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 descrito en el presente documento se conjuga con un polímero hidrosoluble seleccionado de poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol ("PEG"), polipropilenglicol ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefinico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(metacrilato de hidroxialquilo), poli(sacáridos), poli(α -hidroxil ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolininas ("POZ"), poli(N-acriloilmorfolina) y una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 está conjugado con PEG (por ejemplo PEGilado). En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 está conjugado con PPG. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 está conjugado con POZ. En algunos casos, el polipéptido IL-15 está conjugado con PVP.
- En algunos casos, un polímero hidrosoluble comprende un poliglicerol (PG). En algunos casos, el poliglicerol es un PG hiperramificado (HPG) (por ejemplo como se describe por Imran, et al. "Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution," Biomaterials

33:9135-9147 (2012)). En otros casos, el poliglicerol es un PG lineal (LPG). En casos adicionales, el poliglicerol es un PG de funcionalidad media, un PG hiperramificado de bloque lineal (por ejemplo como se describe por Wurm et. Al., "Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glycerol)-protein conjugates," *Biomacromolecules* 13:1161-1171 (2012)), o un PG funcional de cadena lateral (por ejemplo como se describe por Li, et. al., "Synthesis of linear polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation," *Bioconjugate Chem.* 20:780-789 (2009)).

En algunos casos, un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento se conjuga con un PG, por ejemplo un HPG, un LPG, un PG de funcionalidad media, un PG hiperramificado de bloque lineal, o un PG funcional de cadena lateral.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble es una alternativa de PEG sintético degradable. Las alternativas de PEG sintético degradables ejemplares incluyen, pero sin limitación, poli[oligo(etilenglicol)metil metacrilato] (POEGMA); derivados de PEG modificados en el esqueleto generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequéricos o funcionalizados en di-extremo; derivados de PEG que comprenden comonómeros que comprenden un enlace degradable tal como poli[(etilenoxi)-co-(óxido de metilenoetileno)]P(EO-co-MEO)], acetales de ceteno cíclicos tales como 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioxepano (BMDO), 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO) y 2-metilen-4-fenil-1,3-dioxolano (MPDL) copolimerizados con OEGMA; o poli-(ε-caprolactona)-injerto-poli(óxido de etileno) (PCL-g-PEO).

En algunos casos, un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento se conjuga con una alternativa de PEG sintética degradable, tal como, por ejemplo, POEGM; derivados de PEG modificados en el esqueleto generados por polimerización de macromonómeros basados en PEG telequéricos o funcionalizados di-extremo; P(EO-co-MEO); acetales cíclicos tales como BMDO, MDO y MPDL copolimerizados con OEGMA; o PCL-g-PEO.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un poli(zwitterión). Los poli(zwitteriones) ejemplares incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de sulfobetaina) (PSBMA), poli(metacrilato de carboxibetaina) (PCBMA) y poli(2-metacriloxietil fosforilcolina) (PMPC). En algunos casos, un polipéptido IL-15 se conjuga con un poli(zwitterión) tal como PSBMA, PCBMA o PMPC.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un policarbonato. Las policarbonas ejemplares incluyen, pero sin limitación, pentafluorofenil 5-metil-2-oxo-1,3-dioxano-5-carboxilato (MTC-OC₆F₅). En algunos casos, un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento se conjuga con un policarbonato tal como MTC-OC₆F₅.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un híbrido polimérico, tal como, por ejemplo, un híbrido de policarbonato/polímero PEG, un conjugado polimérico de péptido/proteína o un polímero derivatizado que contiene hidroxilo y/o zwitteriónico (por ejemplo un polímero de PEG derivatizado que contiene hidroxilo y/o zwitteriónico). En algunos casos, un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento se conjuga con un híbrido polimérico tal como un híbrido polimérico de policarbonato/PEG, un conjugado polimérico de péptido/proteína o un polímero derivatizado que contiene hidroxilo y/o zwitteriónico (por ejemplo un polímero de PEG derivatizado que contiene hidroxilo y/o zwitteriónico).

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un polisacárido. Los polisacáridos ejemplares incluyen, pero sin limitación, dextrano, ácido polisialico (PSA), ácido hialurónico (HA), amilosa, heparina, sulfato de heparán (HS), dextrina o almidón de hidroxietilo (HES). En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con dextrano. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con PSA. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con HA. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con amilosa. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con heparina. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con HS. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con dextrina. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con HES.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un glicano. Las clases ilustrativas de glicanos incluyen glicanos enlazados a N, glicanos enlazados a O, glicolípidos, O-GlcNAc y glicosaminoglicanos. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un glicano. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con glicanos enlazados a N. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con glicanos enlazados a O. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con glicolípidos. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con O-GlcNAc. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con glicosaminoglicanos.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un polímero de polixazolina. Un polímero de polixazolina es un polímero sintético lineal, y de modo similar al PEG, comprende una baja polidispersidad. En algunas realizaciones, un polímero de polixazolina es un polímero de polioxazolina polidispersado, caracterizado con un peso de molécula promedio. En algunas realizaciones, el peso promedio de la molécula de un polímero de polixazolina incluye, por ejemplo, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10.000, 12.000, 20.000, 35.000, 40.000, 50.000, 60.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, o

500.000 Da. En algunas realizaciones, un polímero de polioxazolina comprende poli(2-metil 2-oxazolina) (PMOZ), poli(2-etil 2-oxazolina) (PEOZ) o poli(2-propil 2-oxazolina) (PPOZ). En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un polímero de polioxazolina. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con PMOZ. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con PEOZ. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con PPOZ.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende un polímero de ácido poliacrílico. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un polímero de ácido poliacrílico.

En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble comprende poliamina. La poliamina es un polímero orgánico que comprende dos o más grupos amino primarios. En algunas realizaciones, una poliamina incluye una poliamina ramificada, una poliamina lineal o poliamina cíclica. En algunas realizaciones, una poliamina es una poliamina lineal de bajo peso molecular. Las poliaminas ilustrativas incluyen putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etilendiamina, 1,3-diaminopropano, hexametildiamina, tetraetilmetildiamina y piperazina. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con poliamina. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etilendiamina, 1,3-diaminopropano, hexametildiamina, tetraetilmetildiamina o piperazina.

Lípidos

También se divulga por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En algunas realizaciones, una fracción conjugante descrita en el presente documento es un lípido. En algunos casos, el lípido es un ácido graso. En algunos casos, el ácido graso es un ácido graso saturado. En otros casos, el ácido graso es un ácido graso insaturado. Los ácidos grasos ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos que comprenden de aproximadamente 6 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunos casos, el lípido se une a una o más proteínas séricas, aumentando así la estabilidad sérica y/o la semivida sérica.

En algunas realizaciones, el lípido se conjuga con un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento. En algunos casos, el lípido es un ácido graso, por ejemplo, un ácido graso saturado o un ácido graso insaturado. En algunos casos, el ácido graso es de aproximadamente 6 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 átomos de carbono, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunos casos, el ácido graso comprende aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o 26 átomos de carbono de longitud. En algunos casos, el ácido graso comprende ácido caproico (ácido hexanoico), ácido enántico (ácido heptanoico), ácido caprílico (ácido octanoico), ácido pelargónico (ácido nonanoico), ácido cáprico (ácido decanoico), ácido undecilico (ácido undecanoico), ácido láurico (ácido dodecanoico), ácido tridecílico (ácido tridecanoico), ácido mirístico (ácido tetradecanoico), ácido pentadecílico (ácido pentadecanoico), ácido palmítico (ácido hexadecanoico), ácido margárico (ácido heptadecanoico), ácido esteárico (ácido octadecanoico), ácido nonadecílico (ácido nonadecanoico), ácido araquídico (ácido eicosanoico), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico), ácido behénico (ácido docosanoico), ácido tricosílico (ácido tricosanoico), ácido lignocerico (ácido tetracosanoico), ácido pentacosílico (ácido pentacosanoico) o ácido cerótico (ácido hexacosanoico).

En algunas realizaciones, el conjugado lipídico de IL-15 mejora la estabilidad sérica y/o la semivida sérica.

Proteínas:

También se divulga por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En algunas realizaciones, una fracción conjugante descrita en el presente documento es una proteína o un fragmento de unión de la misma. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina, transferrina o transtiretina. En algunas realizaciones, la proteína o un fragmento de unión de la misma comprende un anticuerpo, o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 que comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma tiene una semivida sérica aumentada y/o estabilidad. En algunas realizaciones, un conjugado

de IL-15 que comprende una proteína o un fragmento de unión de la misma tiene una interacción reducida de IL-15 con una o más subunidades de IL-15R/IL-2R. En casos adicionales, la proteína o un fragmento de unión de la misma bloquea la interacción de IL-15 con una o más subunidades de IL-15R/IL-2R.

5 En algunas realizaciones, la fracción conjugante es albúmina. La albúmina es una familia de proteínas globulares hidrosolubles. Se encuentra comúnmente en el plasma sanguíneo, que comprende aproximadamente el 55-60% de todas las proteínas plasmáticas. La albúmina sérica humana (HSA) es un polipéptido de 585 aminoácidos en el que la estructura terciaria se divide en tres dominios, el dominio I (residuos de aminoácidos 1-195), el dominio II (residuos de aminoácidos 196-383) y el dominio III (residuos de aminoácidos 384-585). Cada dominio comprende
10 además un sitio de unión, que puede interaccionar de manera reversible o irreversible con ligandos endógenos tales como ácidos grasos de cadena larga y media, bilirrubina o hemina, o compuestos exógenos tales como compuestos heterocíclicos o aromáticos.

15 En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con albúmina. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 se conjuga con albúmina sérica humana (HSA). En casos adicionales, el polipéptido IL-15 se conjuga con un fragmento funcional de albúmina.

20 En algunas realizaciones, la fracción conjugante es transferrina. La transferrina es un polipéptido de 679 aminoácidos que tiene un tamaño aproximado de 80 kDa y comprende dos sitios de unión de Fe^{3+} , uno en el dominio N-terminal y el otro en el dominio C-terminal. En algunas realizaciones, la transferrina humana tiene una semivida de aproximadamente 7-12 días.

25 En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con transferrina. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 se conjuga con transferrina humana. En casos adicionales, el polipéptido IL-15 se conjuga con un fragmento funcional de transferrina.

30 En algunas realizaciones, la fracción conjugante es transtiretina (TTR). La transtiretina es una proteína de transporte ubicada en el suero y el líquido cefalorraquídeo que transporta la hormona tiroidea tiroxina (T_4) y la proteína de unión a retinol unida al retinol.

35 En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con transtiretina (a través de uno de sus extremos o a través de una región bisagra interna). En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 se conjuga con un fragmento funcional de transtiretina.

40 En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un anticuerpo, o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, un anticuerpo o sus fragmentos de unión del mismo comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, fragmentos de Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃, un fragmento variable monocatenario (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, humabody, una proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), un anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, un anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado químicamente modificado del mismo.

45 En algunos casos, la fracción conjugante comprende un scFv, bis-scFv, (scFv)₂, dsFv o sdAb. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un scFv. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un bis-scFv. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un (scFv)₂. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un dsFv. En algunos casos, la fracción conjugante comprende un sdAb.

50 En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende una porción Fc de un anticuerpo, por ejemplo de IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. En algunas realizaciones, la fracción comprende una porción Fc de IgG (por ejemplo IgG₁, IgG₃₀ IgG₄).

55 En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un anticuerpo, o sus fragmentos de unión del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 está conjugado con un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, fragmentos de Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)'₃, fragmento variable monocatenario (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, humabody, una proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), un anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, un anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado químicamente modificado del mismo. En casos
60 adicionales, el polipéptido IL-15 se conjuga con una porción Fc de un anticuerpo. En casos adicionales, el polipéptido IL-15 se conjuga con una porción Fc de IgG (por ejemplo IgG₁, IgG₃₀ IgG₄).

65 En algunas realizaciones, un polipéptido de IL-15 se conjuga con un polímero hidrosoluble (por ejemplo, PEG) y un anticuerpo o fragmento de unión del mismo. En algunos casos, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo comprende un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo murino o fragmento de unión

del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo, fragmentos de Fab' monovalente, Fab₂ divalente, F(ab)₃, un fragmento variable monocatenario (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, minicuerpo, nanocuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, humabody, una proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv), un anticuerpo de dominio único (sdAb), Ig NAR, un anticuerpo de camélido o fragmento de unión del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión del mismo, o un derivado químicamente modificado del mismo. En algunos casos, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo comprende un scFv, bis-scFv, (scFv)₁, dsFv o sdAb. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un scFv. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo guía el conjugado de IL-15 a una célula diana de interés y el polímero hidrosoluble mejora la estabilidad y/o la semivida sérica.

En algunos casos, uno o más conjugados de polipéptido IL-15 - polímero hidrosoluble (por ejemplo PEG) se unen además a un anticuerpo o fragmentos de unión del mismo. En algunos casos, la relación del conjugado de IL-15 con el anticuerpo es aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1 o 12:1. En algunos casos, la relación del conjugado de IL-15 con el anticuerpo es de aproximadamente 1:1. En otros casos, la relación del conjugado de IL-15 con respecto al anticuerpo es de aproximadamente 2:1, 3:1 o 4:1. En casos adicionales, la relación del conjugado de IL-15 con el anticuerpo es aproximadamente 6:1 o superior.

En algunas realizaciones, el uno o más conjugados de polipéptido IL-15 - polímero hidrosoluble (por ejemplo PEG) están unidos directamente al anticuerpo o fragmentos de unión del mismo. En otros casos, el conjugado de IL-15 está unido indirectamente al anticuerpo o fragmentos de unión del mismo con un engarce. Los engarces ejemplares incluyen engarces homobifuncionales, engarces heterobifuncionales, engarces basados en maleimida, engarces de trazas cero, engarces autoinmolativos, espaciadores y similares.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo está unido directa o indirectamente a la porción polipeptídica de IL-15 del conjugado polipéptido IL-15 - polímero hidrosoluble (por ejemplo PEG). En tales casos, el sitio de conjugación del anticuerpo con el polipéptido IL-15 está en un sitio que no impedirá la unión del polipéptido IL-15 con el IL-15R. En casos adicionales, el sitio de conjugación del anticuerpo con el polipéptido IL-15 está en un sitio que bloquea parcialmente la unión del polipéptido IL-15 con el IL-15R. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de unión del mismo está unido directa o indirectamente a la porción de polímero hidrosoluble del conjugado de polipéptido IL-15 - polímero hidrosoluble (por ejemplo PEG).

Péptidos

También se divulga por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En algunas realizaciones, una fracción conjugante descrita en el presente documento es un péptido. En algunas realizaciones, el péptido es un péptido no estructurado. En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un péptido. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 que comprende un péptido tiene una semivida sérica y/o estabilidad aumentada. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 que comprende un péptido tiene una interacción reducida de IL-15 con una o más subunidades de IL-15R. En casos adicionales, el péptido bloquea la interacción de IL-15 con una o más subunidades de IL-15R.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un péptido XTEN™ (Amunix Operating Inc.) y la modificación se denomina XTENilación. La XTENilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un péptido XTEN™ (Amunix Operating Inc.), un péptido hidrófilo largo no estructurado que comprende un porcentaje diferente de seis aminoácidos: Ala, Glu, Gly, Ser y Thr. En algunas realizaciones, un péptido XTEN™ se selecciona en función de propiedades tales como expresión, estabilidad genética, solubilidad, resistencia a la agregación, semivida mejorada, aumento de la potencia y/o aumento de la actividad in vitro en combinación con un polipéptido de interés. En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo una interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un péptido XTEN. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un péptido XTEN.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP) y la modificación se denomina HAPilación. La HAPilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un polímero de homoaminoácido rico en glicina (HAP). En algunas realizaciones, el polímero HAP comprende un motivo de repetición (Gly₄Ser)_n y a veces es aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300 o más residuos de longitud. En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo, una interleucina IFN o TNF) se conjuga con HAP. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con HAP.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un polipéptido PAS y la modificación se denomina PASilación. La PASilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un polipéptido PAS. Un polipéptido PAS es un polipéptido hidrófilo no cargado que consiste en residuos Pro, Ala y Ser. En algunas realizaciones, la longitud de un polipéptido PAS es al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500 o 600 aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo una

interleucina, IFN o TNF) se conjuga con un polipéptido PAS. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con un polipéptido PAS.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un polipéptido similar a la elastina (ELP) y la modificación se denomina ELPilación. La ELPilación es la fusión genética de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés con un ácido nucleico que codifica un polipéptido similar a la elastina (ELP). Un ELP comprende un motivo de repetición de VPGxG en el que x es cualquier aminoácido excepto prolina. En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo una interleucina IFN o TNF) se conjuga con ELP. En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se conjuga con ELP.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante es un péptido CTP. Un péptido CTP comprende un péptido de 31 residuos de aminoácidos FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLPGPS*DTPILPQ en el que el S* indica sitios de O-glicosilación (OPKO). En algunas realizaciones, un péptido CTP está genéticamente fusionado con un polipéptido de citocinas (por ejemplo un polipéptido IL-15). En algunas realizaciones, un polipéptido de citocina (por ejemplo un polipéptido IL-15) se conjuga con un péptido CTP.

En algunas realizaciones, una citocina (por ejemplo un polipéptido IL-15) se modifica mediante glutamilación. La glutamilación (o poliglutamilación) es una modificación postraducciona reversible de glutamato, en la que el grupo γ -carboxi de glutamato forma un enlace peptídico con el grupo amino de un glutamato libre en el que el grupo α -carboxi se extiende en una cadena de poliglutamato.

En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se modifica mediante un polímero de proteína similar a la gelatina (GLK). En algunas realizaciones, el polímero GLK comprende múltiples repeticiones de Gly-Xaa-Yaa en donde Xaa e Yaa comprenden principalmente prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente. En algunas realizaciones, el polímero GLK comprende además los restos de aminoácidos Pro, Gly, Glu, Qln, Asn, Ser y Lys. En algunas realizaciones, la longitud del polímero GLK es de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150 residuos o más largo.

Fracciones de conjugación adicionales

También se divulga por ser útil para la comprensión de la invención lo siguiente.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende un biomarcador extracelular. En algunas realizaciones, el biomarcador extracelular es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, el biomarcador extracelular ejemplar comprende CD19, PSMA, B7-H3, B7-H6, CD70, CEA, CSPG4, EGFRvIII, EphA3, EpCAM, EGFR, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, Lewis-Y, mesotelina, Muc1, Muc 16, ROR1, TAG72, VEGFR2, CD11, Gr-1, CD204, CD16, CD49b, CD3, CD4, CD8 y B220. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está unida o conjugada con la IL-15. En algunas realizaciones, la fracción conjugante está genéticamente fusionada, por ejemplo, en el extremo N o el extremo C, de la IL-15.

En algunas realizaciones, la fracción conjugante comprende una molécula de una modificación postraducciona. En algunas realizaciones, los ejemplos de modificación postraducciona incluyen miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (o prenilación) (por ejemplo farnesilación o geranilgeranilación), gliptación, acilación (por ejemplo O-acilación, n-acilación, S-acilación), alquilación (por ejemplo grupos alquilo adicionales tales como grupos metilo o etilo), amidación, glucosilación, hidroxilación, yodación, adición de nucleótidos, oxidación, fosforilación, succinilación, sulfatación, glicación, carbamilación, glutamilación o desamidación. En algunas realizaciones, la IL-15 se modifica mediante una modificación postraducciona tal como miristoilación, palmitoilación, isoprenilación (o prenilación) (por ejemplo farnesilación o geranilgeranilación), gliptación, acilación (por ejemplo O-acilación, N-acilación, S-acilación), alquilación (por ejemplo grupos alquilo adicionales tales como grupos metilo o etilo), amidación, glucosilación, hidroxilación, yodación, adición de nucleótidos, oxidación, fosforilación, succinilación, sulfatación, glicación, carbamilación, glutamilación o desamidación.

Engarces

En algunas realizaciones, los grupos reactivos funcionales útiles para conjugar o unir una fracción conjugante a un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento incluyen, por ejemplo, engarces de orden cero o superior. En algunos casos, un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en el presente documento comprende un grupo reactivo funcional. En algunos casos, un engarce comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en el presente documento. En algunos casos, una fracción conjugante comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en el presente documento. En algunos casos, una fracción conjugante comprende un grupo reactivo funcional que reacciona con un engarce (opcionalmente preunido a un péptido de citocina) descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, un engarce comprende un grupo reactivo que reacciona con un aminoácido natural en un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento. En algunos casos, los engarces de orden superior comprenden engarces bifuncionales, tales como engarces homobifuncionales o engarces heterobifuncionales. Los engarces homobifuncionales incluyen, pero sin limitación,

el reactivo de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidiltartrato (DST), disulfosuccinimidiltartrato (sulfo DST), etilenglicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidilglutarato (DSG), N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC), dimetiladipimidato (DMA), dimetilpimelimidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidoheptano (BMH), compuesto que contiene haluro de arilo (DFDNB), como, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno o 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[β-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), formaldehído, glutaraldehído, éter 1,4-butanodiol diglicídico, dihidrazida de ácido adipico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α'-p-diaminodifenilo, ácido diyodo-p-xileno sulfónico, N,N'-etilen-bis(yodoacetamida) o N,N'-hexameten-bis(yodoacetamida).

En algunas realizaciones, el engarce bifuncional comprende un engarce heterobifuncional. El engarce heterobifuncional ejemplar incluye, pero sin limitación, reticulantes reactivos con amina y de sulfhidrilo, tales como N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga (LC-sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadena larga hidrosoluble (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxycarbonil-α-metil-α-(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfosuccinimidil-6-[α-metil-α-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil(4-yodoactil)aminobenzoato (sIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoactil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidil 6-((yodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-(((4-yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIACX), p-nitrofenil yodoacetato (NPiA), reticulantes reactivos con carbonilo y reactivos con sulfhidrilo como hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M₂C₂H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), reticulantes reactivos con amina y fotoreactivos, tales como ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidosalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfosuccinimidil-(4-azidosalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenziloisuccinimida (ANB-NOs), sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4(4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfosuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfosuccinimidil 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfosuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfosuccinimidil 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), reticulantes reactivos con sulfhidrilo y fotoreactivos, tales como 1-(p-azidosalicilamido)-4-(yodoacetamido)butano (sIb), N-[4-(p-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-yodoacetamida, benzofenona-4-maleimida, reticulantes reactivos con carboxilato y fotoreactivos, tales como p-azidobenzoil hidrazida (ABH), reticulantes reactivos con carboxilato y fotoreactivos, tales como 4-(p-azidosalicilamido)butilamina (sBA) y reticulantes reactivos con arginina y fotoreactivos, tales como p-azidofenil glioxal (APG).

En algunos casos, el grupo funcional reactivo comprende un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en una fracción de unión (por ejemplo en una fracción conjugante o en IL-15). Los grupos electrófilos ilustrativos incluyen grupos carbonilo, tales como aldehído, cetona, ácido carboxílico, éster, amida, enona, haluro de acilo o anhídrido de ácido. En algunas realizaciones, el grupo funcional reactivo es aldehído. Los grupos nucleófilos ejemplares incluyen hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En algunas realizaciones, un aminoácido no natural incorporado en una interleucina descrita en el presente documento comprende un grupo electrófilo.

En algunas realizaciones, el engarce es un engarce escindible. En algunas realizaciones, el engarce escindible es un engarce dipeptídico. En algunas realizaciones, el engarce dipeptídico es valina-citrulina (Val-Cit), fenilalanina-lisina (Phe-Lys), valina-alanina (Val-Ala) y valina-lisina (Val-Lys). En algunas realizaciones, el engarce dipeptídico es valina-citrulina.

En algunas realizaciones, el engarce es un engarce peptídico que comprende, por ejemplo al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos. En algunos casos, el engarce peptídico comprende como máximo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o menos aminoácidos. En casos adicionales, el engarce peptídico comprende aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el engarce comprende una fracción de engarce autoinmolativa. En algunas realizaciones, la fracción de engarce autoinmolativa comprende alcohol p-aminobencílico (PAB), p-aminobencioxycarbonilo (PABC) o derivados o análogos de los mismos. En algunas realizaciones, el engarce comprende una fracción de

engarce dipeptídica y una fracción de engarce autoinmolativa. En algunas realizaciones, la fracción de engarce autoinmolativa es tal como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 9089614 y la Solicitud de la OMPI n.º WO2015038426.

5 En algunas realizaciones, el engarce escindible es glucurónido. En algunas realizaciones, el engarce escindible es un engarce escindible por ácido. En algunas realizaciones, el engarce escindible en ácido es hidrazina. En algunas realizaciones, el engarce escindible es un engarce reducible.

10 En algunas realizaciones, el engarce comprende un grupo maleimida. En algunos casos, el grupo maleimida también se denomina espaciador maleimida. En algunos casos, el grupo maleimida comprende además un ácido caproico, que forma maleimidocaproilo (mc). En algunos casos, el engarce comprende maleimidocaproilo (mc). En algunos casos, el engarce es maleimidocaproilo (mc). En otros casos, el grupo maleimida comprende un grupo maleimidometilo, tal como succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC) o sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC) descritos anteriormente.

15 En algunas realizaciones, el grupo maleimida es una maleimida autoestabilizante. En algunos casos, la maleimida autoestabilizante utiliza ácido diaminopropiónico (DPR) para incorporar un grupo amino básico adyacente a la maleimida para proporcionar catálisis intramolecular de la hidrólisis del anillo de tiosuccinimida, evitando de este modo que la maleimida se someta a una reacción de eliminación a través de una reacción retro-Michael. En algunos casos, la maleimida autoestabilizante es un grupo maleimida descrito en Lyon, et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat. Biotechnol. 32(10): 1059-1062 (2014). En algunos casos, el engarce comprende una maleimida autoestabilizante. En algunos casos, el engarce es una maleimida autoestabilizante.

25 **Química de conjugación**

Se utilizan diversas reacciones de conjugación para conjugar engarces, fracciones de conjugación y aminoácidos no naturales incorporados en polipéptidos IL-15 descritos en el presente documento. Tales reacciones de conjugación a menudo son compatibles con condiciones acuosas, tales como reacciones "bioortogonales". En algunas realizaciones, las reacciones de conjugación están mediadas por reactivos químicos tales como catalizadores, grupos químicos ligeros o reactivos que se encuentran en engarces, fracciones de conjugación o aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, las reacciones de conjugación están mediadas por enzimas. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación utilizada en el presente documento se describe en Gong, Y., Pan, L. Tett. Lett. 2015, 56, 2123. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación utilizada en el presente documento se describe en Chen, X.; Wu. Y-W. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 5417.

40 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona o aldehído con un nucleófilo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona con un grupo aminoxi para formar una oxima. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una cetona con un grupo arilo o heteroarilo amina para formar una imina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de un aldehído con un grupo arilo o heteroarilo amina para formar una imina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un polipéptido IL-15 que comprende un engarce o una fracción de conjugación unida a través de una oxima. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción de Pictet-Spengler de un aldehído o cetona con un nucleófilo de triptamina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción hidrazino-Pictet-Spengler. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una ligadura Pictet-Spengler.

50 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida y una fosfina (ligadura de Staudinger). En algunas realizaciones, la fosfina es una aril fosfina. En algunas realizaciones, la aril fosfina comprende un grupo orto éster. En algunas realizaciones, la fosfina comprende la estructura de 2-(difenilfosfaneil)benzoato de metilo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un polipéptido IL-15 que comprende un engarce o una fracción de conjugación unida a través de una arilamida. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un polipéptido IL-15 que comprende un engarce o una fracción de conjugación unida a través de una amida.

60 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. En algunas realizaciones, la reacción de cicloadición 1,3-dipolar comprende la reacción de una azida y una fosfina (reacción "click"). En algunas realizaciones, la reacción de conjugación es catalizada por cobre. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado un polipéptido IL-15 que comprende un engarce o una fracción de conjugación unida a través de un triazol. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida con una olefina con impedimento estérico. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida con un alquilo con impedimento estérico. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación

descrita en el presente documento comprende la reacción de una azida con un cicloalquilo, por ejemplo, OCT, DIFO, DIFBO, DIBO, BARAC, TMTH u otro cicloalquilo con impedimento estérico, cuyas estructuras se muestran en Gong, Y., Pan, L. Tett. Lett. 2015, 56, 2123. En algunas realizaciones, una reacción de cicloadición 1,3-dipolar se cataliza mediante luz ("fotoclick"). En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un grupo alilo terminal con un tetrazol y luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un grupo alquinilo terminal con un tetrazol y luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un aminoácido de O-alilo con una tetrazina y luz. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de O-alil tirosina con una tetrazina y luz.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de cicloadición de demanda de electrones inversa que comprende un dieno y un dienófilo. En algunas realizaciones, el dieno comprende una tetrazina. En algunas realizaciones, el dienófilo comprende un alqueno. En algunas realizaciones, el dienófilo comprende un alquino. En algunas realizaciones, el alquino es un alquino con impedimento estérico. En algunas realizaciones, el alqueno es un dieno con impedimento estérico. En algunas realizaciones, el alquino es una trans-ciclooctina. En algunas realizaciones, el alquino es cicloocteno. En algunas realizaciones, el alqueno es un ciclopropeno. En algunas realizaciones, el alqueno es fluorociclopropeno. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento da como resultado la formación de un polipéptido IL-15 unido a un engarce o una fracción de conjugación a través de un heterociclo de anillo de 6 miembros que comprende dos átomos de nitrógeno en el anillo.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de metátesis de olefina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un alqueno y un alquilo con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de dos alquenos con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de dos alquinos con un catalizador de rutenio. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un alqueno o alquilo con un catalizador de rutenio y un aminoácido que comprende un grupo alilo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un alqueno o alquilo con un catalizador de rutenio y un aminoácido que comprende un sulfuro de alilo o seleniuro. En algunas realizaciones, un catalizador de rutenio es un catalizador de Hoveda-Grubbs de 2ª generación. En algunas realizaciones, una reacción de metátesis de olefina comprende la reacción de uno o más alquenos o alquinos con impedimento estérico.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de cicloadición (4+2+ con un alqueno).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de acoplamiento cruzado. En algunas realizaciones, las reacciones de acoplamiento cruzado comprenden catalizadores de metales de transición, tales como iridio, oro, rutenio, rodio, paladio, níquel, platino u otro catalizador de metal de transición y uno o más ligandos. En algunas realizaciones, los catalizadores de metales de transición son hidrosolubles. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un haluro de arilo (o triflato o tosilato), un ácido borónico de arilo o alqueno y un catalizador de paladio. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de acoplamiento cruzado de Sonogashira. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un haluro de arilo (o triflato o tosilato), un alquino y un catalizador de paladio. En algunas realizaciones, las reacciones de acoplamiento cruzado dan como resultado la unión de un engarce o una fracción conjugante a un polipéptido IL-15 a través de un enlace carbono-carbono.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de desprotección o "desencapsulamiento" de un grupo reactivo antes de la conjugación. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende desencapsulamiento de un grupo reactivo con luz, seguido de una reacción de conjugación. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con una fracción aralquilo que comprende uno o más grupos nitro. En algunas realizaciones, el desencapsulamiento de un grupo reactivo da como resultado una amina libre, un sulfuro u otro grupo reactivo. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende desencapsulamiento de un grupo reactivo con un catalizador de metal de transición, seguido de una reacción de conjugación. En algunas realizaciones, el catalizador de metal de transición comprende paladio y uno o más ligandos. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con una fracción alilo. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un carbamato alílico. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con una fracción propargílica. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está

protegido con un carbamato de propargilo. En algunas realizaciones, un grupo reactivo está protegido con un dienófilo, en donde la exposición a un dieno (tal como una tetrazina) da como resultado la desprotección del grupo reactivo.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción dirigida por ligando, en donde un ligando (opcionalmente) unido a un grupo reactivo) facilita el sitio de conjugación entre el grupo reactivo y el polipéptido IL-15. En algunas realizaciones, el ligando se escinde durante o después de la reacción del polipéptido IL-15 con el grupo reactivo. En algunas realizaciones, el sitio de conjugación del polipéptido IL-15 es un aminoácido natural. En algunas realizaciones, el sitio de conjugación del polipéptido IL-15 es una lisina, cisteína o serina. En algunas realizaciones, el sitio de conjugación del polipéptido IL-15 es un aminoácido no natural descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo arilo o heteroarilo pobre en electrones. En algunas realizaciones, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo alquilo pobre en electrones que es desplazado por el polipéptido IL-15. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la reacción de un agente de captura radical con una especie radical. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende una reacción de adición de radicales oxidativos. En algunas realizaciones, un agente de captura radical es una arilamina. En algunas realizaciones, una especie radical es un radical tirosilo. En algunas realizaciones, las especies radicales son generadas por un catalizador de rutenio (tal como [Ru(bpy)₃]) y luz.

Las reacciones enzimáticas se utilizan opcionalmente para las reacciones de conjugación descritas en el presente documento. Las conjugaciones enzimáticas ilustrativas incluyen conjugación mediada por SortA, una conjugación mediada por TGs o una conjugación mediada por FGE. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación descrita en el presente documento comprende la ligadura de proteínas nativas (NPL) de un grupo 1-amino-2-tio terminal con un tiéster para formar un enlace amida.

En el presente documento se describen varias reacciones de conjugación para reaccionar una fracción de engarce o conjugante con un polipéptido IL-15, en donde la reacción se produce con un aminoácido natural ("canónico") en el polipéptido IL-15. En algunas realizaciones, el aminoácido natural se encuentra en una posición de conjugación que se encuentra en una secuencia de tipo salvaje, o alternativamente la posición se ha mutado. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la formación de un enlace disulfuro en un residuo de IL-15. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una reacción de adición de 1,4 Michael de una cisteína o lisina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una ligadura de cianobenzotiazol de una IL-15. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reticulación con una fracción de acetona, tal como 1,3-dicloro-2-propionona. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende una adición de 1,4 Michael a una deshidroalanina, formada por reacción de cisteína con O-mesitilsulfonilhidroxilamina. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de una tirosina con una triazolinodiona (TAD) o derivado de TAD. En algunas realizaciones, una reacción de conjugación comprende la reacción de un triptófano con un carbenoide de rodio.

Las referencias a los métodos de tratamiento por terapia o cirugía o diagnóstico *in vivo* deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en esos métodos.

Métodos de uso

Enfermedades o afecciones proliferativas

En algunas realizaciones, en el presente documento se describe un método de tratamiento de una enfermedad o afección proliferativa en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 comprende un polipéptido IL-15 aislado y purificado y una fracción conjugante, en donde el conjugado de IL-15 tiene una afinidad disminuida a una subunidad α del receptor de IL-15 (IL-15R α) con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 comprende un polipéptido IL-15 aislado y purificado; y una fracción conjugante que se une al polipéptido IL-15 aislado y purificado en una posición de aminoácido seleccionada entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, T27, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, A39, K41, L44, L45, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, 1111, N112, T113, y S114, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 comprende un polipéptido IL-15 aislado y purificado; y una fracción conjugante que se une al polipéptido IL-15 aislado y purificado en una posición de aminoácido seleccionada entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, 121, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87,

C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, 1111, N112, T113, y S114.

5 En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 interacciona preferentemente con las subunidades IL-15R β e IL-15R $\beta\gamma$ para formar un complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$. En algunas realizaciones, el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula y/o mejora la expansión de células Teff (por ejemplo células Teff CD8+) y/o células NK. En casos adicionales, la expansión de las células de Teff sesga la proporción de TeffTreg hacia la población de Teff.

10 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección proliferativa es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra a un sujeto que lo necesita, para tratar un tumor sólido. En tales casos, el sujeto tiene un cáncer de vejiga, un cáncer de hueso, un cáncer cerebral, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer de esófago, un cáncer ocular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un melanoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas o un cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de mama. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de esófago. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de riñón. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un melanoma. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer metastásico. En casos adicionales, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer con recaída o resistente al tratamiento.

30 En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra a un sujeto que lo necesita, para tratar una neoplasia maligna hematológica. En algunas realizaciones, el sujeto tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma extraganglionar de células B de zona marginal, linfoma ganglionar de células B de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grado no de Burkitt, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma esplénico de zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de efusión o granulomatosis linfomatoide. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de CLL. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de SLL. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de FL. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de DLBCL. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de MCL. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenstrom. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento del mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento del linfoma de Burkitt. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica metastásica. En casos adicionales, el conjugado de IL-15 se administra a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica con recaída o resistente al tratamiento.

55 En algunas realizaciones, además se administra al sujeto un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra simultáneamente con un conjugado de IL-15. En otros casos, el agente terapéutico adicional y el conjugado de IL-15 se administran de forma secuencial, por ejemplo, el conjugado de IL-15 se administra antes del agente terapéutico adicional o que el conjugado de IL-15 se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

60 En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional comprende un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, una terapia dirigida, radioterapia o una combinación de los mismos. Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes tales como altretamina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalán, oxalapatino, temozolomida o tiotepa; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; antraciclinas tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina o idarrubicina; inhibidores de la topoisomerasa I tales como topotecán o irinotecán (CPT-11); inhibidores de la topoisomerasa II tales como etopósido (VP-16), tenipósido o mitoxantrona;

inhibidores mitóticos tales como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina; o corticoesteroides tales como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

En algunos casos, el agente terapéutico adicional comprende una terapia de primera línea. Como se usa en el presente documento, "terapia de primera línea" comprende un tratamiento primario para un sujeto con cáncer. En algunos casos, el cáncer es un cáncer primario o local. En otros casos, el cáncer es un cáncer metastásico o recurrente. En algunos casos, la terapia de primera línea comprende quimioterapia. En otros casos, el tratamiento de primera línea comprende inmunoterapia, terapia dirigida o radioterapia. Un artesano experto comprendería fácilmente que diferentes tratamientos de primera línea pueden ser aplicables a diferentes tipos de cánceres.

En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 se administra con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agente alquilante tal como altretamina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, etc. cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalán, oxalapatino, temozolomida o tiotepa; un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; una antraciclina tal como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina o idarrubicina; un inhibidor de la topoisomerasa I tal como topotecán o irinotecán (CPT-11); un inhibidor de la topoisomerasa II tal como etósido (VP-16), tenipósido o mitoxantrona; un inhibidor mitótico tal como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina; o un corticoesteroide tal como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra con un inhibidor de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP). Los inhibidores de PARP ilustrativos incluyen, pero sin limitación, olaparib (AZD-2281 Lynparza®, from Astra Zeneca), rucaparib (PF-01367338, Rubraca®, de Clovis Oncology), niraparib (MK-4827, Zejula®, de Tesaro), talazoparib (BMN-673, de BioMarin Pharmaceutical Inc.), veliparib (ABT-888, from AbbVie), CK-102 (anteriormente CEP 9722, de Teva Pharmaceutical Industries Ltd.), E7016 (de Eisai), iniparib (BSI 201, de Sanofi) y pamiparib (BGB-290, de BeiGene). En algunos casos, el conjugado de IL-15 se administra en combinación con un inhibidor de PARP tal como olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib, veliparib, CK-102, E7016, iniparib o pamiparib.

En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra con un inhibidor de tirosina quinasa (TKI). Los TKI ejemplares incluyen, pero sin limitación, afatinib, alectinib, axitinib, bosutinib, cabozantinib, ceritinib, cobimetinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, nintedanib, osimertinib, pazopanib, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, tofacitinib y vandetanib.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra con un modulador de puntos de control inmunitario. Los moduladores de puntos de control ejemplares incluyen:

Moduladores PD-L1 tales como MPDL3280A de Genentech (RG7446), Avelumab (Bavencio) de Merck/Pfizer, durvalumab (Imfinzi) de AstraZeneca, anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 de ratón Clon 10F.9G2 (Cat # BE0101) de BioXcell, anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 MDX-1105 (BMS-936559), BMS-935559 y BMS-986192 de Bristol-Meyer's Squibb, MSB0010718C, clon anti ratón-PD-L1 29E.2A3, CX-072 de XytomX Therapeutics, FAZ053 de Novartis Pharmaceuticals, KN035 de 3D Medicine, LY3300054 de Eli Lilly y AstraZeneca's MEDI4736;

Moduladores PD-L2 tales como AMP-224 (Amplimmune) de GlaxoSmithKline y rHlgM12B7;

Moduladores PD-1 tales como el clon de anticuerpo anti-PD-1 de ratón J43 (Cat # BE0033-2) de BioXcell, clon de anticuerpo anti-PD-1 de ratón RMP1-14 (Cat # BE0146) de BioXcell, clon de anticuerpo anti-PD-1 de ratón EH12 anticuerpo MK-3475 anti-ratón PD-1 de Merck (Keytruda, pembrolizumab, lambrolizumab), anticuerpo anti-PD-1 de AnaptysBio conocido como ANB011, anticuerpo MDX-1 106 (ONO-4538), anticuerpo humano IgG4 monoclonal de Bristol-Myers Squibb nivolumab (Opdivo®, BMS-936558, MDX1106), AMP-514 y AMP-224 de AstraZeneca, sintilimab (IBI-308) de Eli Lilly/Innovent Biologics, AGEN 2034 de Agenus, BGB-A317 de BeiGene, BI-754091 de Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, CBT-501 (genolimzumab) de CBT Pharmaceuticals, INCSR1210 devIncyte, JNJ-63723283 de Janssen Research & Development, MEDI0680 de MedImmune, PDR001 de Novartis Pharmaceuticals, PF-06801591 de Pfizer, REGN2810 de Regeneron Pharmaceuticals y Pidilizumab (CT-011) de CureTech Ltd;

Moduladores de CTLA-4 tales como anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab de Bristol Meyers Squibb (también conocido como Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 y MDX-101), clon de anticuerpo anti-CTLA4 9H10 de Millipore, tremelimumab de Pfizer (CP-675,206, ticilimumab), AGEN 1884 de Agenus y clon de anticuerpo anti-CTLA4 BNI3 de Abcam;

Moduladores LAG3 tales como el clon de anticuerpo anti-lag-3 eBioC9B7W (C9B7W) de eBioscience, anticuerpo anti-Lag3 LS-B2237 de Life Span Biosciences, IMP701 y LAG525 de Novartis Pharmaceuticals,

IMP321 (ImmuFact) de Immuteq, anticuerpo anti-Lag3 BMS-986016, BMS-986016 de Bristol-Myers Squibb, REGN3767 de Regeneron Pharmaceuticals y el anticuerpo quimérico LAG-3 A9H12;

Moduladores B7-H3 tales como MGA271;

Moduladores KIR tales como Lirilumab (IPH2101) de Bristol-Myers Squibb;

Moduladores CD137 tales como urelumab (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (anti-4-1BB, PF-2566, Pfizer), o XmAb-5592 (Xencor);

Moduladores PS tales como Bavituximab;

Moduladores OX40 tales como BMS-986178 de Bristol-Myers Squibb, GSK3174998 de GlaxoSmithKline, INCAGN1949 de Agenus, MEDI0562 de MedImmune, PF-04518600 de Pfizer o RG7888 de Genentech;

Moduladores de GITR tales como GWN323 de Novartis Pharmaceuticals, INCAGN1876 de Agenus o TRX518 de Leap Therapeutics;

Moduladores TIM3 tales como MBG453 de Novartis Pharmaceuticals o TSR-042 de TESARO;

y moduladores tales como un anticuerpo o fragmentos (por ejemplo un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico) del mismo, moléculas de ARNi o moléculas pequeñas de CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, ICOS, BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 o SLAM.

En algunos casos, el conjugado de IL-15 se administra junto con pembrolizumab, nivolumab, tremelimumab o ipilimumab.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra con un anticuerpo tal como alemtuzumab, trastuzumab, ibritumomab tiuxetán, brentuximab vedotina, ado-trastuzumab emtansina, o blinatumomab.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 se administra con un agente terapéutico adicional seleccionado de un anticuerpo anti-VEGFR. Los anticuerpos anti-VEGFR ejemplares incluyen, pero sin limitación, bevacizumab o ramucirumab. En algunos casos, el conjugado de IL-15 mejora el efecto de ADCC del agente terapéutico adicional.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 se administra con un agente terapéutico adicional seleccionado de cetuximab, imgatuzumab, matuzumab (EMD 72000), tomuzotuximab o panitumumab. En algunos casos, el conjugado de IL-15 mejora el efecto de ADCC del agente terapéutico adicional.

En algunos casos, un conjugado de IL-15 se administra con un agente terapéutico adicional seleccionado de una citocina adicional (por ejemplo ya sea una citocina nativa o una citocina modificada por ingeniería tal como una citocina PEGilada y/o de fusión). En algunos casos, la citocina adicional aumenta y/o sinergiza la expansión y/o proliferación de células efectoras T. En algunos casos, la citocina adicional comprende IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21 o TNF α . En algunos casos, la citocina adicional es IL-2. En algunos casos, la citocina adicional es IL-21. En algunos casos, la citocina adicional es IL-10. En algunos casos, la citocina adicional es TNF α .

En algunos casos, un conjugado de IL-15 se administra con un agente terapéutico adicional seleccionado de un agonista del receptor. En algunos casos, el agonista del receptor comprende un ligando del receptor tipo Toll (TLR). En algunos casos, el ligando de TLR comprende TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 o TLR9. En algunos casos, el ligando TLR comprende un ligando sintético tal como, por ejemplo, Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poli I:C, poli A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA o flagelina. En algunos casos, el conjugado de IL-21 se administra con uno o más agonistas de TLR seleccionados de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9. En algunos casos, el conjugado de IL-15 se administra con uno o más agonistas de TLR seleccionados de Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poli I:C, poli A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA y flagelina.

En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se utiliza junto con una terapia de transferencia de linfocitos T adoptivos (ACT). En una realización, ACT implica la identificación de linfocitos T autólogos en un sujeto con, por ejemplo, actividad antitumoral, expansión de los linfocitos T autólogos *in vitro* y posterior reinfusión de los linfocitos T expandidos en el sujeto. En otra realización, ACT comprende el uso de linfocitos T alogénicos con, por ejemplo, actividad antitumoral, expansión de los linfocitos T *in vitro* e infusión subsiguiente de los linfocitos T alogénicos expandidos en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se utiliza junto con un linfocitos T autólogo como parte de una terapia ACT. En otros casos, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se utiliza junto con un linfocitos T alogénicos como parte de una terapia ACT. En algunas realizaciones, el conjugado de IL-15 se

administra simultáneamente con la terapia ACT a un sujeto que lo necesite. En otros casos, el conjugado de IL-15 se administra secuencialmente con la terapia ACT a un sujeto que lo necesite.

5 En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se utiliza para una activación y/o expansión ex vivo de una transferencia de células T autóloga y/o alogénica. En tales casos, el conjugado de IL-15 se utiliza para activar y/o expandir una muestra que comprende células T autólogas y/o alogénicas y el conjugado de IL-15 se elimina opcionalmente de la muestra antes de administrar la muestra a un sujeto que lo necesite.

10 En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 descrito en el presente documento se administra con una vacuna. En algunos casos, se utiliza un conjugado de IL-21 junto con un virus oncolítico. En tales casos, el conjugado de IL-21 actúa como agente estimulador para modular la respuesta inmunitaria. En algunos casos, el conjugado de IL-21 se usa con un virus oncolítico como parte de una terapia adyuvante. Los virus oncolíticos ejemplares incluyen T-Vec (Amgen), G47Δ (Todo et al.), JX-594 (Sillajen), CG0070 (Cold Genesys) y Reolisina (Oncolytics Biotech). En
15 En algunos casos, el conjugado de IL-21 se utiliza junto con un virus oncolítico tal como T-Vec, G47Δ, JX-594, CG0070 o Reolisina.

En algunas realizaciones, un conjugado de IL-15 se administra junto con una radioterapia.

20 **Métodos de expansión de la población celular**

En algunas realizaciones, en el presente documento se describen adicionalmente métodos de expansión de poblaciones de linfocitos, por ejemplo, células T efectoras (Teff), células T de memoria (Tmem) y/o poblaciones de células asesinas naturales (NK). En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula con
25 un conjugado de citocinas descrito en el presente documento y hacer interaccionar la citocina con un receptor de citocinas para formar un complejo, en donde el complejo estimula la expansión de una población de linfocitos distinta.

En algunas realizaciones, el método de expansión de células T efectoras (Teff), células T de memoria (Tmem) y/o
30 poblaciones de células asesinas naturales (NK), que comprende: (A) poner en contacto una célula con un polipéptido IL-15 modificado o un conjugado de IL-15; y hacer interaccionar la IL-15 con las subunidades IL-15Rβ e IL-15Rγ para formar un complejo IL-15/IL-15Rβ; en donde el conjugado de IL-15 tiene una afinidad disminuida con la subunidad IL-15Rα, y en donde el complejo IL-15/IL-15Rβ estimula la expansión de células Teff, Tmem y NK. Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, el polipéptido IL-15 modificado
35 comprende al menos un aminoácido no natural modificado postraduccionalmente en una posición de residuo seleccionada entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, T27, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, A39, K41, L44, L45, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, 1111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones de residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, 1111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, 167, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, y F110. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97, y E98. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69, y N72. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V3, 16, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, 1111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90, y E93. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre Y26, E46, V49, E53 y L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, 1111, N112, T113 y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N4, S7, K11 y D61. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre L25, E53, N77 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre L25 y E53. En algunas
60 realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46 y Y26.
65 En algunas realizaciones, la posición del residuo es E46. En algunas realizaciones, la posición del residuo es L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo es Y26. En algunas realizaciones, la posición del residuo es V49.

En algunas realizaciones, la posición del residuo es E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo es T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo es N77. En algunas realizaciones, la posición del residuo es S83.

Los métodos de expansión de células T efectoras (Teff), células T de memoria (Tmem) y/o poblaciones de células asesinas naturales (NK) como se describen en el presente documento, en algunas realizaciones, comprenden poner en contacto una célula con un conjugado de IL-15. Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, los conjugados de interleucina 15 (IL-15) comprenden: Un polipéptido IL-15 aislado y purificado; y una fracción conjugante que se une al polipéptido IL-15 aislado y purificado en una posición de aminoácido seleccionada entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, T27, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, A39, K41, L44, L45, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, 1111, N112, T113, y S114, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones expuestas en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N1, W2, V3, N4, 16, S7, D8, K10, K11, E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, D22, A23, T24, L25, Y26, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, E46, Q48, V49, S51, L52, E53, S54, G55, D56, A57, S58, H60, D61, T62, V63, E64, N65, 167, 168, L69, N71, N72, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, E89, E90, L91, E92, E93, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, S102, V104, H105, Q108, M109, F110, I111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E13, D14, L15, Q17, S18, M19, H20, I21, S34, C35, K36, V37, T38, K41, L44, S51, L52, S54, G55, D56, A57, S58, H60, V63, 167, N71, S73, L74, S75, S76, N77, G78, N79, V80, T81, E82, S83, G84, C85, K86, E87, C88, L91, E92, K94, N95, 196, K97, E98, L100, Q101, y F110. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97, y E98. algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, 168, L69, y N72. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V3, 16, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113, y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90, y E93. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre Y26, E46, V49, E53 y L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, 1111, N112, T113 y S114. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre N4, S7, K11 y D61. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre L25, E53, N77 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre L25 y E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 y S83. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre Y26, V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre V49, E53 y T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo se selecciona entre E46 e Y26. En algunas realizaciones, la posición del residuo es E46. En algunas realizaciones, la posición del residuo es L25. En algunas realizaciones, la posición del residuo es Y26. En algunas realizaciones, la posición del residuo es V49. En algunas realizaciones, la posición del residuo es E53. En algunas realizaciones, la posición del residuo es T24. En algunas realizaciones, la posición del residuo es N77. En algunas realizaciones, la posición del residuo es S83.

Producción de polipéptidos IL-15

En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 descritos en el presente documento, que contienen una mutación de aminoácidos natural o una mutación de aminoácidos no natural, se generan de manera recombinante o se sintetizan químicamente. En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-15 descritos en el presente documento se generan de manera recombinante, por ejemplo, ya sea por un sistema celular hospedador o en un sistema libre de células.

En algunas realizaciones, los polipéptidos IL-15 se generan de manera recombinante a través de un sistema celular hospedador. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariota (por ejemplo célula de mamífero, células de insecto, células de levadura o célula vegetal), una célula procariota (por ejemplo bacteria gram-positiva o una bacteria gram-negativa) o una célula arquea. En algunas realizaciones, una célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora de mamífero. En algunos casos, una célula hospedadora de mamífero es una línea celular estable, o una línea celular que ha incorporado un material genético de interés en su propio genoma y tiene la capacidad de expresar el producto del material genético después de muchas generaciones de división celular. En otros casos, una célula hospedadora de mamífero es una línea celular transitoria o una línea celular que no ha incorporado un material genético de interés en su propio genoma y no tiene la capacidad de expresar el producto del material genético después de muchas generaciones de división celular.

Las células hospedadoras de mamífero ilustrativas incluyen la línea celular 293T, la línea celular 293A, la línea celular 293FT, células 293F, células 293 H, células A549, células MDCK, células CHO DG44, células CHO-S, células CHO-K1, células Expi293F™, la línea celular Flp-In™ T-REx™ 293, la línea celular Flp-In™-293, la línea celular Flp-In™-3T3, la línea celular Flp-In™-BHK, la línea celular Flp-In™-CHO, la línea celular Flp-In™-CV-1, la

línea celular Flp-In™-Jurkat, células FreeStyle™ 293-F, células FreeStyle™ CHO-S, la línea celular GripTite™ 293 MSR, la línea celular GS-CHO, células HepaRG™, la línea celular T-REx™ Jurkat, células Per.C6, la línea celular T-REx™-293, la línea celular T-REx™-CHO y la línea celular T-REx™-HeLa.

5 En algunas realizaciones, una célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora de insecto. Las células hospedadoras de insecto ejemplares incluyen células S2 de *Drosophila*, células Sf9, células Sf21, células High Five™ y células expresSF+®.

10 En algunas realizaciones, una célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora de levadura. Las células hospedadoras de levadura ejemplares incluyen cepas de levadura *Pichiapastoris* tales como GS115, KM71H, SMD1168, SMD1168H y X-33 y cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tales como INVSc1.

15 En algunas realizaciones, una célula hospedadora eucariota es una célula hospedadora vegetal. En algunas realizaciones, las células vegetales comprenden una célula de algas. Las líneas celulares vegetales ilustrativas incluyen cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 137c o *Synechococcus elongatus* PPC 7942.

20 En algunas realizaciones, una célula hospedadora es una célula hospedadora procariota. Las células hospedadoras procariotas ejemplares incluyen BL21, Mach1™, DH10B™, TOP10, DH5α, DH10Bac™, OmniMax™, MegaX™, DH12S™, INV110, TOP10F', INVαF, TOP10/P3, ccdB Survival, PIR1, PIR2, Stb12™, Stb13™ o Stb14™.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de ácido polinucleico o los vectores adecuados para la producción de un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento incluyen cualquier vector adecuado derivado de fuentes eucariotas o procariotas. Las moléculas de ácido polinucleico o los vectores ejemplares incluyen vectores de bacterias (por ejemplo *E. coli*), insectos, levadura (por ejemplo *Pichia pastoris*), algas o fuente de mamíferos. Los vectores bacterianos incluyen, por ejemplo, series de vectores pACYC177, pASK75, pBAD, series de vectores pBADM, series de vectores pET, series de vectores pETM, series de vectores pGEX, series de vectores pHAT, pHAT2, pMal-c2, pMal-p2, pQE, series pRSET A, pRSET B, pRSET C, pTrcHis2, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12c, pTAC-MAT-1, pFLAG CTC o pTAC-MAT-2.

30 Los vectores de insecto incluyen, por ejemplo, pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBact M30b, pFastBac, M30c, pVL1392, pVL1393, pVL1393 M10, pVL1393 M11, pVL1393 M12, FLAG vectores tales como pPolh-FLAG1 o pPolh-MAT 2, o vectores MAT tales como pPolh-MAT1 o pPolh-MAT2.

35 Los vectores de levadura incluyen, por ejemplo, el vector Gateway® pDEST™ 14, el vector Gateway® pDEST™ 15, el vector Gateway® pDEST™ 17, el vector Gateway® pDEST™ 24, el vector Gateway® pYES-DEST52, el vector de destino pBAD-DEST49 Gateway®, el vector pAO815 *Pichia*, el vector pFLD1 *Pichi pastoris*, el vector pGAPZA, B, & C *Pichia pastoris*, el vector pPIC3.5K *Pichia*, el vector pPIC6 A, B, & C *Pichia*, el vector pPIC9K *Pichia*, el vector pTEF1/Zeo, el vector de levadura pYES2, el vector de levadura pYES2/CT, el vector de levadura pYES2/NT A, B, & C o el vector de levadura pYES3/CT.

Los vectores de algas incluyen, por ejemplo, el vector pChlamy-4 o el vector MCS.

45 Los vectores de mamífero incluyen, por ejemplo, vectores de expresión transitorios o vectores de expresión estables. Los vectores de expresión transitorios de mamíferos ilustrativos incluyen p3xFLAG-CMV 8, pFLAG-Myc-CMV 19, pFLAG-Myc-CMV 23, pFLAG-CMV 2, pFLAG-CMV 6a,b,c, pFLAG-CMV 5.1, pFLAG-CMV 5a,b,c, p3xFLAG-CMV 7.1, pFLAG-CMV 20, p3xFLAG-Myc-CMV 24, pCMV-FLAG-MAT1, pCMV-FLAG-MAT2, pBICEP-CMV 3 o pBICEP-CMV 4. Los vectores de expresión estable de mamíferos ilustrativos incluyen pFLAG-CMV 3, p3xFLAG-CMV 9, p3xFLAG-CMV 13, pFLAG-Myc-CMV 21, p3xFLAG-Myc-CMV 25, pFLAG-CMV 4, p3xFLAG-CMV 10, p3xFLAG-CMV 14, pFLAG-Myc-CMV 22, p3xFLAG-Myc-CMV 26, pBICEP-CMV 1 o pBICEP-CMV 2.

50 En algunas realizaciones, se utiliza un sistema libre de células para la producción de un polipéptido IL-15 descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, un sistema libre de células comprende una mezcla de componentes citoplasmáticos y/o nucleares de una célula (por ejemplo compuesta por componentes recombinantes totalmente purificados o componentes parcialmente purificados) y es adecuado para la síntesis de ácido nucleico in vitro. En algunos casos, un sistema libre de células utiliza componentes celulares procariotas. En otros casos, un sistema libre de células utiliza componentes celulares eucariotas. La síntesis de ácido nucleico se obtiene en un sistema libre de células basado, por ejemplo, en la célula de *Drosophila*, el huevo de *Xenopus*, células *Archaea* o células HeLa. Los sistemas libres de células ilustrativos incluyen el sistema de extracto S30 de *E. coli*, el sistema T7 S30 de *E. coli* o PURExpress®, XpressCF y XpressCF+.

60 Los sistemas de traducción libres de células comprenden diversos componentes tales como plásmidos, ARNm, ADN, ARNt, sintetasas, factores de liberación, ribosomas, proteínas chaperonas, factores de inicio de la traducción y elongación, aminoácidos naturales y/o no naturales y/u otros componentes utilizados para la expresión de proteínas. Dichos componentes se modifican opcionalmente para mejorar los rendimientos, aumentar la tasa de síntesis, aumentar la fidelidad del producto proteico o incorporar aminoácidos no naturales. En algunas

realizaciones, las citocinas descritas en el presente documento se sintetizan utilizando sistemas de traducción libres de células descritos en los documentos US 8,778,631; US 2017/0283469; US 2018/0051065; US 2014/0315245; o US 8,778,631. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden factores de liberación modificados, o incluso la eliminación de uno o más factores de liberación del sistema. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción libres de células comprenden una concentración de proteasa reducida. En algunas realizaciones, los sistemas de traducción sin células comprenden ARNt modificados con codones reasignados utilizados para codificar aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, las sintetasa descritas en el presente documento para la incorporación de aminoácidos no naturales se utilizan en sistemas de traducción libres de células. En algunas realizaciones, los ARNt se cargan previamente con aminoácidos no naturales utilizando métodos enzimáticos o químicos antes de añadirse a un sistema de traducción libre de células. En algunas realizaciones, los componentes para un sistema de traducción libre de células se obtienen de organismos modificados, tales como bacterias modificadas, levaduras u otros organismos.

En algunas realizaciones, un polipéptido IL-15 se genera como una forma permutada circularmente, ya sea a través de un sistema hospedador de expresión o a través de un sistema libre de células.

Producción de polipéptido IL-15 que comprende un aminoácido no natural

En la presente divulgación se puede utilizar un código genético ortogonal o expandido, en el que se asignan uno o más codones específicos presentes en la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido IL-15 para codificar el aminoácido no natural de modo que pueda incorporarse genéticamente en la IL-15 utilizando un par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal. El par de ARNt sintetasa/ARNt ortogonal es capaz de cargar un ARNt con un aminoácido no natural y es capaz de incorporar ese aminoácido no natural en la cadena polipeptídica en respuesta al codón.

En algunas realizaciones, el codón es el codón ámbar, ocre, ópalo o un codón cuadruplete. En algunos casos, el codón corresponde al ARNt ortogonal que se utilizará para transportar el aminoácido no natural. En algunos casos, el codón es ámbar. En otros casos, el codón es un codón ortogonal.

En algunos casos, el codón es un codón cuadruplete, que puede ser decodificado por un ribosoma ortogonal ribo-Q1. En algunos casos, el codón de cuadruplete es como se ilustra en Neumann, et al., "Encoding Multiple Unnatural aminoacids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome", Nature, 464(7287): 441-444 (2010).

En algunos casos, un codón utilizado en la presente divulgación es un codón recodificado, por ejemplo un codón sinónimo o un codón raro que se reemplaza con codón alternativo. En algunos casos, el codón codificado es como se describe en Napolitano, et al., "Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in Escherichia coli," PNAS, 113(38): E5588-5597 (2016). En algunos casos, el codón recodificado es como se describe en Ostrov et al., "Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome," Science 353(6301): 819-822 (2016).

En algunas realizaciones, se utilizan ácidos nucleicos no naturales que conducen a la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en la IL-15. Los ácidos nucleicos no naturales ejemplares incluyen, pero sin limitación, uracil-5-ilo, hipoxantina-9-ilo (I), 2-aminoadenin-9-ilo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazadenina. Ciertos ácidos nucleicos no naturales, tales como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2 sustituidas, purinas N-6 sustituidas, purinas O-6 sustituidas, 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-metilcitosina, los que aumentan la estabilidad de la formación dúplex, ácidos nucleicos universales, ácidos nucleicos hidrófobos, ácidos nucleicos promiscuos, ácidos nucleicos expandidos por tamaño, ácidos nucleicos fluorados, 5-pirimidinas sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. 5-metilcitosina (5-me-C), 5- hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo, 5-propinil citosina, otros derivados alquínílicos de ácidos nucleicos de pirimidina, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo, otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-deazaadenina, 3-desazaguanina, 3-desazaadenina, pirimidinas tricíclicas, fenoxazina citidina([5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirido[5,4-b][1,4]benzotiazina-2(3H)-ona), pinzas G, fenoxazina citidina (por ejemplo 9- (2-aminoetoxi)-H-pirido[5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona) aquellos en los que la base de purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina, 2-piridona, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina clorada,

ciclocitosina, citosina arabinósido, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxiaurea, yodouracilo, 5-nitrocitosina, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo y 5-yodouracilo, 2-amino-adenina, 6-tioguanina, 2-tiotimina, 4-tiotimina, 5-propinil-uracilo, 4-tio-uracilo, N4-etilcitosina, 7-deazaguanina, 7-deaza-8-azaguanina, 5-hidroxicitosina, 2'-desoxiuridina, 2-amino-2'-desoxiadenosina y las descritas en las patentes de EE. UU. N.º 3,687,808; 4,845,205; 4,910,300; 4,948,882; 5,093,232; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 and 6,005,096; WO 99/62923; Kandimalla et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; and Sanghvi, Chapter 15, Antisense Research and Applications, Crooke and Lebleu Eds., CRC Press, 1993, 273-288. Se pueden encontrar modificaciones de base adicionales, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 3,687,808; Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y Sanghvi, capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke y Lebleu ed., CRC Press, 1993.

En la técnica están disponibles ácidos nucleicos no naturales que comprenden varias bases heterocíclicas y varias fracciones de azúcar (y análogos de azúcar), y los ácidos nucleicos en algunos casos incluyen una o varias bases heterocíclicas distintas de los cinco componentes básicos principales de ácidos nucleicos de origen natural. Por ejemplo, la base heterocíclica incluye, en algunos casos, grupos uracil-5-il, citosina-5-il, adenin-7-il, adenin-8-il, guanin-7-il, guanin-8-il, 4-aminopirrol [2,3-d] pirimidin-5-il, 2-amino-4-oxopirrol [2,3-d] pirimidin-5-il, 2-amino-4-oxopirrol [2,3-d] pirimidin-3-ilo, donde las purinas se unen a la fracción de azúcar del ácido nucleico a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos también se modifican en la fracción de fosfato. Las fracciones de fosfato modificados incluyen, pero sin limitación, aquellas con modificación en el enlace entre dos nucleótidos y contienen, por ejemplo, un fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, metilo y otros fosfonatos de alquilo, incluidos fosfonato de 3'-alquileo y fosfonatos quiral, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen fosforamidato de 3'-amino y fosforamidatos de aminoalquilo, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfosfotriésteres y boranofosfonatos. Se entiende que estos enlaces de fosfato o fosfato modificado entre dos nucleótidos son a través de un enlace 3'-5' o un enlace 2'-5', y el enlace contiene polaridad invertida tal como 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácidos libres. Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan cómo producir y utilizar nucleótidos que contienen fosfonatos modificados e incluyen, entre otros, 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; y 5,625,050.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen 2',3'-dideoxi-2',3'-didehidro-nucleósidos (PCT/US2002/006460), ADN y derivados de ARN sustituidos en 5' (PCT/US2011/033961; Saha et al., J. Org. Chem., 1995, 60, 788-789; Wang et al., BioOrganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9, 885-890; y Mikhailov et al., Nucleosides & nucleotides, 1991, 10(1-3), 339-343; Leonid et al., 1995, 14(3-5), 901-905; and Eppacher et al., Helvetica Chimica Acta, 2004, 87, 3004-3020; PCT/JP2000/004720; PCT/JP2003/002342; PCT/JP2004/013216; PCT/JP2005/020435; PCT/JP2006/315479; PCT/JP2006/324484; PCT/JP2009/056718; PCT/JP2010/067560), o monómeros sustituidos en 5' producidos como el monofosfato con bases modificadas (Wang et al., Nucleosides nucleotides & nucleic acids, 2004, 23 (1 y 2), 317-337).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales incluyen modificaciones en la posición 5' y la posición 2' del anillo de azúcar (PCT/US94/02993), tales como nucleósidos 2'-O-protegidos sustituidos en 5'-CH₂ (Wu et al., Helvetica Chimica Acta, 2000, 83, 1127-1143 y Wu et al., Bioconjugate Chem. 1999, 10, 921-924). En algunos casos, los ácidos nucleicos no naturales incluyen dímeros de nucleósidos enlazados a amida se han preparado para incorporación en oligonucleótidos en donde el nucleósido enlazado a 3' en el dímero (5' a 3') comprende un 2'-OCH₃ y un 5'-(S)-CH₃ (Mesmaeker et al., Synlett, 1997, 1287-1290). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir nucleósidos modificados 5'-CH₂ (u O) sustituidos en 2' (PCT/US92/01020). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros y dímeros de ADN y ARN 5'-metilfosfonato (Bohringer et al., Tet. Lett., 1993, 34, 2723-2726; Collingwood et al., Synlett, 1995, 7, 703-705; and Hutter et al., Helvetica Chimica Acta, 2002, 85, 2777-2806). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros de 5'-fosfonato que tienen una sustitución en 2' (US2006/0074035) y otros monómeros de 5'-fosfonato modificados (WO1997/35869). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros de metilfosfonato modificados en 5' (EP614907 y EP629633). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir análogos de ribonucleósidos de 5' o 6'-fosfonato que comprenden un grupo hidroxilo en la posición 5' y/o 6' (Chen et al., Phosphorus, Sulfur and Silicon, 2002, 777, 1783-1786; Jung et al., Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 2501-2509; Gallier et al., Eur. J. Org. Chem., 2007, 925-933; y Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19(8), 1029-1033). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir monómeros y dímeros de desoxirribonucleósido de 5'-fosfonato que tienen un grupo 5'-fosfato (Nawrot et al., Oligonucleotides, 2006, 16(1), 68-82). Los ácidos nucleicos no naturales pueden incluir nucleósidos que tienen un grupo 6'-fosfonato en donde la posición 5' y/o 6' no está sustituida o está sustituida con un grupo tio-terc-butilo (SC(CH₃)₃) (y análogos del mismo);

un grupo metilenamino (CH_2NH_2) (y análogos del mismo) o un grupo ciano (CN) (y análogos del mismo) (Fairhurst et al., Synlett, 2001, 4, 467-472; Kappler et al., J. Med. Chem., 1986, 29, 1030-1038; Kappler et al., J. Med. Chem., 1982, 25, 1179-1184; Vruthula et al., J. Med. Chem., 1987, 30, 888-894; Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19, 1371-1377; Geze et al., J. Enm. Chem. Soc, 1983, 105(26), 7638-7640; y Hampton et al., J. Am. Chem. Soc, 1973, 95(13), 4404-4414).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales también incluyen modificaciones de la fracción de azúcar. En algunos casos, los ácidos nucleicos contienen uno o más nucleósidos en donde el grupo azúcar se ha modificado. Dichos nucleósidos modificados en azúcar pueden impartir una estabilidad de nucleasas mejorada, una afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden una fracción de anillo de ribofuranosa modificada químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos grupos sustituyentes 5' y/o 2'; el puente de dos átomos de anillo para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S, N(R) o C(R₁)(R₂) (R = H, C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector); y combinaciones de los mismos. Se pueden encontrar ejemplos de azúcares modificados químicamente en los documentos WO2008/101157, US2005/0130923 y WO2007/134181.

En algunos casos, un ácido nucleico modificado comprende azúcares modificados o análogos de azúcar. Por lo tanto, además de ribosa y desoxirribosa, la fracción de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxirribosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa o un grupo ciclopentilo "análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma de piranosilo o furanosilo. La fracción de azúcar puede ser el furanósido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede unirse a las respectivas bases heterocíclicas en configuración anomérica [alfa] o [beta]. Las modificaciones de azúcar incluyen, pero sin limitación, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN. Por ejemplo, una modificación de azúcar puede incluir 2'-O-metil-uridina o 2'-O-metil-citidina. Las modificaciones de azúcar incluyen desoxirribonucleósidos sustituidos con 2'-O-alquilo y ribonucleósidos de tipo 2'-O-etilenglicol. Se conoce la preparación de estos azúcares o análogos de azúcar y los respectivos "nucleósidos" en donde dichos azúcares o análogos están unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico). También se pueden realizar modificaciones en el azúcar y combinarlas con otras modificaciones.

Las modificaciones al resto de azúcar incluyen modificaciones naturales de la ribosa y desoxi ribosa, así como modificaciones no naturales. Las modificaciones de azúcar incluyen, pero sin limitación, las siguientes modificaciones en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden estar sustituidos o no sustituidos con alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀. Modificaciones de azúcar 2' también incluyen, pero sin limitación, -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nCH₃, -O(CH₂)_nONH₂ y -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10.

Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alquilo, o-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del azúcar, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los azúcares modificados también incluyen aquellos que contienen modificaciones en el oxígeno del anillo de puente, tales como CH₂ y S. Los análogos de azúcar de nucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como fracciones ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Hay numerosas patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas y que detallan y describen una serie de modificaciones de base, tales como las patentes de los EE. UU. N° 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; y 5,700,920.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que tienen fracciones de azúcar modificadas incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar entre alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-(C₁-C₁₀ alquilo), OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento incluyen uno o más ácidos nucleicos bicíclicos. En determinadas realizaciones de este tipo, el ácido nucleico bicíclico comprende un puente entre los átomos del anillo de ribosilo 4' y 2'. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento incluyen uno o más ácidos nucleicos bicíclicos en donde el puente comprende un ácido nucleico bicíclico 4' a 2'. Los ejemplos de tales ácidos nucleicos bicíclicos 4' a 2' incluyen, pero sin limitación, uno

de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y análogos del mismo (véase la Patente de EE. UU. N° 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' y análogos del mismo, (véase los documentos WO2009/006478, WO2008/150729, US2004/0171570, la Patente de EE. UU. N° 7,427,672, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 209, 74, 118-134, y el documento WO2008/154401). Véase también, por ejemplo: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opin. Mol. A continuación, 2001, 3, 239-243; Patentes de EE. UU. N° 4,849,513; 5,015,733; 5,118,800; 5,118,802; 7,053,207; 6,268,490; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 6,525,191; 6,670,461; y 7,399,845; Publicaciones Internacionales N° WO2004/106356, WO1994/14226, WO2005/021570, WO2007/090071 y WO2007/134181; Publicación de Patente de EE. UU. N° US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; Solicitud Provisional de EE. UU. N° 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 y 61/099,844; y Solicitudes Internacionales N° PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922 y PCT/DK98/00393.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos enlazados. Los ácidos nucleicos se pueden enlazar entre sí utilizando cualquier enlace de ácido internucleico. Las dos clases principales de grupos de enlace de ácido internucleico se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces de ácido internucleico que contienen fósforo representativo incluyen, pero sin limitación, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos (P=S). Los grupos de enlace de ácido internucleico que no contienen fósforo representativos incluyen, pero sin limitación, metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); y N,N*-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)). En determinadas realizaciones, los enlaces de ácidos internucleicos que tienen un átomo quiral se pueden preparar como una mezcla racémica, como enantiómeros separados, por ejemplo, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los ácidos nucleicos no naturales pueden contener una sola modificación. Los ácidos nucleicos no naturales pueden contener múltiples modificaciones dentro de una de las fracciones o entre diferentes fracciones.

Las modificaciones de fosfato del esqueleto al ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, fosfonato de metilo, fosforotioato, fosforamidato (puente o no puente), fosfotriéster, fosforoditioato, fosfoditioato y boranofosfato, y se puede utilizar en cualquier combinación. También se pueden utilizar otros enlaces distintos de fosfato.

En algunas realizaciones, las modificaciones de la estructura principal (por ejemplo enlaces internucleótidos de metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato y fosforoditioato) pueden conferir actividad inmunomoduladora sobre el ácido nucleico modificado y/o mejorar su estabilidad *in vivo*.

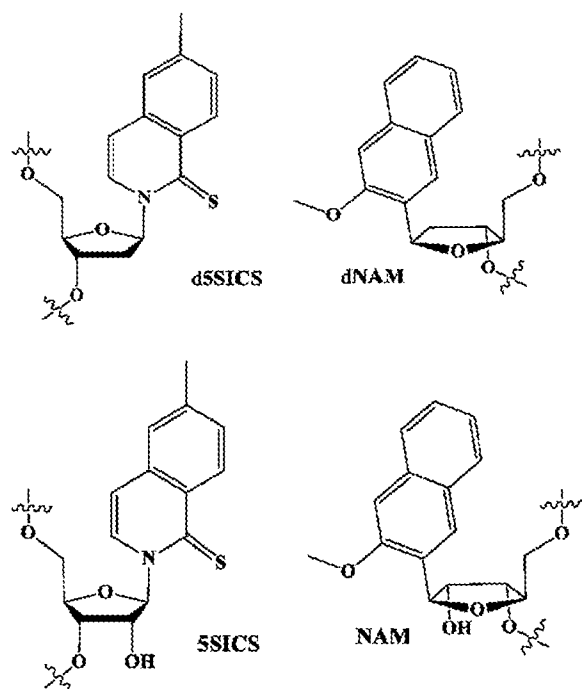
En algunos casos, un derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) está unido al azúcar o a la fracción análoga a azúcar y puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similares. Se pueden encontrar polinucleótidos ejemplares que contienen enlaces fosfato o enlaces no fosfato modificados en Peyrottes et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24: 1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24:2318-2323; y Schultz et al., (1996) Nucleic Acids Res. 24:2966-2973; Matteucci, 1997, "Oligonucleotide Analogs: an Overview" in Oligonucleotides as Therapeutic Agents, (Chadwick and Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY; Zon, 1993, "Oligonucleoside Phosphorothioates" in Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Humana Press, páginas 165-190; Miller et al., 1971, JACS 93:6657-6665; Jager et al., 1988, Biochem. 27:7247-7246; Nelson et al., 1997, JOC 62:7278-7287; Patente de EE. UU. N° 5.453.496; y Micklefield, 2001, Curr. Med. Chem. 8: 1157-1179.

En algunos casos, la modificación de la estructura principal comprende reemplazar el enlace fosfodiéster con una fracción alternativa tal como un grupo aniónico, neutro o catiónico. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen: enlace internucleósido aniónico; modificación fosforamidato de N3' a P5'; ADN de boranofosfato; prooligonucleótidos; enlaces internucleósidos neutros tales como metilfosfonatos; ADN unido a amida; enlaces metileno(metilimino); enlaces formacetal y tioformacetal; esqueletos que contienen grupos sulfonilo; morfolino oligos; ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y guanidina desoxirribonucleica cargada positivamente (DNG) oligos (Micklefield, 2001, Current Medicinal Chemistry 8: 1157-1179). Un ácido nucleico modificado puede comprender un esqueleto quimérico o mixto que comprende una o más modificaciones, por ejemplo una combinación de enlaces fosfato, tal como una combinación de enlaces fosfodiéster y fosforotioato.

Los sustitutos del fosfato incluyen, por ejemplo, enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formaceto y tioformaceto; esqueletos de metileno formaceto y tioformaceto; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos. Numerosas patentes de los Estados Unidos revelan cómo producir y utilizar estos tipos de sustitutos de fosfato e incluyen, pero sin limitación, las patentes de los EE. UU. N° 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444;

5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439. También se entiende en un sustituto de nucleótido que tanto el azúcar como las fracciones fosfato del nucleótido se pueden reemplazar, por ejemplo, mediante un enlace de tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). Las patentes de los Estados Unidos N° 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262 enseñan cómo producir y utilizar moléculas de PNA. Véase también Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500. También es posible unir otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos de nucleótidos para mejorar, por ejemplo, la absorción celular. Los conjugados pueden unirse químicamente al nucleótido o a análogos de nucleótidos. Dichos conjugados incluyen, pero sin limitación, fracciones lipídicas tales como una fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., Ann. KY. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBOJ, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1-di-O-hexadecil-rac-glicero-S-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético de adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una fracción de palmitilo (Mishra et al., Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan la preparación de dichos conjugados e incluyen, pero sin limitación, las Patentes de EE. UU. N° 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no naturales forman además pares de bases no naturales. Nucleótidos no naturales ejemplares capaces de formar un par de bases de ADN o ARN (UBP) no natural en condiciones *in vivo* incluyen, pero sin limitación, 5SICS, d5SICS, NAM, dNaM, TPT3TP, dTPT3TP y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los nucleótidos no naturales incluyen:



En algunas realizaciones, un par de bases no naturales genera un aminoácido no natural descrito en Dumas et al., "Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology," Chemical Science, 6: 50-69 (2015).

La célula hospedadora en la que se introducen las construcciones o vectores divulgados en el presente documento se cultiva o se mantiene en un medio adecuado de modo que se produzcan el ARNt, el ARNt sintetas y la proteína

de interés. El medio también comprende aminoácido(s) no natural(es) de tal manera que la proteína de interés incorpora aminoácido(s) no natural(es).

El par ortogonal de ARNt sintetasa/ARNt carga un ARNt con un aminoácido no natural e incorpora el aminoácido no natural en la cadena polipeptídica en respuesta al codón. Los pares aaRS-ARNt ejemplares incluyen, pero sin limitación, pares aaRS/ARNt de *Methanococcus jannaschii* (Mj-Tyr), pares *E. coli* TyrRS (*Ec-Tyr*)/*B. Stearothermophilus* ARNt_{CUA}, pares *E. coli* LeuRS (*Ec-Leu*)/*B. stearothermophilus* ARNt_{CUA} y pares pirrolisil-ARNt.

Un polipéptido IL-15 que comprende aminoácido(s) no natural(es) se preparan introduciendo las construcciones de ácido nucleico descritas en el presente documento que comprenden el ARNt y ARNt sintetasa y que comprenden una secuencia de ácido nucleico de interés con uno o más codones ortogonales (de parada) en el marco en una célula hospedadora. La célula hospedadora se expone a una solución fisiológica que comprende aminoácido(s) no natural(es), y las células hospedadoras se mantienen a continuación en condiciones que permiten la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés. El (los) aminoácido(s) no natural(es) se incorpora(n) a la cadena polipeptídica en respuesta al codón. Por ejemplo, se incorporan uno o más aminoácidos no naturales en el polipéptido IL-15. Como alternativa, se pueden incorporar dos o más aminoácidos no naturales en el polipéptido IL-15 en dos o más sitios de la proteína.

Cuando se van a incorporar múltiples aminoácidos no naturales en un polipéptido IL-15, se entenderá que habrá que incorporar múltiples codones en la secuencia de ácido nucleico codificante en las posiciones deseadas de modo que los pares de ARNt sintetasa/ARNt puedan dirigir la incorporación de los aminoácidos no naturales en respuesta al (a los) codón (codones). Al menos 1, 2, 3, 4 o más codones que codifican ácidos nucleicos pueden incorporarse en la secuencia de ácido nucleico de interés.

Cuando se desea incorporar más de un tipo de aminoácido no natural en la proteína de interés en una sola proteína, se puede utilizar un segundo o más pares ortogonales de ARNt-ARNt sintetasa para incorporar el segundo o más aminoácido no natural; adecuadamente dicho segundo o más pares ortogonales de ARNt-ARNt sintetasa reconocen un codón diferente en el ácido nucleico que codifica la proteína de interés de modo que los dos o más aminoácidos no naturales se puedan incorporar específicamente en diferentes sitios definidos en la proteína en una sola etapa de fabricación. En determinadas realizaciones, por lo tanto, se pueden utilizar dos o más pares ortogonales de ARNt-ARNt sintetasa.

Una vez que el polipéptido IL-15 que incorpora aminoácido(s) no natural(es) se ha producido en la célula hospedadora, se puede extraer del mismo mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen lisis enzimática, química y/u osmótica y disrupción física. El polipéptido IL-15 se puede purificar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como cromatografía preparativa, purificación de afinidad o cualquier otra técnica adecuada.

Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir células bacterianas (por ejemplo *E. coli*), pero lo más adecuado son células eucariotas, por ejemplo células de insecto (por ejemplo *Drosophila*, tales como *Drosophila melanogaster*), células de levadura, nematodos (por ejemplo *Caenorhabditis elegans*), ratones (por ejemplo *Mus musculus*) o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o COS, células 293T humanas, células HeLa, células eritrocíticas, NIH 3T3) y células de eritroleucemia de ratón (MEL)), u otras células eucariotas. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas. Adecuadamente, la célula hospedadora es una célula de mamífero, tal como una célula humana o una célula de insecto.

Otras células hospedadoras adecuadas que se pueden utilizar generalmente en las realizaciones de la invención son las mencionadas en la sección de ejemplos. El ADN vectorial se puede introducir en células hospedadoras a través de técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas bien reconocidas para introducir una molécula de ácido nucleico extraño (por ejemplo ADN) en una célula hospedadora, que incluyen coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras son bien conocidos en la técnica.

Al crear líneas celulares, generalmente se prefiere que se preparen líneas celulares estables. Para la transfección estable de células de mamífero, por ejemplo, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un marcador seleccionable se pueden introducir en una célula hospedadora en el mismo vector o se pueden introducir en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con la molécula de ácido nucleico introducida se pueden identificar mediante selección de fármacos (por ejemplo las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

En una realización, las construcciones descritas en el presente documento se integran en el genoma de la célula hospedadora. Una ventaja de la integración estable es que se logra la uniformidad entre células o clones individuales. Otra ventaja es que puede llevarse a cabo la selección de los mejores productores. En consecuencia, es deseable crear líneas celulares estables. En otra realización, las construcciones descritas en el presente documento se transfectan en una célula hospedadora. Una ventaja de transfectar las construcciones en la célula hospedadora es que los rendimientos de proteínas se pueden maximizar. En un aspecto, se describe una célula que comprende la construcción de ácido nucleico o el vector descrito en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas y formulaciones

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica y las formulaciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto por múltiples vías de administración, que incluyen, entre otras, vías de administración parenteral, oral o transdérmica. En algunos casos, la administración parenteral comprende intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracerebral, intranasal, infusión intraarterial, intraarticular, intradérmica, intravítrea, intraósea, administración intraperitoneal o intratecal. En algunos casos, la composición farmacéutica se formula para administración local. En otros casos, la composición farmacéutica se formula para la administración sistémica.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, dispersiones líquidas acuosas, dispersiones autoemulsionantes, dispersiones liposómicas, aerosoles, formulaciones de liberación inmediata, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil y formulaciones mixtas de liberación inmediata y controlada.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen un portador o materiales portadores seleccionados sobre la base de la compatibilidad con la composición divulgada en el presente documento y las propiedades del perfil de liberación de la forma de dosificación deseada. Los materiales portadores ilustrativos incluyen, por ejemplo aglutinantes, tensioactivos, solubilizantes, estabilizadores, lubricantes, agentes humectantes, diluyentes y similares. Los materiales portadores farmacéuticamente compatibles incluyen, pero sin limitación, acacia, gelatina, dióxido de silicio coloidal, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnesio, polivinilpirrolidona (PVP), colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sodio, lecitina de soja, ácido taurocólico, fosfatidilcolina, cloruro de sodio, fosfato tricálcico, fosfato dipotásico, celulosa y conjugados de celulosa, azúcares estearoil lactilato de sodio, carragenano, monoglicérido, diglicérido, almidón pregelatinizado y similares. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Decimonovena Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980, and Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams y Wilkins 1999).

En algunos casos, la composición farmacéutica se formula como un inmunoliposoma, que comprende una pluralidad de conjugados de IL-15 unidos directa o indirectamente a la bicapa lipídica de los liposomas. Los lípidos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos; fosfolípidos; esteroides tales como colesterol; esfingolípidos tales como esfingomielina; glucoesfingolípidos tales como gangliósidos y cerebrósidos; aminas tensioactivas tales como estearil, oleil y linoleil aminas. En algunos casos, el lípido comprende un lípido catiónico. En algunos casos, el lípido comprende un fosfolípido. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ácido fosfatídico ("PA"), fosfatidilcolina ("PC"), fosfatidilglicerol ("PG"), fosfatidiletanolamina ("PE"), fosfatidilinositol ("PI") y fosfatidilserina ("PS"), esfingomielina (incluida la esfingomielina cerebral), lecitina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, cerebrósidos, diaraquidolfosfatidilcolina ("DAPC"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilcolina ("DDPC"), dielaidolfosfatidilcolina ("DEPC"), dilaurolfosfatidilcolina ("DLPC"), dilinoleolfosfatidilcolina, dimiristolfosfatidilcolina ("DMPC"), dioleolfosfatidilcolina ("DOPC"), dipalmitolfosfatidilcolina ("DPPC"), distearolfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina ("POPC"), diaraquidolfosfatidilglicerol ("DAPG"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilglicerol ("DDPG"), dielaidolfosfatidilglicerol ("DEPG"), dilaurolfosfatidilglicerol ("DLPG"), dilinoleolfosfatidilglicerol, dimiristolfosfatidilglicerol ("DMPG"), dioleolfosfatidilglicerol ("DOPG"), dipalmitolfosfatidilglicerol ("DPPG"), distearolfosfatidilglicerol ("DSPG"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol ("POPG"), diaraquidolfosfatidiletanolamina ("DAPE"), didecanoil-L-alfa-fosfatidiletanolamina ("DDPE"), dielaidolfosfatidiletanolamina ("DEPE"), dilaurolfosfatidiletanolamina ("DLPE"), dilinoleolfosfatidiletanolamina, dimiristolfosfatidiletanolamina ("DMPE"), dioleolfosfatidiletanolamina ("DOPE"), dipalmitolfosfatidiletanolamina ("DPPE"), distearolfosfatidiletanolamina ("DSPE"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina ("POPE"), diaraquidolfosfatidilinositol ("DAPI"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilinositol ("DDPI"), dielaidolfosfatidilinositol ("DEPI"), dilaurolfosfatidilinositol ("DLPI"), dilinoleolfosfatidilinositol, dimiristolfosfatidilinositol ("DMPI"), dioleolfosfatidilinositol ("DOPI"), dipalmitolfosfatidilinositol ("DPII"), distearolfosfatidilinositol ("DSPI"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinositol ("POPI"), diaraquidolfosfatidilserina ("DAPS"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilserina ("DDPS"), dielaidolfosfatidilserina ("DEPS"), dilaurolfosfatidilserina ("DLPS"), dilinoleolfosfatidilserina, dimiristolfosfatidilserina ("DMPS"), dioleolfosfatidilserina ("DOPS"), dipalmitolfosfatidilserina ("DPPS"), distearolfosfatidilserina ("DSPS"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilserina ("POPS"), diaraquidolfosfatidilserina, didecanoil esfingomielina, dielaidolfosfatidilserina, dilaurolfosfatidilserina, dilinoleoil

esfingomielina, dimiristoil esfingomielina, esfingomielina, dioleoil esfingomielina, dipalmitoil esfingomielina, distearoil esfingomielina y 1-palmitoil-2-oleoil-esfingomielina.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen además agentes de ajuste del pH o agentes tamponantes que incluyen ácidos tales como ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico e clorhídrico, bases tales como hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y tris-hidroximetilaminometano, y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Dichos ácidos, bases y tampones se incluyen en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un rango aceptable.

En algunos casos, la formulación farmacéutica incluye una o más sales en una cantidad necesaria para llevar la osmolalidad de la composición a un rango aceptable. Dichas sales incluyen las que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito, las sales adecuadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y sulfato de amonio.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, azúcares como trehalosa, sacarosa, manitol, sorbitol, maltosa, glucosa o sales como fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato de amonio y/u otros agentes tales como heparina para aumentar la solubilidad y la estabilidad *in vivo* de los polipéptidos.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas incluyen además diluyentes que se utiliza para estabilizar compuestos porque pueden proporcionar un entorno más estable. Las sales disueltas en soluciones tamponadas (que también pueden proporcionar control o mantenimiento del pH) se utilizan como diluyentes en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, una solución salina tamponada con fosfato.

Los estabilizadores incluyen compuestos tales como cualquier agente antioxidante, tampones, ácidos, conservantes y similares. Los estabilizadores ejemplares incluyen hidrocloreuro de L-arginina, trometamina, albúmina (humana), ácido cítrico, alcohol bencílico, fenol, bifosfato disódico deshidratado, propilenglicol, metacresol o m-cresol, acetato de zinc, polisorbato-20 o Tween® 20 o trometamol.

Los tensioactivos incluyen compuestos tales como laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, Tween 60 u 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitano, monooleato de polioxietileno sorbitano, monooleato de polioxietileno sorbitano, polisorbatos, polaxómeros, sales biliares, monoestearato de glicerilo, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno, por ejemplo Pluronic® (BASF) y similares. Los tensioactivos adicionales incluyen glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno y aceites vegetales, por ejemplo aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno (60) y alquiléteres de polioxietileno y éteres de alquilfenilo, por ejemplo octoxinol 10, octoxinol 40. A veces, se incluyen tensioactivos para mejorar la estabilidad física o para otros fines.

Pautas terapéuticas

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran para aplicaciones terapéuticas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o más. La composición farmacéutica se administra diariamente, todos los días, cada día alterno, cinco días a la semana, una vez a la semana, cada dos semanas, dos semanas al mes, tres semanas al mes, una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes o más. La composición farmacéutica se administra durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años o más.

En el caso en que el estado del paciente mejora, a discreción del médico, la administración de la composición se administra de forma continua, como alternativa, la dosis de la composición que se está administrando se reduce temporalmente o se suspende temporalmente durante un cierto período de tiempo (es decir, una "vacaciones de fármacos"). En algunas realizaciones, la duración de las vacaciones de fármacos varía entre 2 días y 1 año, incluyendo solo a modo de ejemplo 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 28 días, 35 días, 50 días, 70 días, 100 días, 120 días, 150 días, 180 días, 200 días, 250 días, 280 días, 300 días, 320 días, 350 días o 365 días. La reducción de la dosis durante una vacaciones con medicamentos es de 10%-100%, incluyendo, a modo de ejemplo solamente, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

Una vez que se ha producido una mejora de las condiciones del paciente, se administra una dosis de mantenimiento si es necesario. Posteriormente, la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, se pueden reducir, en función de los síntomas, a un nivel en el que se retenga la enfermedad, trastorno o afección mejorada.

En algunas realizaciones, la cantidad de un agente dado que corresponde a dicha cantidad varía dependiendo de factores tales como el compuesto particular, la gravedad de la enfermedad, la identidad (por ejemplo peso) del sujeto u hospedador que necesita tratamiento, pero sin embargo se determina rutinariamente de una manera

conocida en la técnica de acuerdo con las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo, por ejemplo el agente específico que se está administrando, la vía de administración y el sujeto u hospedador que se está tratando. En algunas realizaciones, la dosis deseada se presenta convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas simultáneamente (o durante un corto período de tiempo) o en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

Los intervalos anteriores son meramente sugerentes, ya que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande y no son infrecuentes excursiones considerables de estos valores recomendados. Dichas dosis se alteran dependiendo de una serie de variables, sin limitación a la actividad del compuesto utilizado, la enfermedad o afección que se va a tratar, el modo de administración, los requisitos del sujeto individual, la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando y el juicio del médico.

En algunas realizaciones, la toxicidad y eficacia terapéutica de dichos regímenes terapéuticos se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, que incluyen, pero sin limitación, la determinación de la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se expresa como la relación entre LD50 y ED50. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se utilizan para formular una gama de dosis para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED50 con una toxicidad mínima. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Kits/Artículo de fabricación

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se divulgan kits y artículos de fabricación para su uso con uno o más métodos y composiciones descritos en el presente documento. Dichos kits incluyen un portador, paquete o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se utilizarán en un método descrito en el presente documento. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, y tubos de ensayo. En una realización, los recipientes se forman a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

Los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento contienen materiales de embalaje. Los ejemplos de materiales de empaquetado farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, blísteres, frascos, tubos, bolsas, recipientes, frascos y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo previsto de administración y tratamiento.

Por ejemplo, los recipientes incluyen uno o más de los polipéptidos IL-15 o conjugados de IL-15 divulgados en el presente documento, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticos descritos en el presente documento para facilitar el suministro de polipéptidos IL-15 o conjugados de IL-15. Dichos kits incluyen además opcionalmente una descripción o etiqueta de identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Un kit normalmente incluye etiquetas que enumeran el contenido y/o las instrucciones de uso, y prospectos con instrucciones de uso. Normalmente también se incluirá un conjunto de instrucciones.

En una realización, una etiqueta está en o asociada con el recipiente. En una realización, una etiqueta está en un recipiente cuando letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta se unen, moldean o graban en el propio recipiente, una etiqueta se asocia a un recipiente cuando está presente dentro de un recipiente o portador que también contiene el recipiente, por ejemplo, como un prospecto de paquete. En una realización, se usa una etiqueta para indicar que el contenido se va a utilizar para una aplicación terapéutica específica. La etiqueta también indica instrucciones para el uso del contenido, tal como en los métodos descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se presentan en un envase o dispositivo dispensador que contiene una o más formas dosificadoras unitarias que contienen un compuesto proporcionado en el presente documento. El envase, por ejemplo, contiene láminas de metal o plástico, tal como un blíster. En una realización, el envase o dispositivo dispensador va acompañado de instrucciones de administración. En una realización, el envase o dispensador también va acompañado de un aviso asociado con el recipiente en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, es el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. Para medicamentos, o el prospecto de producto aprobado. En una realización, las composiciones que contienen un compuesto proporcionado en el presente documento formuladas en un portador farmacéutico compatible también se preparan, se colocan en un recipiente apropiado y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.

Cierta terminología

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en las técnicas a las que pertenece la invención. Debe entenderse que la descripción detallada es sólo ilustrativa y explicativa y no restringe ninguna materia reivindicada. En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Debe notarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluyen", "incluye" e "incluido", no es limitante.

Aunque se pueden describir diversas características de la invención en el contexto de una única realización, las características también se pueden proporcionar por separado o en cualquier combinación adecuada. Por el contrario, aunque la invención se puede describir en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas para mayor claridad, la invención también puede implementarse en una única realización.

La referencia en la memoria descriptiva a "algunas realizaciones", "la realización", "una realización" u "otras realizaciones" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con las realizaciones se incluye en al menos algunas realizaciones, pero no necesariamente en todas las realizaciones. La presente invención es como se define en las reclamaciones adjuntas.

Tal como se utiliza en el presente documento, los rangos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o rango particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 5 μ L" significa "aproximadamente 5 μ L" y también "5 μ L". En general, el término "aproximadamente" incluye una cantidad que se esperaría que estuviera dentro de un error experimental.

Los encabezados de sección usados en este documento son con propósitos organizativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia en cuestión deseada de ninguna manera.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "individuo(s)", "sujeto(s)" y "paciente(s)" significan cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser no humano. Ninguno de los términos requiere o se limita a situaciones caracterizadas por la supervisión (por ejemplo constante o intermitente) de un trabajador sanitario (por ejemplo un médico, una enfermera registrada, una enfermera practicante, un asistente médico, un celador o un trabajador de cuidados paliativos).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "significativo" y "significativamente" en referencia a la unión del receptor significan un cambio suficiente para afectar la unión del polipéptido IL-15 a un receptor diana. En algunos casos, el término se refiere a un cambio de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más. En algunos casos, el término significa un cambio de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más.

En algunos casos, el término "significativamente" en referencia a la activación de una o más poblaciones celulares a través de un complejo de señalización de citocinas significa un cambio suficiente para activar la población celular. En algunos casos, el cambio para activar la población celular se mide como una potencia de señalización del receptor. En tales casos, puede proporcionarse un valor de EC50. En otros casos, se puede proporcionar un valor de ED50. En casos adicionales, se puede proporcionar una concentración o dosificación de la citocina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "potencia" se refiere a la cantidad de una citocina (por ejemplo polipéptido IL-15) necesaria para producir un efecto diana. En algunos casos, el término "potencia" se refiere a la cantidad de citocinas (por ejemplo polipéptido IL-15) necesaria para activar un receptor de citocinas diana (por ejemplo receptor de IL-15). En otros casos, el término "potencia" se refiere a la cantidad de citocinas (por ejemplo polipéptido IL-15) necesaria para activar una población de células diana. En algunos casos, la potencia se mide como ED50 (dosis efectiva 50), o la dosis necesaria para producir el 50 % de un efecto máximo. En otros casos, la potencia se mide como EC50 (concentración efectiva 50), o la dosis necesaria para producir el efecto diana en el 50 % de la población.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula inmunitaria que se infiltra en tumores" se refiere a células inmunitarias que se han infiltrado en una región que comprende células tumorales (por ejemplo, en un microambiente tumoral). En algunos casos, las células inmunitarias que se infiltran en tumores están asociadas con la destrucción de células tumorales, una disminución en la proliferación de células tumorales, una reducción en la carga tumoral o combinaciones de las mismas. En algunos casos, las células inmunitarias que se infiltran en tumores comprenden linfocitos de infiltración tumoral (TILs). En algunos casos, las células inmunitarias que se infiltran en tumores comprenden células T, células B, células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos o basófilos. En algunos casos, las células inmunitarias que se infiltran en tumores comprenden células T CD4+ o CD8+.

EJEMPLOS

Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos

EJEMPLO 1.**Expresión de polipéptidos IL-15 modificados**

El polipéptido IL-16 modificado se cultivó a 37°C, 250 rpm y 5 horas de inducción. El componente del medio era como se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Nombre	Composición
Medios de crecimiento	2xYT
	Fosfato de potasio dibásico 30,8 mM
Para 1 L: 2x gránulos 2xYT, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico	Fosfato de potasio monobásico 19,2 mM
	100 ug/ml de Ampicilina
	5 ug/ml de cloranfenicol
Autoclave en ciclo líquido para esterilizar	50 ug/ml de Zeocin
	dTPT3TP 37,5 uM
	dNAMTP 150 uM

Quando el cultivo de expresión alcanzó OD₆₀₀ 0,85-0,9, el cultivo se precargó con NaMTP (a una concentración final de 250 uM), TPT3TP (a una concentración final de 25 uM) y azido-lisina (a una concentración final de 15 mM). Aproximadamente 15-20 minutos después de la precarga con ribonucleótidos y aminoácidos, se añadió IPTG y la proteína se expresó durante aproximadamente 5 horas.

Cuerpo de inclusión

Tras la recogida de gránulos celulares, los gránulos se procesaron adicionalmente para cuerpos de inclusión. En resumen, se resuspendió un gránulo celular de 1L en 10 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; DTT 1 mM; e inhibidor de proteasa (1 gránulo/50 mL)). Después de la resuspensión, el volumen de gránulo de 1 L se aumentó a 45 ml con tampón de lisis y se ejecutó a través del microfluidizador 2 veces. A continuación, la muestra se transfirió a un tubo de centrifugación de 50 ml y se centrifugó a 16 k rpm durante 20 minutos a 4°C. A continuación, el gránulo se resuspendió en tampón de lisis de 5 ml y el volumen total se aumentó a 30 ml con tampón de lisis. Se añadió aproximadamente un 10 % de Triton X-100 a una concentración final de 0,5 %. A continuación, la solución se centrifugó a 16 k rpm durante 20 minutos a 4°C, y luego se recogió el gránulo y se lavó 3 veces con 30 ml de tampón de lisis. Se utilizó una jeringa de 5 ml con agujas para resuspender completamente con cada lavado. Después de una centrifugación final, se desechó el sobrenadante y el gránulo se congeló a presión para almacenar a -80°C.

Solubilización y repliegamiento

Se añadió aproximadamente 5 ml de tampón de solubilización al gránulo del cuerpo de inclusión. Después de la resuspensión, el volumen se aumentó a 30 ml en tampón de solubilización. A continuación, la muestra se incubó a 4°C durante 30-60 minutos. Después, la muestra se transfirió a un tubo de centrifugación de 2 x 50 ml (15 ml/tubo) y se añadió tampón de dilución de 15 ml a cada tubo. A continuación, la muestra se dializó posteriormente en tampón A1 durante la noche a 4°C, seguido de tampón de diálisis A2, tampón de diálisis A3, tampón de diálisis A4 y tampón de diálisis A5. Después de la diálisis, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se concentró a aproximadamente 5 ml.

La Tabla 3 ilustra los tampones de solubilización.

Nombre	Composición
Tampón de solubilización	Guanidina-HCL 6 M
	Tris-HCl 20 mM, pH 8,0

Nombre	Composición
	TDT 1 mM
	Imidazol 20 mM
Tampón de dilución	Guanidina-HCL 3 M
	Tris-HCl 20 mM, pH 8,0
	TDT 1 mM
	Imidazol 20 mM
Tampón de diálisis A1	Guanidina-HCl 2 M
	Tris-HCl 20 mM, pH 8,5
	NaCl 150 mM
	GSH 1 mM (glutación reducido)
	GSSG 0,1 mM (glutación oxidado)
	L-Arginina 0,4 M
Tampón de diálisis A2	Guanidina-HCl 0,75 M
	Tris-HCl 20 mM, pH 8,5
	NaCl 150 mM
	GSH 1 mM (glutación reducido)
	GSSG 0,1 mM (glutación oxidado)
	L-Arginina 0,4 M
Tampón de diálisis A3	Tris-HCl 20 mM, pH 8,5
	NaCl 150 mM
	GSH 1 mM (glutación reducido)
	GSSG 0,1 mM (glutación oxidado)
	L-Arginina 0,1 M
Tampón de diálisis A4	Tris-HCl 20 mM, pH 8,5
	NaCl 150 mM
Tampón de diálisis A5	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5
	NaCl 12,5 mM

Purificación

5 La muestra se purificó primero en una columna de filtración de gel GE HiLoad 16/600 Superdex 200 pg con tampón de elución 1x PBS, seguido de una columna de intercambio aniónico GE HiTrapQ para eliminar PEG libre y después una cromatografía en fase inversa con una elución en gradiente de tampón de elución al 30%-70% en 20 volúmenes de columna.

10 La Tabla 4 ilustra los tampones utilizados para la cromatografía de intercambio aniónico. La Tabla 5 ilustra los tampones utilizados para la cromatografía en fase inversa.

Tabla 4

Nombre	Composición
Tampón de funcionamiento	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5
Tampón de elución	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5
	NaCl 500 mM

Tabla 5

Nombre	Composición
Tampón de funcionamiento	Acetonitrilo al 4,5 %
	TFA al 0,043%
Tampón de elución	Acetonitrilo al 90 %
	TFA al 0,028%

La Fig. 4 muestra una serie ilustrativa de cromatografía de intercambio aniónico.

La Fig. 5 muestra una ejecución ilustrativa de cromatografía en fase inversa.

EJEMPLO 2

Cribado basado en células para la identificación de compuestos de IL-15 pegilados con participación nativa o sin participación de IL-15R α

Se utilizaron datos estructurales del complejo de señalización del receptor de IL-15/ heterotrimérico (PDB: 4GS7) para guiar el diseño de sitios de pegilación de nAA para retener la interacción nativa con el receptor heterotrimérico o para anular específicamente la interacción de la subunidad α del receptor de IL-15 e IL-15 (IL-15R α). Los conjugados de IL-15 ilustrativos se sometieron a análisis funcional: S18, A23, T24, L25, Y26, E46, V49, L52, E53, N77, S83, E89, E90. Los conjugados de IL-15 se expresaron como cuerpos de inclusión en *E. coli*, se purificaron y se replegaron utilizando procedimientos estándar antes de pegar específicamente el producto de IL-15 utilizando una química de click libre de cobre mediada por DBCO para unir fracciones mPEG covalentes estables a AzK. Los conjugados de IL-15 se cribaron para la actividad funcional utilizando un ensayo de proliferación colorimétrico de CTLL2. CTLL2 es un subclón de células T de ratón que expresa las tres subunidades receptoras de IL-15 y requiere IL-2/IL-15 para el crecimiento. Se realizaron experimentos preliminares para determinar la densidad celular óptima, el rango de IL-15 estándar o conjugados de IL-15 para una curva dosis-respuesta adecuada, así como el tiempo de incubación. Se comparó una IL-15 humana recombinante interna (rHuIL-15) con un estándar de IL-15 comercial (R&D, catálogo n.º 247-IL). En las condiciones definidas, la EC50 para el estándar de IL-15 comercial fue de aproximadamente 10,7 pM y 9,7 pM para el rHuIL-15 interno.

La Tabla 6 muestra los datos de EC50 para conjugados de IL-15 PEGilados lineales de 30 kDa diseñados para conservar la interacción nativa con el receptor de IL-15 heterotrimérico. El número de valores incluidos en el promedio se indica entre corchetes. Los resultados muestran que la bioconjugación a un PEG de 30 kDa no interfiere con la potencia en el receptor trimérico con una EC50 reducida menos de 5 veces en comparación con la IL-15 natural.

Tabla 6

Sitio	EC50 promedio (pg/mL)	EC50 promedio (pM)	Relación de EC50 IL-15 PEG30/rHuIL-15
R&D IL-15	136,80 $\pm$ 36.84 (6)	10,7	
rHuIL-15	124,62 $\pm$ 73.75 (6)	9,7	
S18 PEG30	414,10 (2)	32,1	3,3
S83 PEG30	199,80 (2)	15,5	1,6
N77 PEG30	236,05 (2)	18,3	1,9

La Tabla 7 muestra los datos de EC50 para conjugados de IL-15 PEGilados lineales de 30 kDa y ramificados de 40 kDa diseñados para anular específicamente la interacción de la subunidad α del receptor de IL-15 e IL-15 (IL-15R α). El número de valores incluidos en el promedio se indica entre corchetes. Los resultados muestran que la bioconjugación a un PEG de 30 kDa redujo la potencia en el receptor trimérico en comparación con la IL-15 natural. La bioconjugación de un PEG lineal de 30 kDa o un PEG de 40 kDa ramificado a V49 reduce moderadamente la potencia del receptor trimérico en comparación con rHuIL-15 (-6 a 8 veces, 814,4 pg/mL a 1,029 pg/mL frente a 124,62 pg/mL, respectivamente). Además, la potencia de PEG39 de L25 se redujo más fuertemente en relación con rHuIL-15 (-54 veces, 6.827 pg/mL frente a 124,62 pg/mL, respectivamente).

Tabla 7

Sitio	EC50 promedio (pg/mL)	EC50 promedio (pM)	Relación de EC50 IL-15 PEG/rHuIL-15
R&D IL-15	136,80±36.84 (6)	10,7	
rHuIL-15	124,62±73.75 (6)	9,7	1
L25 PEG30	6827 (2)	529,0	54
V49 PEG30	814,45 (2)	63,1	6
V49 PEG(40b)	1,019	79,0	8
E46 PEG30	65,893	5,106	526
E53 PEG30	22,766	1,764	182

La Fig. 6 ilustra los valores de EC50 para conjugados de IL-15 ejemplares con potencia nativa en el ensayo de proliferación de CTLL2. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

La Fig. 7 ilustra los valores de EC50 para los conjugados de IL-15 ejemplares. Como se muestra aquí, la pegilación específica del sitio contribuye a la farmacología in vitro. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

La Fig. 8 ilustra los valores de EC50 para IL-15 ejemplar conjugada con diferentes tamaños de PEG. Los resultados se representan como porcentaje de respuesta.

EJEMPLO 3

Interacciones bioquímicas de IL-15 PEGilada con subunidades del receptor de IL-15 humano

La cinética de las interacciones del compuesto de IL-15 PEGilado con subunidades del receptor de IL-15 humano se midió utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR) en Biofizik (San Diego, CA). Para estos estudios, se capturaron dominios extracelulares de IL-15 R α fusionados con Fc de IgG1 humana (Sino Biological #18366-H02H, R&D # 7194-IR) e IL-2 R β (Sino Biological #10696-H02H) en la superficie de un chip sensor CM3 o CM4 recubierto con proteína Biacore A. La proteína A se acopló mediante acoplamiento de amina a una densidad de aproximadamente 1500 RU en un chip CM3 a 25 °C. Se capturaron aproximadamente 400 RU de fusión IL15R α -Fc utilizando un tiempo de contacto de 4 min seguido de un tiempo de espera de 20 minutos antes de la inyección del analito. La regeneración de la superficie entre inyecciones se logró utilizando un ácido fosfórico de 100 mM. El receptor fresco se capturó cada ciclo después de la regeneración. Estas superficies se sondaron en triplicados a 25 °C. En un experimento típico se inyectaron 10 dosis de analito con una concentración máxima de 500 nM. En algunos casos, se necesitó un rango de concentración alto y en otros se omitieron del análisis las dosis más altas.

Debido a la unión más débil de los compuestos a IL2R β , no fue necesaria la regeneración y se realizaron estudios de unión ortogonal sin la etapa de regeneración. Se capturaron aproximadamente 600-700 RU de fusión Fc de IL2R β utilizando un tiempo de contacto de 1-2 min de una dilución de 1/100 en tampón corriente. Para los compuestos de prueba se inyectaron 10 dosis de analito con una concentración máxima de 1000 nM. Los datos sin procesar se analizaron utilizando el programa Scrubber2 utilizando un procedimiento de doble referencia donde la señal del compuesto se corrige a una superficie en blanco y una inyección tampón sobre la superficie de la proteína. Véanse las Tablas 8-10.

Tabla 8. Parámetros cinéticos para superficies de subunidades de los compuestos pegilados de rHuIL-15 e IL-15 IL-15R α .

Compuesto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHuIL-15	2,409E+05	5,105E-04	0,2117
	2,450E+06	4,763E-04	0,1943
	1,988E+06	4,184E-04	0,2103
IL15 N77PEG30	2,249E+05	4,146E-04	1,845
	2,404E+05	3,613E-04	1,502
	2,206E+05	2,926E-04	1,328
IL15 S83PEG30	3,669E+05	2,137E-04	0,5833

Compuesto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
	3,543E+05	2,560E-04	0,7227
	3,215E+05	1,905E-04	0,5909

Tabla 9. Parámetros cinéticos para compuestos pegilados rHuIL-15 e IL-15 con una unión reducida a superficies de subunidades IL-15R α .

Compuesto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHuIL-15	2,409E+05	5,105E-04	0,2117
	2,450E+06	4,763E-04	0,1943
	1,988E+06	4,184E-04	0,2103
IL15 L25PEG30	5,07E+03	1,19E-03	233,6
	3990	1,04E-03	260,9
	4930	1,22E-03	248,1
IL15 E46PEG30	3,83E+03	4,01E-04	104,6
	2805	3,01E-04	107,3
	3,17	3,25E-04	102,4
IL15 V49PEG30	1,73E+05	5,30E-04	3,066
	1,54E+05	5,76E-04	3,75
	1,50E+05	4,22E-04	2,823
IL15 V49PEG40b	1,51E+05	6,11 E-04	4,059
	1,26E+05	5,70E-04	4,522
	1,32E+05	4,60E-04	3,483
IL15 E53PEG30	8,76E+04	0,01484	169,4
	8,39E+04	0,01614	192,4
	1,42E+05	0,02439	171

5

Tabla 10. Parámetros cinéticos para compuestos PEGilados rHuIL-15 e IL-15 con superficies de subunidades IL-2R β .

Compuesto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHuIL-15	4,161E+05	3,095E-02	74,4
	4,223E+05	3,251E-02	77
	3,632E+05	2,863E-02	78,8
IL15 N77PEG30	1,101E+05	2,220E-02	201,6
	1,158E+05	2,361E-02	204
	1,099E+05	2,309E-02	210,2
IL15 S83PEG30	1,214E+05	2,517E-02	207
	1,153E+05	2,458E-02	213
	1,386E+05	2,962E-02	213,8
IL15 V49PEG30	1,061E+05	3,212E-02	302,7
	9,810E+04	3,045E-02	310,5
	9,700E+04	2,710E-02	279,5
IL15 V49PEG40b	1,187E+05	3,091E-02	260,5

Compuesto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
	1,071E+05	2,690E-02	251,2
	1,061E+05	2,552E-02	240,5
IL15 E53PEG30	5,770E+05	3,350E-02	58
	6,010E+05	3,525E-02	58,6
	6,300E+05	3,348E-02	53,1
IL 15 E46PEG30	2,01E+04	1,650E-02	823
IL 15 L25PEG30	2,06E+04	4,460E-02	2,160

En superficies de sensores que contenían IL-15R α inmovilizada, IL-15 nativa (rHuIL-15 e IL-15 comercial de R&D) mostraron asociación rápida y cinética de disociación muy lenta, lo que demostró una unión de muy alta afinidad (Fig. 9A). Las variantes PEGiladas de IL-15 diseñadas para prolongar la semivida sin bloquear la interacción con los receptores de IL-15 muestran una cinética de unión similar a la IL-15 nativa. La modesta diferencia en K_D (K_D disminuida ~10 y ~3 veces para IL-15 N77PEG30 e IL-15 S83PEG30, respectivamente) observada entre los compuestos para la subunidad se debe a la disminución de la tasa de los compuestos conjugados con IL-15 en relación con rHuIL-15, que se espera del menor coeficiente de difusión del compuesto pegilado y los efectos de apantallamiento inespecíficos de la fracción de PEG grande en superficies de unión distantes (Fig. 9B). Por el contrario, IL-15 E46PEG30 interacciona con IL-15 R α con asociación lenta y disociación lenta, mientras que IL-15 E53PEG30 muestra asociación rápida y disociación rápida (Fig. 9C) debido a la localización específica de la fracción de PEG en la superficie de unión de IL-15R α .

Las superficies que contenían IL-2 R β inmovilizada mostraron respuestas de asociación y disociación comparables tanto con IL-15 nativa como con compuestos diseñados para la extensión de la semivida con participación de receptores nativos. Los compuestos en los que la fracción de PEG está situada en la superficie de unión de IL-15R α muestran diferentes cinéticas de unión a las superficies de IL-2R β . Mientras que IL-15 E46PEG30 e IL-15 L25PEG muestran una unión reducida ~10 y ~30 veces a esta superficie, IL-15 E53PEG30 conserva la unión "nativa" a IL-2R β . Estos resultados sugieren que la localización específica de la fracción de PEG puede conferir diferentes modalidades para la interacción de IL-15 con su receptor.

Las Fig. 9A-Fig. 9C muestran unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un compuesto conjugado con IL-15 que se une a IL-15R α . El análisis de cinética de unión confirma que la pegilación específica del sitio modula la interacción con IL-15R α .

La Fig. 10 muestra unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un IL-15 N77PEG30 que se une a IL-15R α e IL-2R β . El análisis de cinética de unión confirma la pegilación específica del sitio en posición N77 conserva la interacción nativa con IL-15R α e IL-2R β .

La Fig. 11 muestra unidades de respuesta (RU, eje Y) frente al tiempo (s, eje X) para rHuIL-15, un IL-15 E53PEG30 que se une a IL-15R α e IL-2R β . El análisis de cinética de unión confirma la pegilación específica del sitio en la posición E53 reduce la unión a IL-15R α al tiempo que conserva la interacción nativa con IL-2R β .

EJEMPLO 4

Perfil de respuesta inmunitaria *Ex vivo* de conjugados de IL-15 PEG en muestras de PBMC derivadas del sistema de reducción de leucocitos humanos primarios (LRS)

Para determinar cómo la especificidad diferencial de conjugados de IL-15 PEG afecta la activación de subpoblaciones de células inmunitarias primarias, se realizó el perfil de concentración y respuesta de la activación de linfocitos en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas derivadas de LRS utilizando citometría de flujo multicolor. Estos estudios se realizaron en PrimityBio LLC (Fremont, CA). Las muestras frescas derivadas de LRS se trataron con rHuIL-15 o diferentes compuestos pegilados de IL-15 en series de dilución 5 veces comenzando con una concentración máxima de 30 μ g/mL. Las poblaciones de células tratadas se incubaron a 37°C durante 45 minutos antes de la adición de tampón de lisis/fijación BD y la tinción con el panel de anticuerpos fluorescentes mostrado en la Tabla 11. Se utilizó citometría de flujo multicolor para detectar y cuantificar la activación de pSTAT5 en diferentes subconjuntos de células Tcell y NK. Los datos de citometría de flujo se analizaron para la activación de diferentes subconjuntos de células T y NK en modo concentración-respuesta, leyendo la acumulación de pSTAT5 después del tratamiento con compuestos pegilados con rHuIL-15 o IL-15.

Tabla 11. Panel de tinción para el estudio de citometría de flujo de muestras de PBMC derivadas de LRS

Paneles	Humano
Pan-T	CD3
CD4	CD4
CD8	CD8
Marcador NK	CD7
Treg	FoxP3
Treg	CD25 (o CD127)
CD45RA	CD45RA
C62L	C62L
CD14 y CD19.	CD14 y CD19.
Fosfo	STATS (pY694)

En poblaciones de células T NK y efectoras (CD3+ CD8+), IL-15 N77PEG30 e IL-15 S83PEG30 conservaron la potencia con respecto a rHuIL-15, con valores de EC₅₀ para la producción de pSTAT5 dentro de 2 veces de la citocina nativa. Por el contrario, los valores de EC₅₀ para la inducción de pSTAT5 para IL-15 L25PEG30 en poblaciones de células T CD8+ y NK se redujeron en ~14 y ~18 veces, respectivamente, en comparación con rHuIL-15. El aumento sustancial en EC₅₀ para IL-15 L25PEG30 indica que la pegilación de IL-15 en esta posición reduce el agonismo de receptores de IL-15. Los valores de EC₅₀ para la inducción de pSTAT5 para IL-15 E53PEG30 en poblaciones de células T CD8+ y NK se redujeron solo ~2 veces en comparación con rHuIL-15. Teniendo en cuenta este compuesto muestra una rápida asociación y cinética de unión a IL-15R α .

La Tabla 12 muestra la respuesta a la dosis para la señalización de STATS (EC₅₀) en muestras de LRS humanas tratadas con conjugados de rHuIL-15 o IL-15.

Compuestos	EC50 de células T CD8+ (ng/ml)	EC50 de células NK (ng/ml)	EC50 de células T CD4+ (ng/ml)	EC50 de Treg (ng/ml)
rHuIL-15	63,6	88,3	73,7	34,7
IL-15 S83PEG30	59,4	137,8	83,3	19,2
IL-15 N77PEG30	74,0	156,2	95,6	18,2
IL-15 V49PEG30	100,9	180,2	135,1	32,6
IL-15 V49PEG40b	205,8	261,8	264,0	57,4
IL-15 E53PEG30	117,3	82,4	186,8	37,1
IL-15 L25PEG30	896,1	1,654	1,232,1	267,3

Las Fig. 12A-Fig. 12D ilustran fosforilación de STATS en células T NK y CD8+ tras la estimulación con conjugados de IL-15 PEG ilustrativos.

EJEMPLO 5

Estudio de Farmacología in vivo de conjugados de IL-15 ejemplares

Estudios de PK en ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (E3826-U1821)

Los ratones se dosificaron con los conjugados de rHuIL-15 e IL-15 S83-PEG 30kDa, V49-PEG 30kDa, L25-PEG 30kDa o N77-PEG 30kDa a 0,3 mg/Kg. Se extrajo sangre en los siguientes puntos temporales: 0,25, 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 192 horas.

La Tabla 13 muestra la configuración experimental. Cada ratón recibió una dosis IV única de cualquier vehículo, rHuIL-15 o uno de los tres conjugados de IL-15.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/Kg)
1	Vehículo	0
2	rHuIL-15	0,3
3	L25 PEG30	0,3
4	N77 PEG30	0,3
5	V49 PEG30	0,3
6	S83 PEG30	0,3

Las concentraciones de compuestos pegilados rHuIL-15, IL-15 y el estándar interno en muestras derivadas de plasma se determinaron utilizando un ensayo ELISA. El análisis de los datos de PK se realizó en NW Solutions (Seattle, WA). Los datos de PK se importaron a Phoenix WinNonlin v6.4 (CertaraPharsight, Princeton, NJ) para análisis. Los datos de la concentración plasmática media del grupo frente al tiempo se analizaron con un método de 3 compartimentos utilizando un modelo de administración en bolo IV.

La Tabla 14 muestra la semivida prolongada de los conjugados de IL-15 en ratones con respecto a rHuIL-15.

Dosis (mg/kg)	Parámetro	Unidades	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
			rHuIL-15	L25PEG	N77PEG	V49PEG	S83PEG
			Estimación				
0,3	alfa $t_{1/2}$	h	0,305	2,89	0,0349	0,242	0,381
	beta $t_{1/2}$	h	1,08	15,8	13,1	7,77	11,4
	gamma $t_{1/2}$	h	32,1	167	58,4	19,8	71,6
	MRT	h	3,81	21,2	20,5	20,6	18,7
	CL ₁	mL/hr/kg	1590	6,16	5,17	4,69	9,13
	CL ₂	mL/hr/kg	333	5,68	56,4	52,4	65,4
	CL ₃	mL/hr/kg	108	0,0317	0,157	1,03	0,213
	V ₁	mL/kg	978	82,3	3,20	32,8	79,0
	V ₂	mL/kg	397	40,7	89,8	44,9	70,1
	V ₃	mL/kg	4680	7,59	12,8	19,1	21,4
	V _{ss}	mL/kg	6050	131	106	96,8	170
	C _{máx}	ng/mL	307	3650	93700	9140	3800
	AUC	hr*ng/mL	189	48700	58100	64000	32900

La Fig. 13 muestra perfiles de concentración en plasma de rHuIL-15, IL-15 S83PEG30, IL-15 V49PEG30, IL-15 N77PEG30 e IL-15 L25 PEG30 a 0,3 mg/kg.

Como se esperaba, los compuestos pegilados presentan un perfil de PK superior con respecto a rHuIL-15 como se resume en la Tabla 14. El MRT (tiempo medio de residencia) representa el tiempo promedio en que una molécula de artículo de ensayo permanece en el cuerpo y tiene en cuenta todo el perfil de PK. Los compuestos pegilados muestran un aumento de ~5 veces en la MRT en comparación con rHuIL-15. El IL-15 S18PEG30 demostró ~15 veces la beta $t_{1/2}$ extendida (15,8 h frente a 1,08 h) y aproximadamente 59 veces la CL₂ reducida (5,68 frente a 333 mL/h/Kg) en comparación con el rHuIL-15. El volumen de distribución de los compuestos pegilados se redujo con respecto a rHuIL_15, lo que sugiere que los compuestos pegilados se distribuyen principalmente dentro de la circulación sistémica.

EJEMPLO 6

Observaciones farmacodinámicas en compartimento sanguíneo periférico

Estudios de PD en ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (E3826-U1821)

Se administró a los ratones rHuIL-15, conjugado de IL-15 S18-PEG 30kDa, conjugado de IL-15 V49-PEG 30kDa o conjugado de IL-15 S83-PEG 30kDa a 0,1, 0,3 o 1 mg/Kg (Tabla 10). Se extrajo sangre en los siguientes puntos temporales: 0,25, 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 192 horas. Se incluyó un punto temporal adicional de 0,13 para rHuIL-15 dada la semivida corta conocida. Las lecturas de PD incluyeron seguimiento intracelular de pSTAT5 y fenotipado de células T CD8+ para todos los puntos temporales.

La Tabla 15 muestra la configuración experimental. Cada ratón recibió una dosis IV única de cualquier vehículo, rHuIL-15 o uno de los tres conjugados de IL-15.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)
1	Vehículo	0
2	rHuIL-15	0,3
3	S18 PEG30	0,1
4	S18 PEG30	0,3
5	V49 PEG30	0,1
6	V49 PEG30	0,3
7	L25 PEG30	0,3
8	L25 PEG30	1,0

Se utilizó la fosforilación de STATS y la inducción de la proliferación celular (el marcador molecular temprano Ki-67 y recuentos de células) como lecturas farmacodinámicas para evaluar el perfil farmacológico de IL-15 S18PEG30, IL-15 V49PEG30 e IL-15 L25 PEG30. Si bien se observó una elevación menor o similar de pSTAT5 en ratones a los que se dosificaron compuestos pegilados, la fosforilación STAS se tradujo en una proliferación más alta y se mantuvo (días 1 a 7 después de la dosis) de células NK y células T CD8+ efectoras y de memoria, pero no células Treg. (Figuras 14-17).

Las Fig. 14A-Fig. 14D muestran % de pSTAT5 en diferentes poblaciones de células sanguíneas periféricas.

Las Fig. 15A-Fig. 15D muestran una expresión aumentada del marcador molecular de proliferación temprana Ki67 en células T CD8+, Tmem CD8+ y NK, pero no células Treg en animales a los que se dosificaron compuestos pegilados.

Las Fig. 16A-Fig. 16C muestran células T CD8+ periféricas robustas, Tmem CD8+ y NK, pero no células Treg en animales a los que se dosificaron compuestos pegilados.

Las Fig. 17A-Fig. 17B muestran una mayor expresión de Ki67 en células T CD8+ y NK con una mayor dosis del compuesto IL-15 L25PEG30 en ratones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de interleucina 15 (IL-15) modificado que comprende al menos un aminoácido no natural unido covalentemente a una fracción conjugante,
 5 en donde la fracción conjugante comprende un polímero hidrosoluble;
 en donde el polipéptido IL-15 modificado comprende al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
 en donde el al menos un aminoácido no natural comprende un grupo azido; y en donde:
 (A) la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25, N77, V49 y S83, en donde las
 10 posiciones del residuo corresponden a las posiciones expuestas en la SEQ ID NO: 1, y en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición en el polipéptido que mejora la semivida, en donde la semivida mejorada se compara con una semivida de una proteína IL-15 de tipo salvaje; o
 (B) la posición del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25, E46 y E53, en donde las posiciones
 15 del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1, y en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición en el polipéptido que reduce la unión entre el polipéptido IL-15 modificado y el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α) pero conserva una unión significativa con el complejo de señalización del receptor de interleucina 15 $\beta\gamma$ (IE-15R $\beta\gamma$) para formar un complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$, en donde la unión reducida a IL-15R α se compara con la unión entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje e IL-15R α .
- 20 2. El polipéptido IL-15 modificado de la reivindicación 1, en donde un aminoácido se reemplaza por el aminoácido no natural.
3. El polipéptido IL-15 modificado de la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido IL-15 modificado comprende al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
- 25 4. El polipéptido IL-15 modificado de una de las reivindicaciones 1-3, en donde la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25, N77, V49 y S83, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1, y en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición en el polipéptido que mejora la semivida, en donde la semivida mejorada se compara con una semivida de una proteína IL-15 de tipo salvaje.
- 30 5. El polipéptido IL-15 modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la posición del residuo del al menos un aminoácido no natural se selecciona entre L25, E46 y E53, en donde las posiciones del residuo corresponden a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 1, y en donde el al menos un aminoácido no natural está en una posición en el polipéptido que reduce la unión entre el polipéptido IL-15 modificado y el receptor de interleucina 15 α (IL-15R α) pero conserva una unión significativa con el complejo de señalización del receptor de interleucina 15 $\beta\gamma$ (IE-15R $\beta\gamma$) para formar un complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$, en donde la unión reducida a IL-15R α se compara con la unión entre un polipéptido IL-15 de tipo salvaje e IL-15R α .
- 35 6. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde:
 (i) el grupo azido del al menos un aminoácido no natural está unido a una fracción aromática a través de un engarce alquilo; o
 (ii) el al menos un aminoácido no natural comprende N6-azidoetoxi-L-lisina (AZK), p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF) o p-azido-L-fenilalanina.
- 40 7. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polímero hidrosoluble comprende polietilenglicol (PEG), opcionalmente en donde el PEG (i) es una molécula de PEG lineal y/o (ii) tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 85 kDa, tal como aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 35 kDa,
 50 aproximadamente 40 kDa, aproximadamente 45 kDa, o aproximadamente 50 kDa.
8. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la fracción conjugante está unida a al menos un aminoácido no natural del polipéptido IL-15 modificado a través de un engarce, opcionalmente en donde el engarce comprende un engarce homobifuncional, un engarce heterobifuncional, un engarce dipeptídico escindible o no escindible, un espaciador o una combinación de los mismos.
- 55 9. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polipéptido IL-15 modificado comprende una delección N-terminal, opcionalmente en donde la delección N-terminal comprende una delección del primer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos del extremo N, en donde las posiciones del residuo están en referencia a las posiciones de la SEQ ID NO: 1.
- 60 10. El polipéptido IL-15 modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-9, en donde:
 (i) el polipéptido IL-15 modificado es capaz de expandir las poblaciones de células efectoras CD8+ sin tratamiento previos, células de memoria efectoras CD8+, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT) o una combinación de las mismas;
 65 (ii) la fracción conjugante o el al menos un aminoácido no natural deteriora o bloquea la unión del polipéptido IL-

15 modificado con IL-15R α ;

(iii) la fracción conjugante o el al menos un aminoácido no natural aumenta la unión del polipéptido IL-15 modificado a IL-15R β y/o IL-15R γ ;

(iv) la activación de la población de células efectoras CD8+ sin tratamiento previo, células de memoria efectoras CD8+, células asesinas naturales (NK) o células T asesinas naturales (NKT) a través del complejo IL-15R $\beta\gamma$ mediante el polipéptido IL-15 modificado conserva una potencia significativa de activación de dicha población celular en relación con un polipéptido IL-15 de tipo salvaje; y/o

(v) la potencia de señalización del receptor del polipéptido IL-15 modificado al complejo IL-15R $\beta\gamma$ es mayor que una potencia de señalización del receptor de un polipéptido IL-15 de tipo salvaje al complejo IL-15R $\beta\gamma$.

11. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-9, en donde la fracción conjugante o el al menos un aminoácido no natural prolonga la semivida pero no deteriora ni bloquea la unión del polipéptido IL-15 modificado con receptores de IL-15, opcionalmente en donde la semivida mejorada del polipéptido IL-15 modificado es (a) al menos 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, o más larga que la semivida plasmática de un polipéptido IL-15 de tipo salvaje, o (b) aproximadamente 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días.

12. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde la composición farmacéutica se formula para la administración parenteral.

13. El polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección proliferativa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido IL-15 modificado o la composición farmacéutica, opcionalmente en donde el sujeto es un ser humano.

14. El polipéptido IL-15 modificado o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13, en donde la enfermedad o afección proliferativa es un cáncer, opcionalmente en donde el cáncer es:

(i) un cáncer de tumor sólido, opcionalmente en donde el cáncer de tumor sólido es cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer ocular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata; o

(ii) una neoplasia maligna hematológica, opcionalmente en donde la neoplasia maligna hematológica es leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma extraganglionar de células B de zona marginal, linfoma ganglionar de células B de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grado no de Burkitt, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma esplénico de zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de efusión o granulomatosis linfomatoide.

15. El polipéptido IL-15 modificado o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13 o 14, en donde el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional, opcionalmente en donde:

(i) el polipéptido IL-15 modificado, o la composición farmacéutica, y el agente terapéutico adicional se administran simultáneamente;

(ii) el polipéptido IL-15 modificado, o la composición farmacéutica, y el agente terapéutico adicional se administran secuencialmente;

(iii) el polipéptido IL-15 modificado, o la composición farmacéutica, se administra antes del agente terapéutico adicional; o

(iv) el polipéptido IL-15 modificado, o la composición farmacéutica, se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

16. Un método ex vivo o in vitro de expansión de poblaciones de células T efectoras (Teff), células T de memoria (Tmem) y células asesinas naturales (NK), que comprende:

poner en contacto una célula con el polipéptido IL-15 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 12; y

hacer interaccionar el polipéptido IL-15 modificado con las subunidades IL-15R β e IL-15R γ para formar un complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$;

en donde el polipéptido IL-15 modificado tiene una afinidad disminuida a la subunidad IL-15R α con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje, y en donde el complejo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula la expansión de las células Teff, Tmem y/o NK, opcionalmente en donde la célula es una célula eucariota, una célula de mamífero y/o una célula humana.

17. El método ex vivo o in vitro de la reivindicación 16, en donde:

- 5 (i) la afinidad disminuida es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o una disminución del 99 % en la afinidad de unión a IL-15R α con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje;
- (ii) la afinidad disminuida a IL-15R α es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más con respecto a un polipéptido IL-15 de tipo salvaje; o
- (iii) la fracción conjugante deteriora o bloquea la unión del polipéptido IL-15 modificado con IL-15R α .

FIG. 1

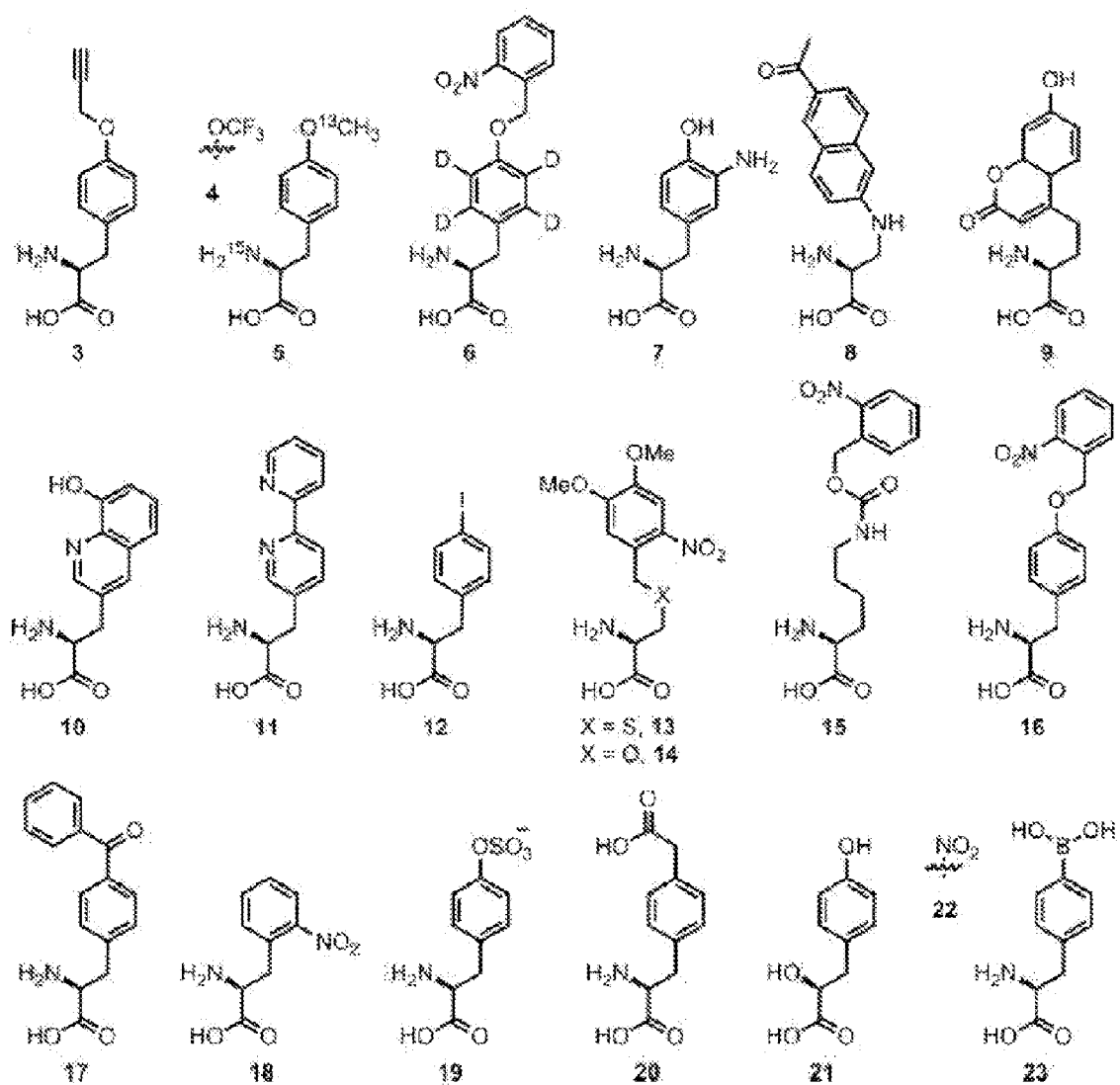


FIG. 2A

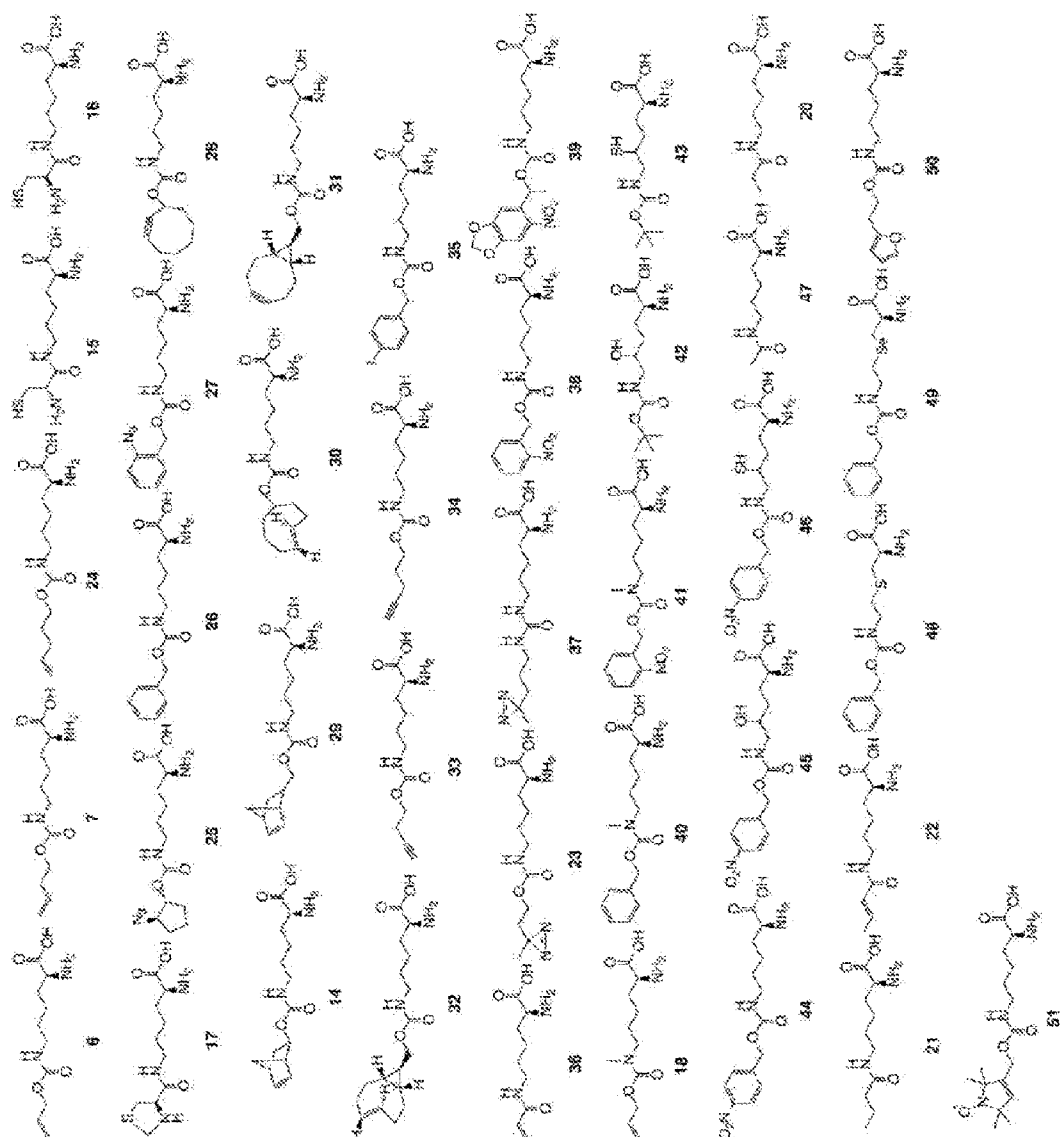


FIG. 2B

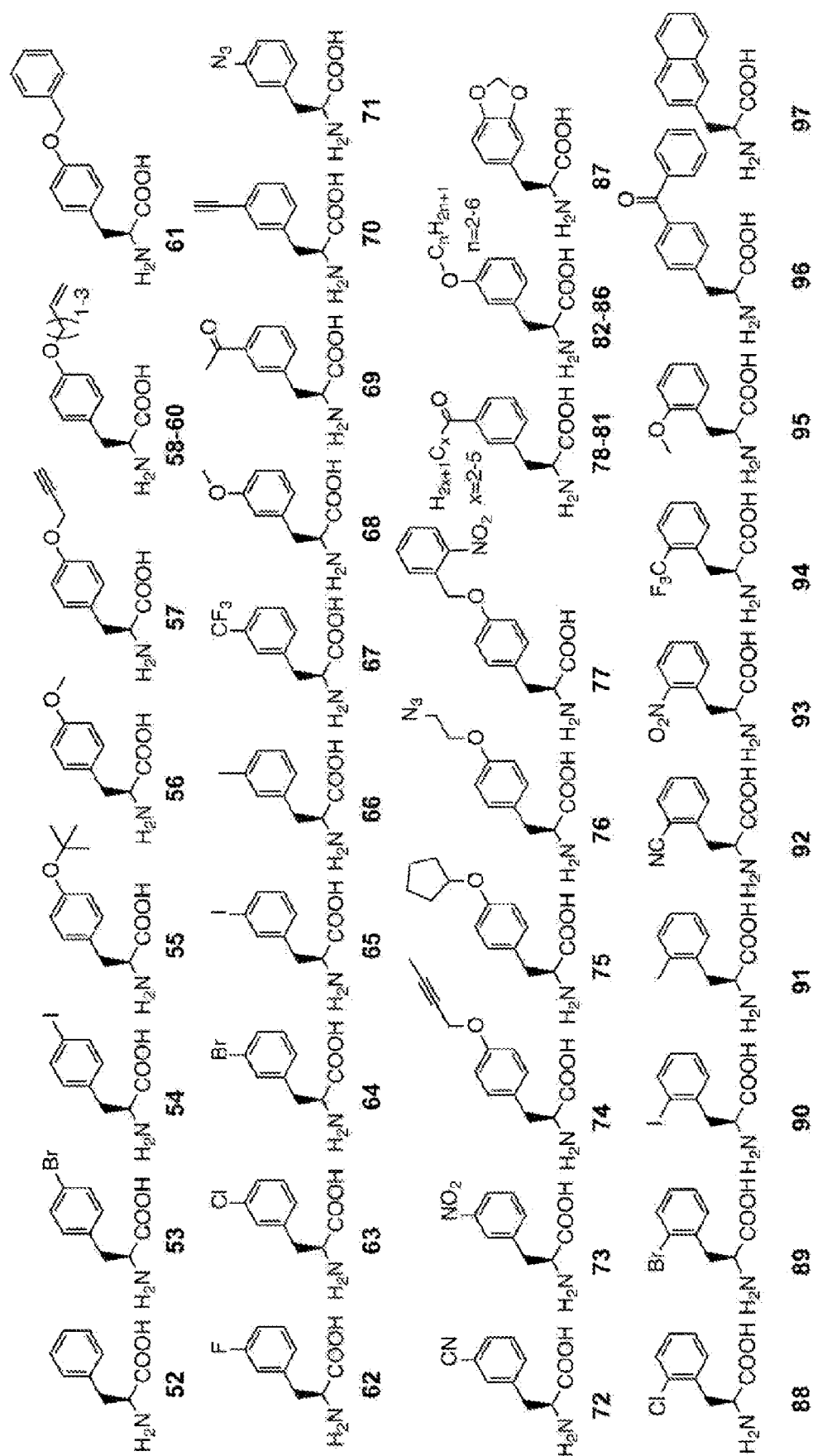


FIG. 3A

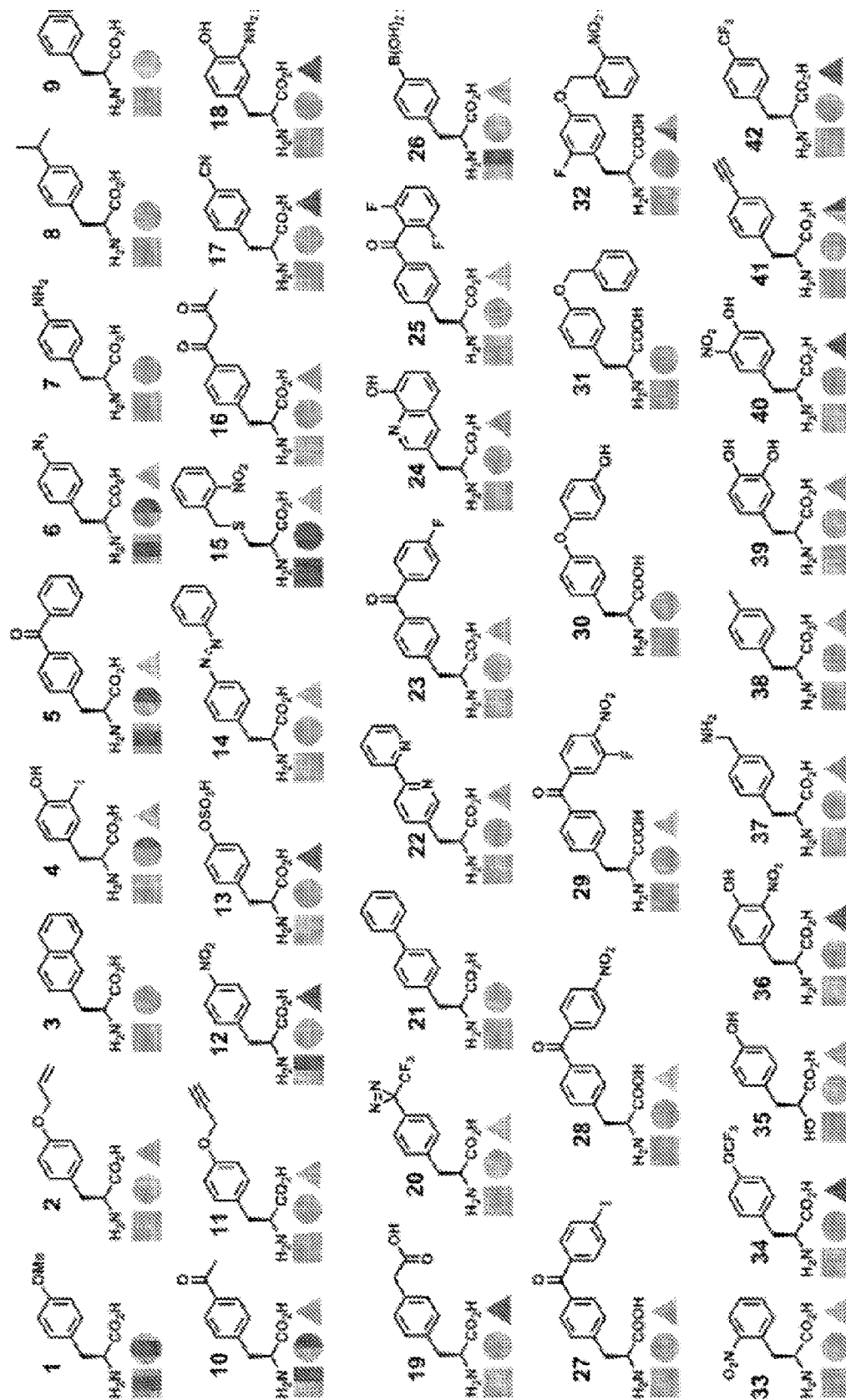


FIG. 3B

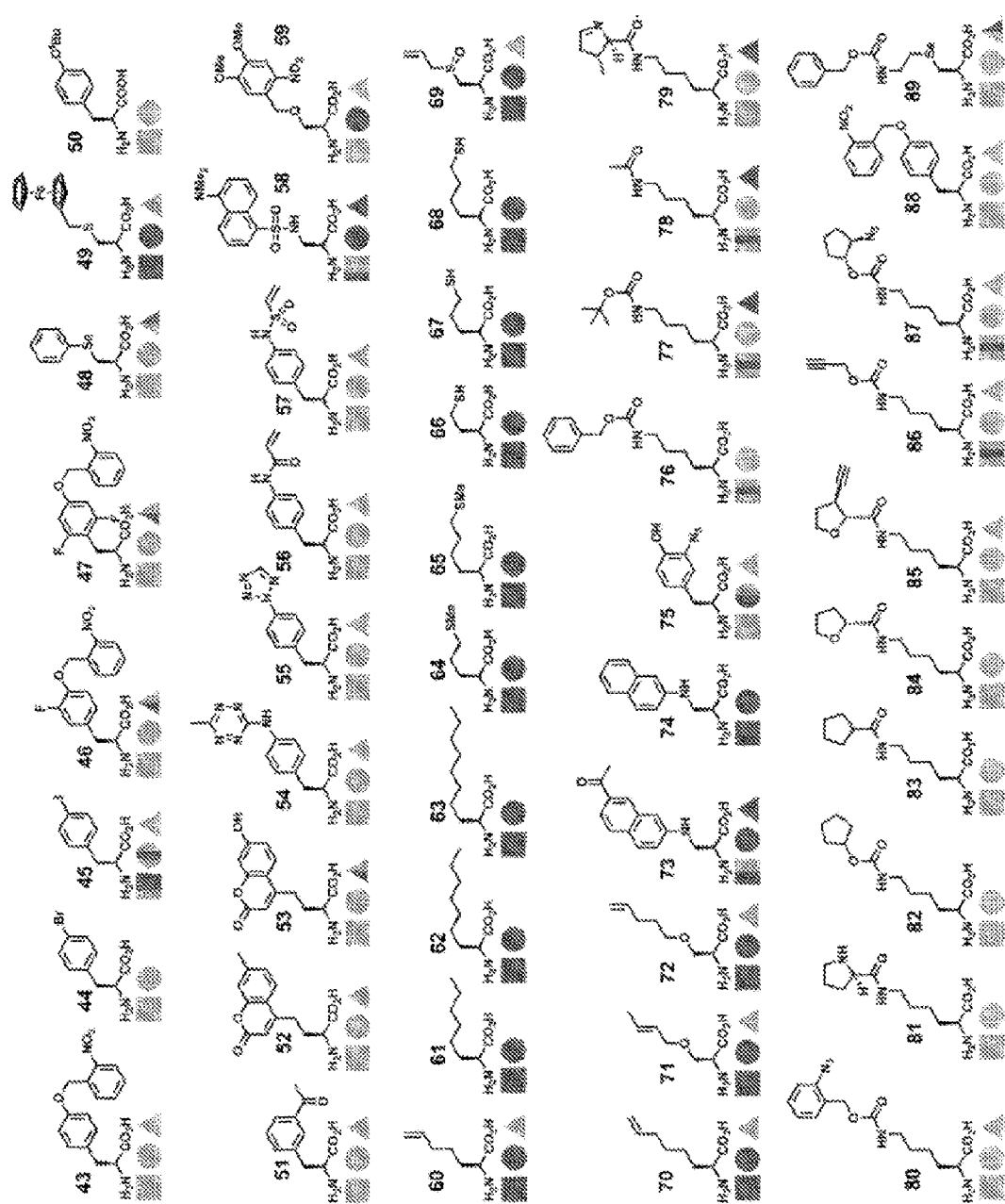


FIG. 3C

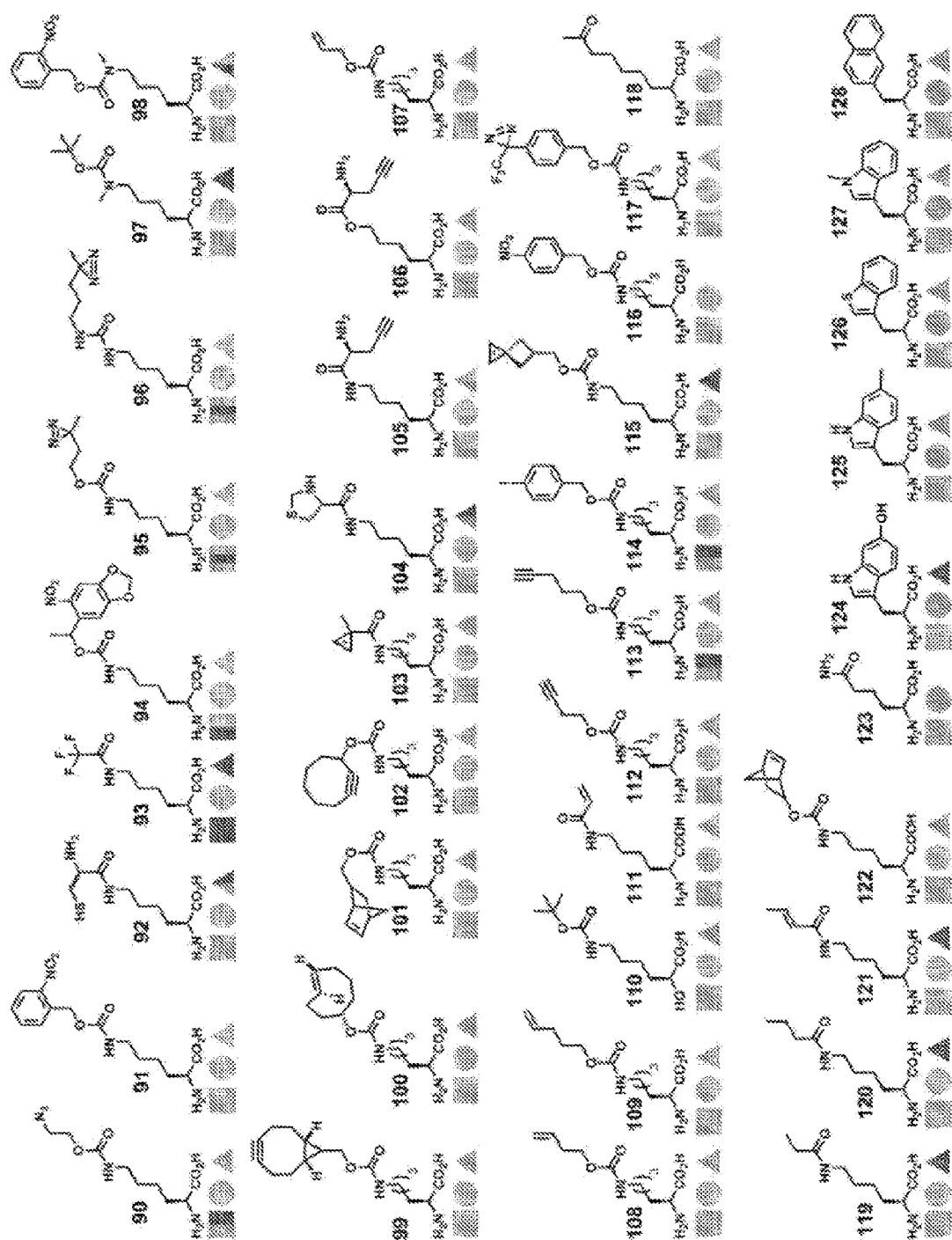


FIG. 3D

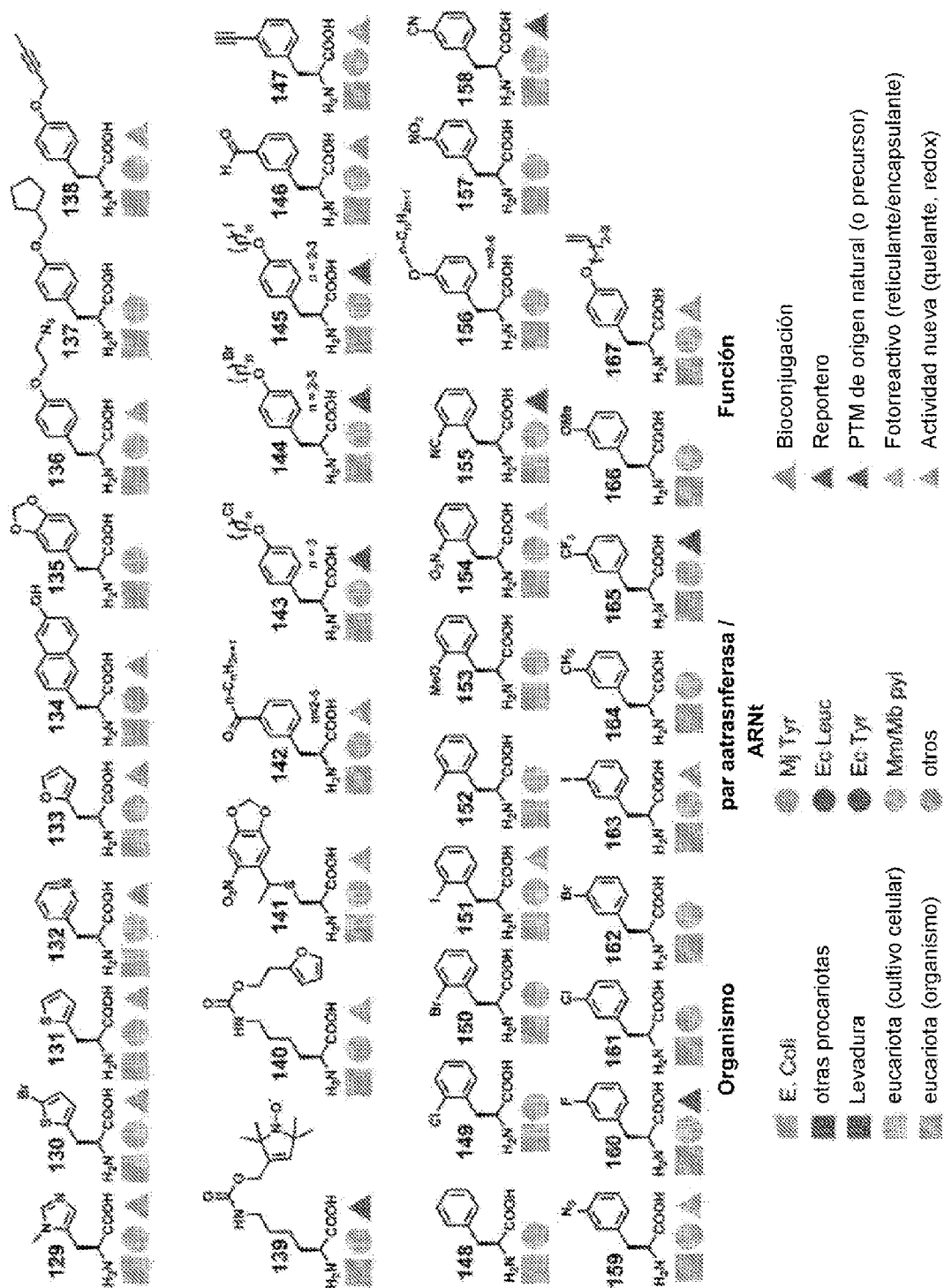


FIG. 4

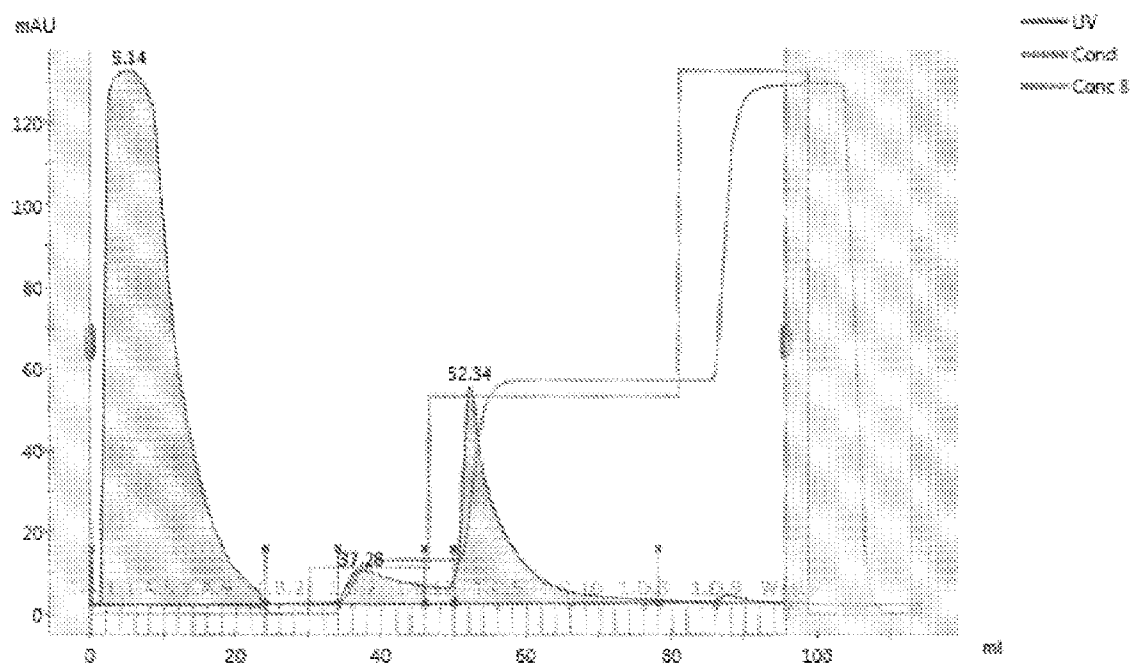


FIG. 5

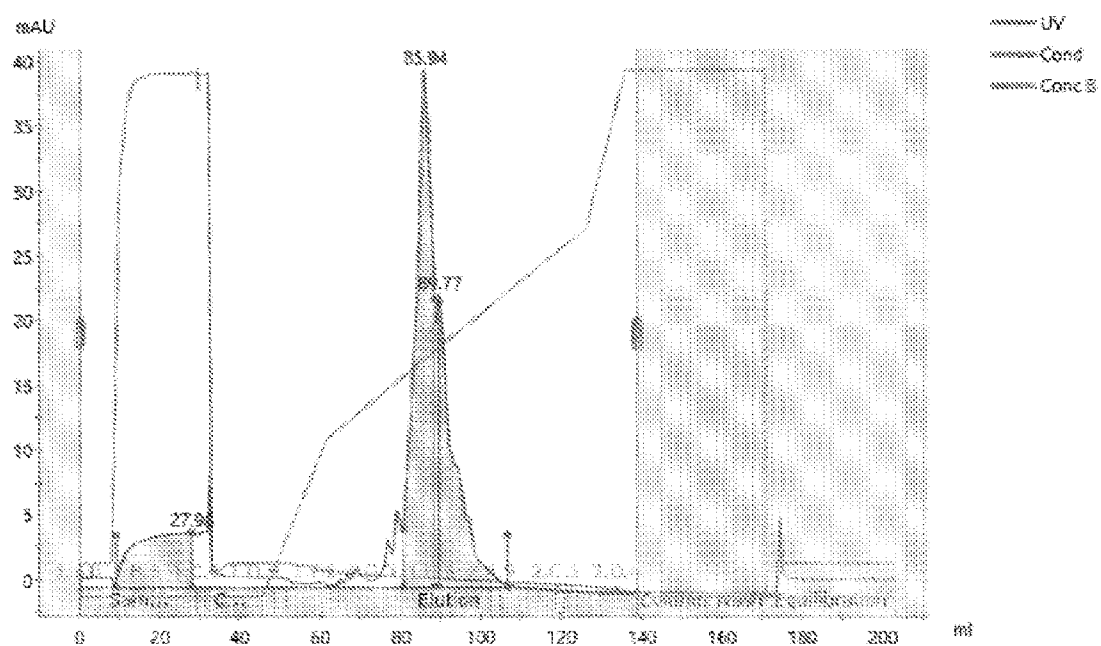
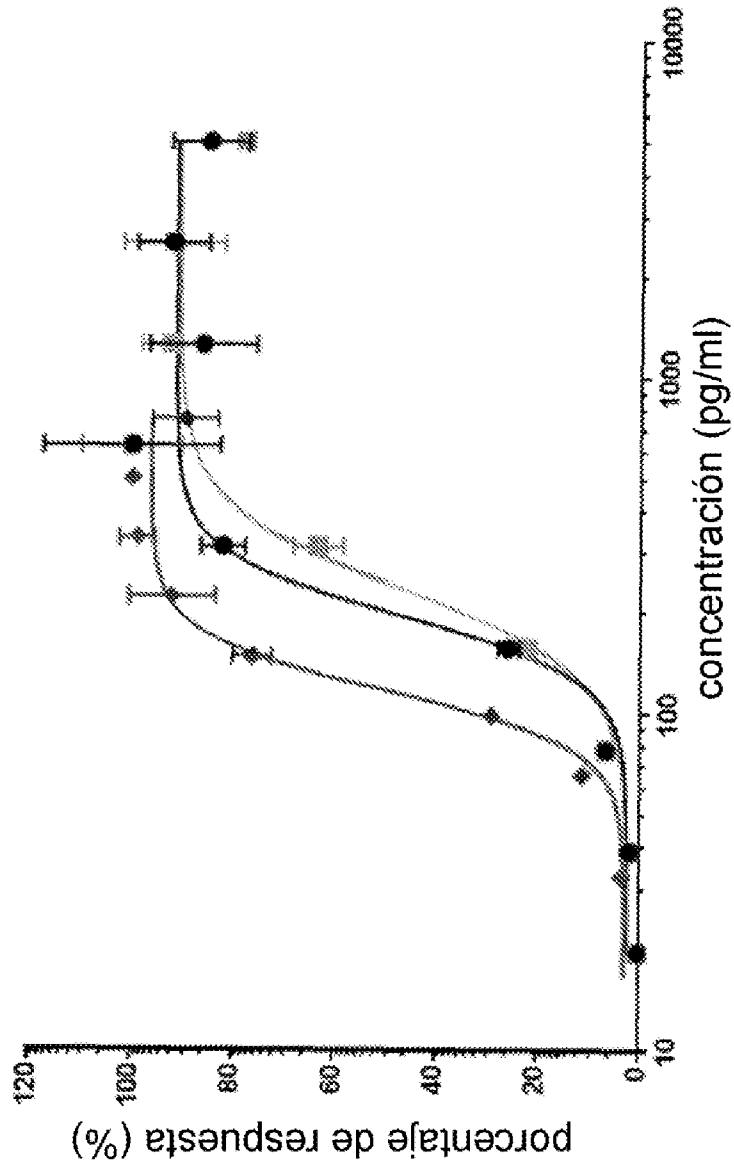


FIG. 6

Objetivos de semivida prolongada



◆ IL-15
● S83PEG30
▨ N77PEG30

Compuesto	EC50 (pg/mL)
IL-15	116,5
S83PEG30	194,5
N77PEG30	233

FIG. 7

Objetivos “no alfa”

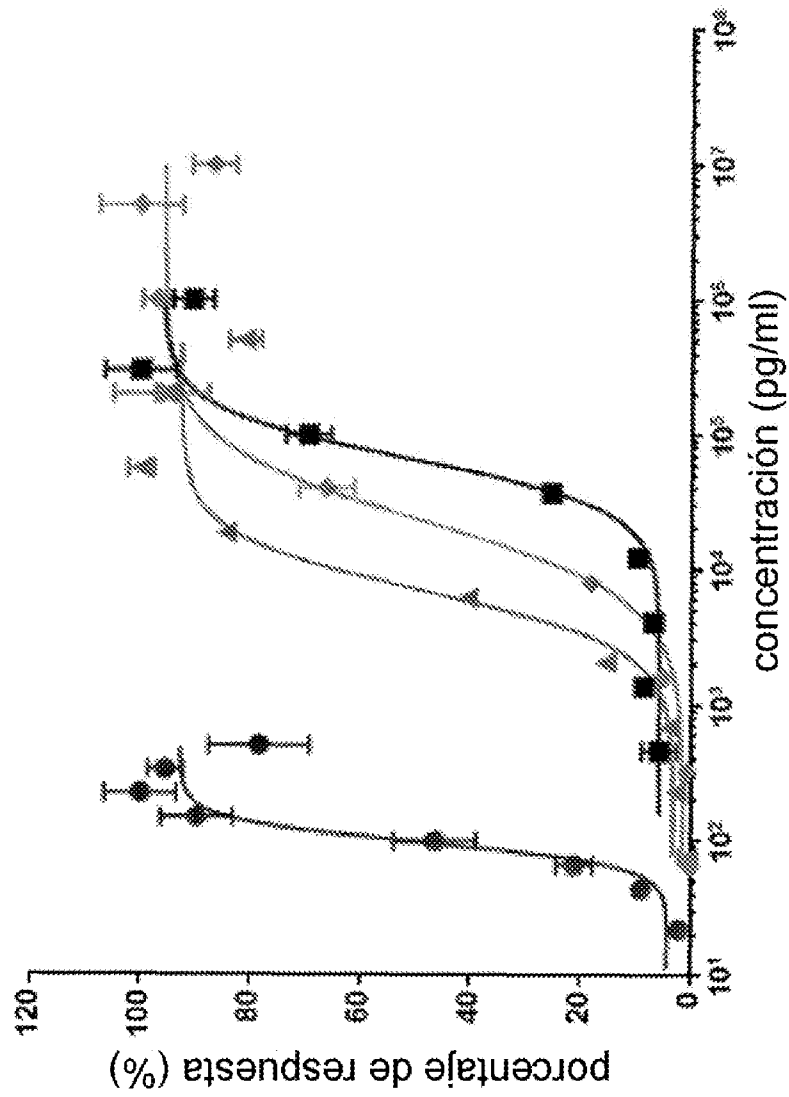
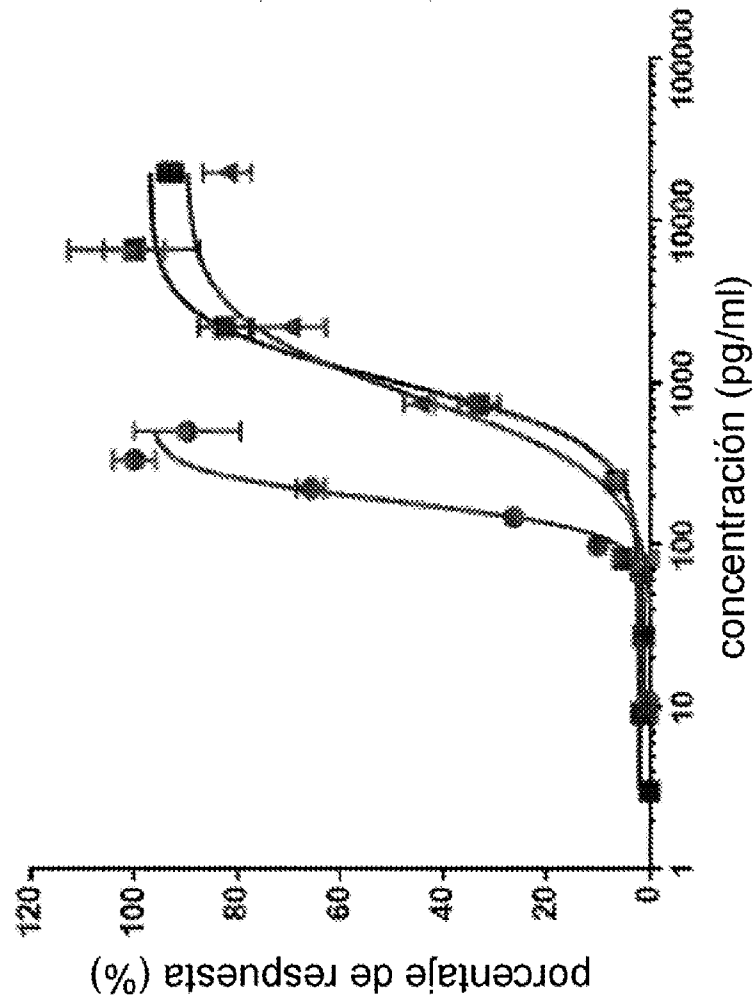


FIG. 8

Bioconjugación utilizando diferentes PEG de diferentes tamaños



- ◆ IL-15
- ▲ V49 PEG30
- V49 PEG40b

Compuesto	EC50 (pg/mL)
IL-15	184,5
V49 PEG30	807,4
V49 PEG40b	1,019

FIG. 9A

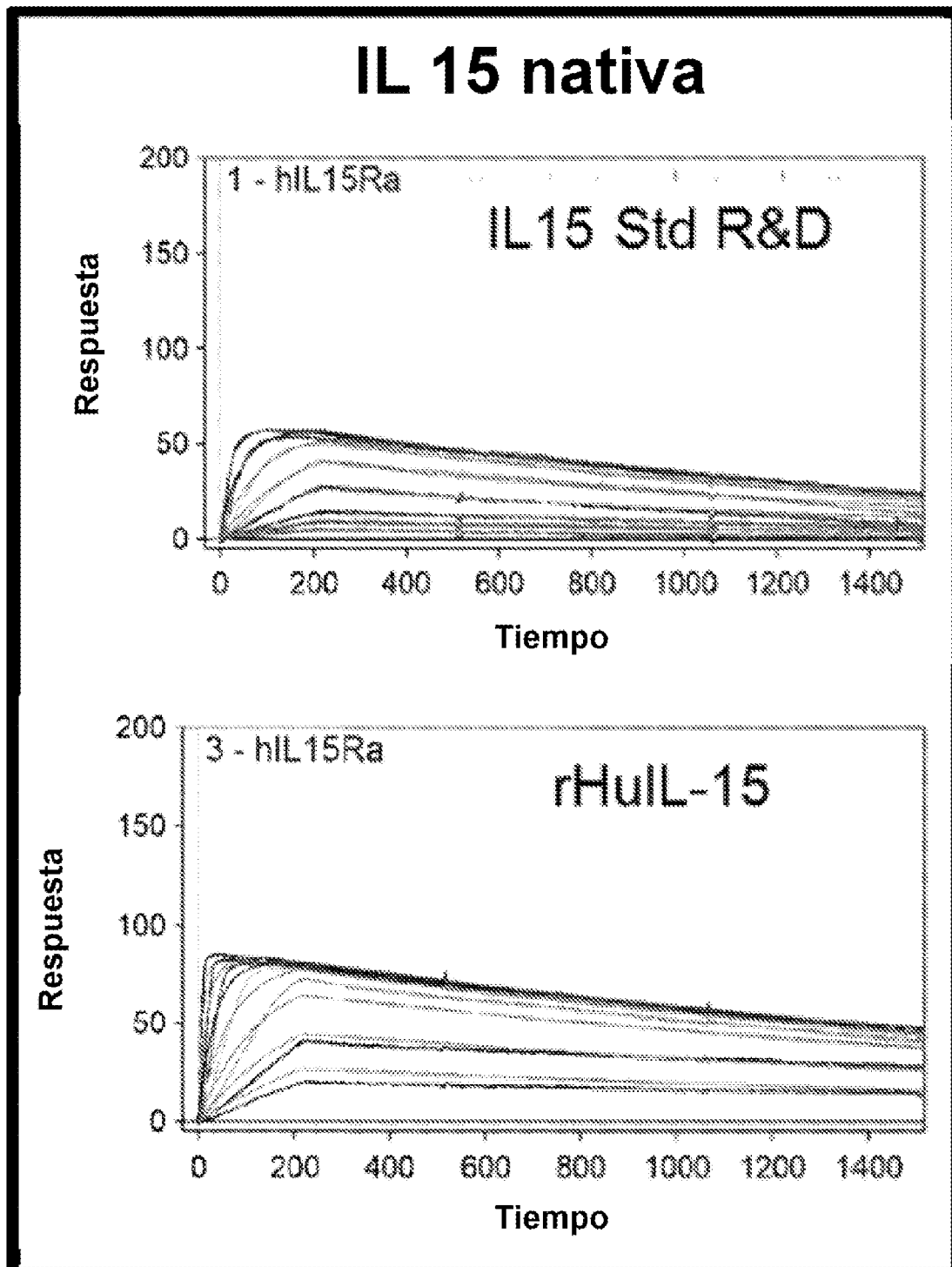


FIG. 9B

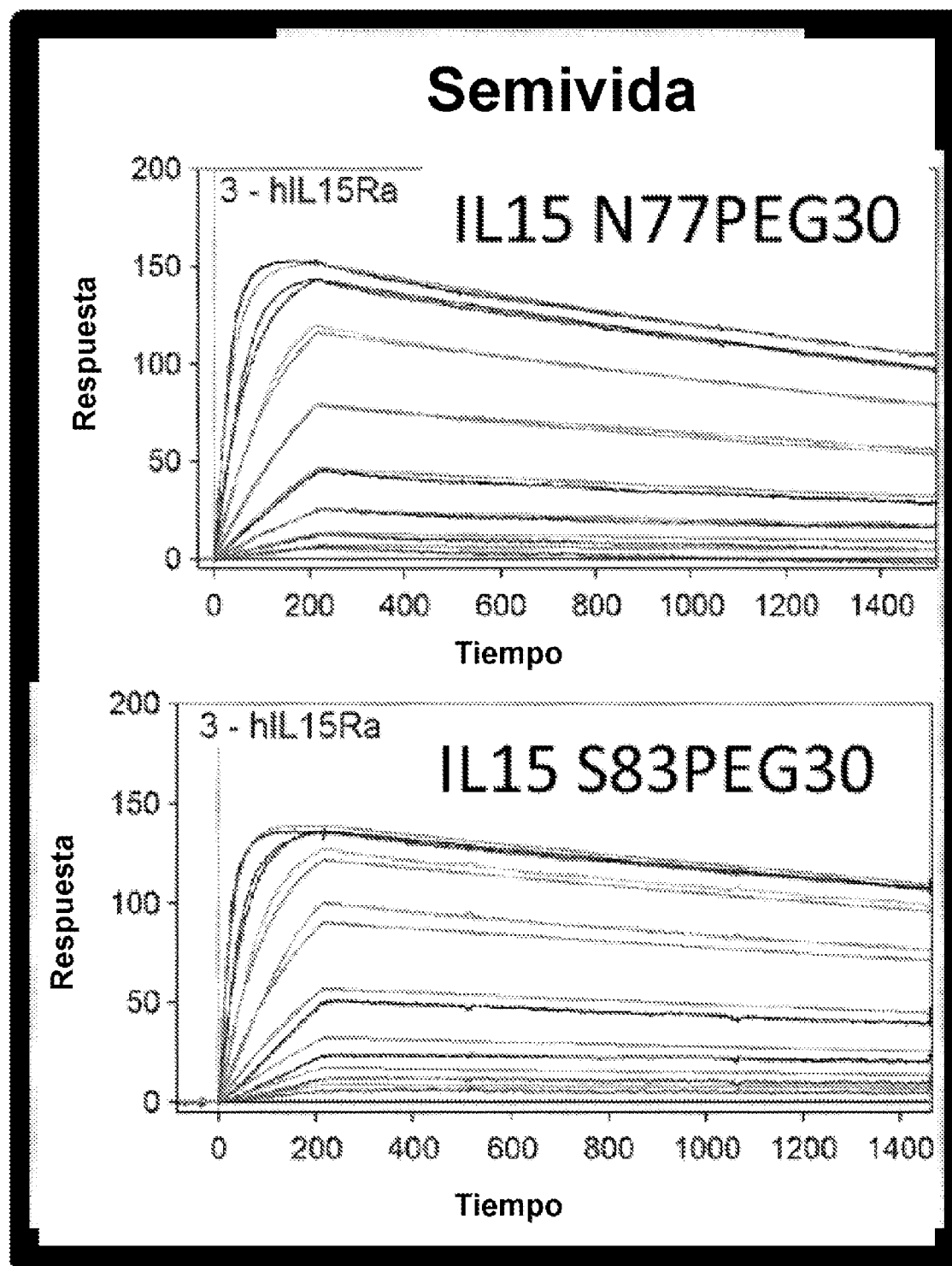


FIG. 9C

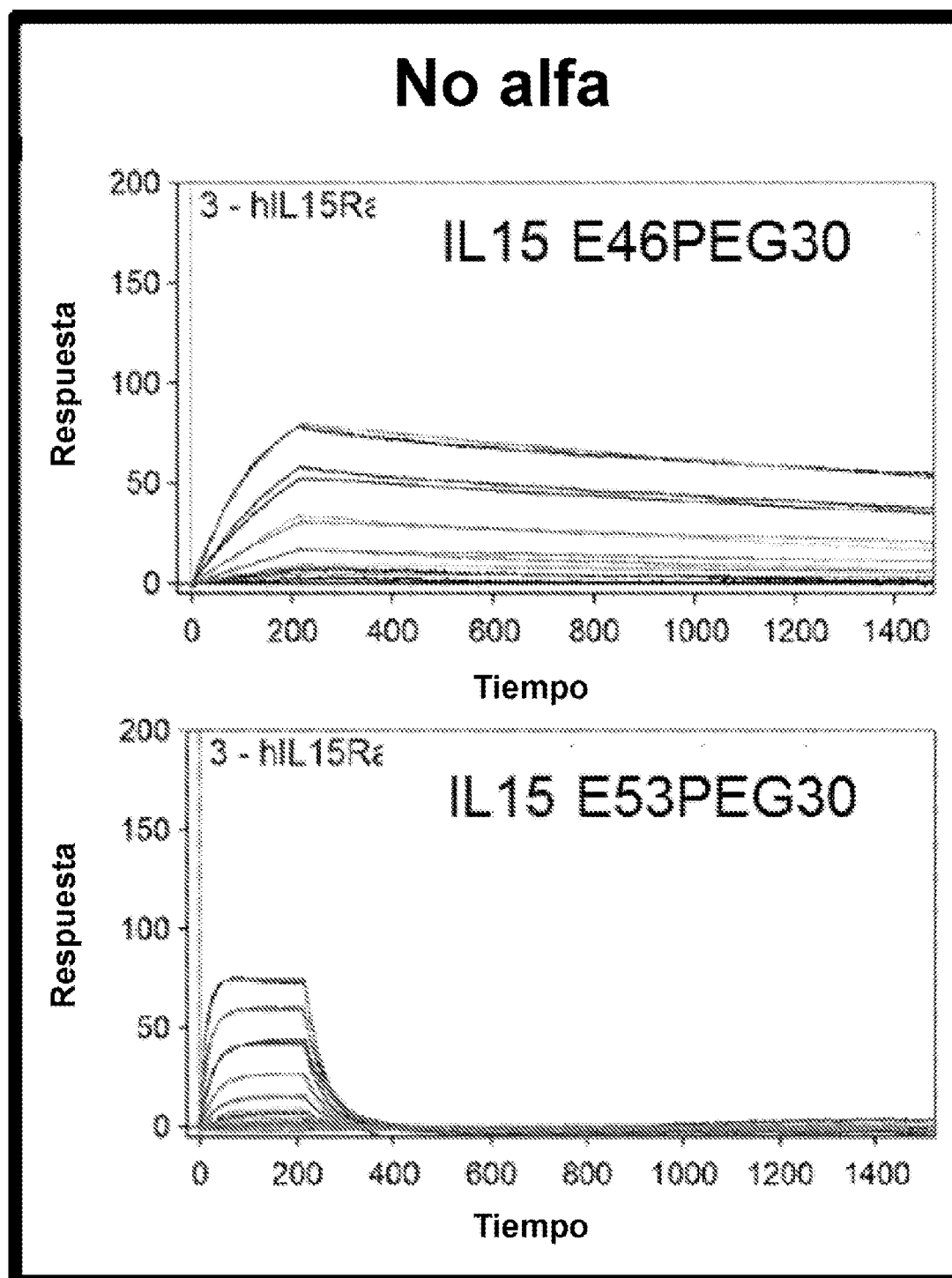


FIG. 10

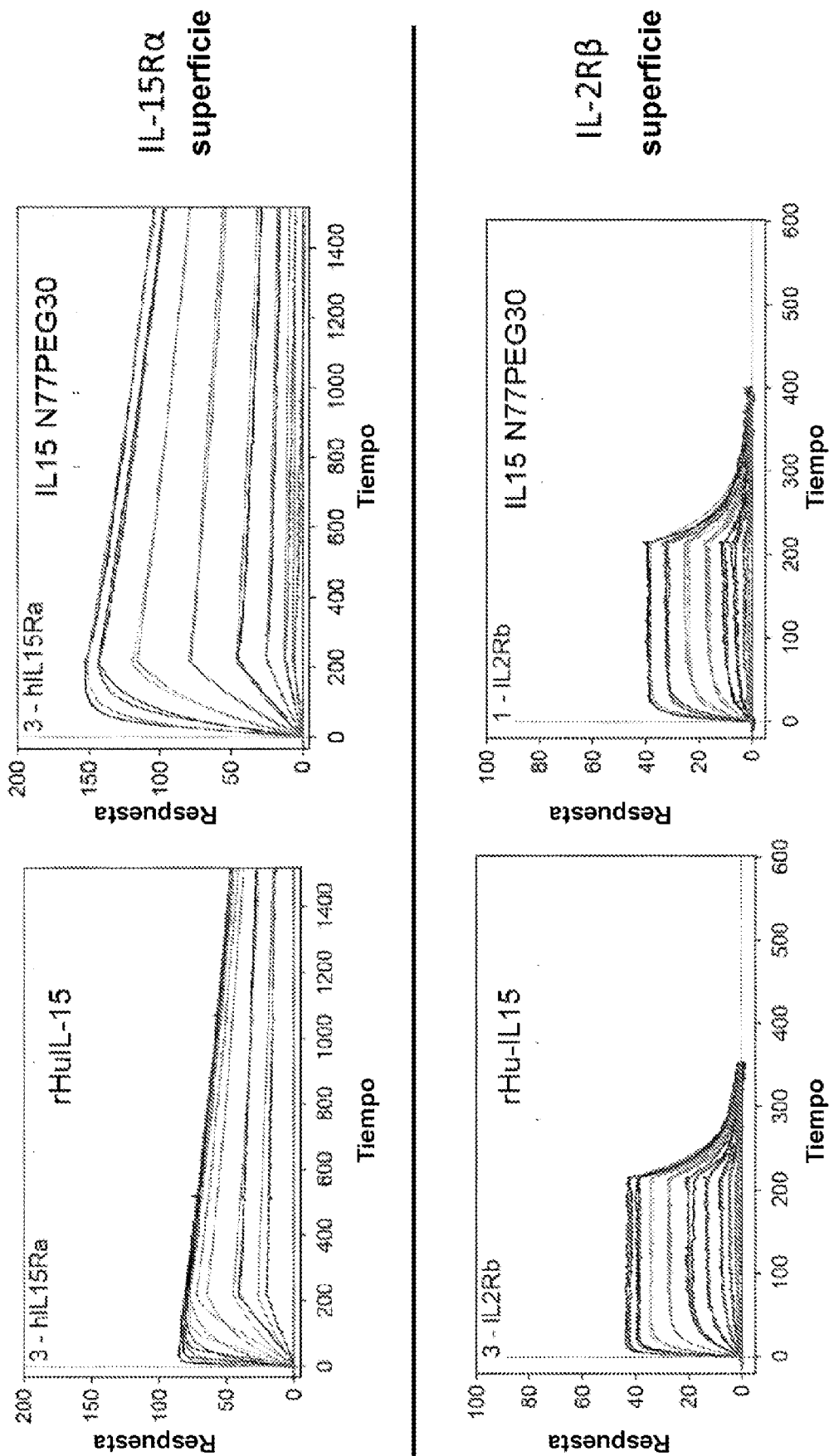


FIG. 11

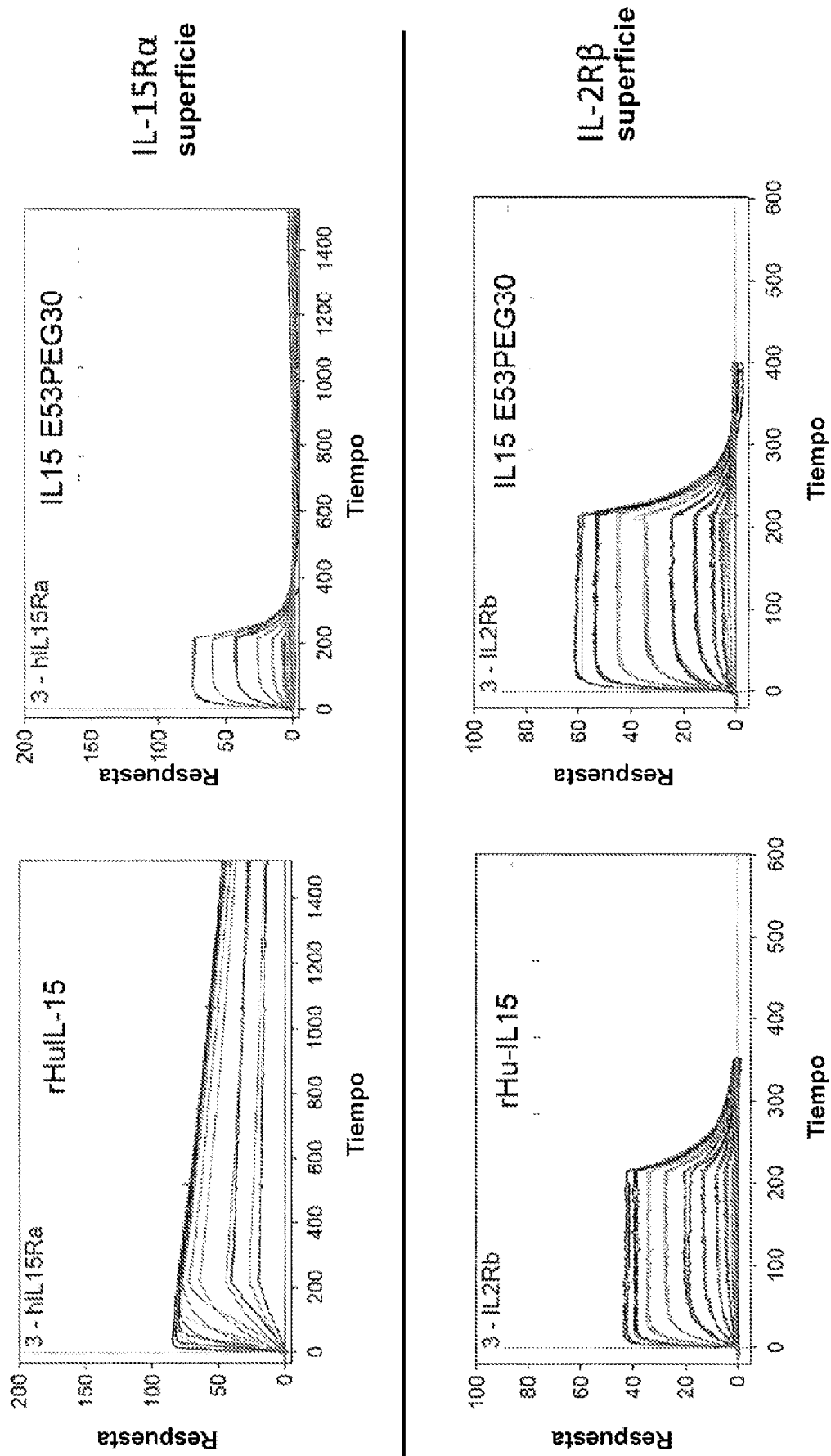


FIG. 12B

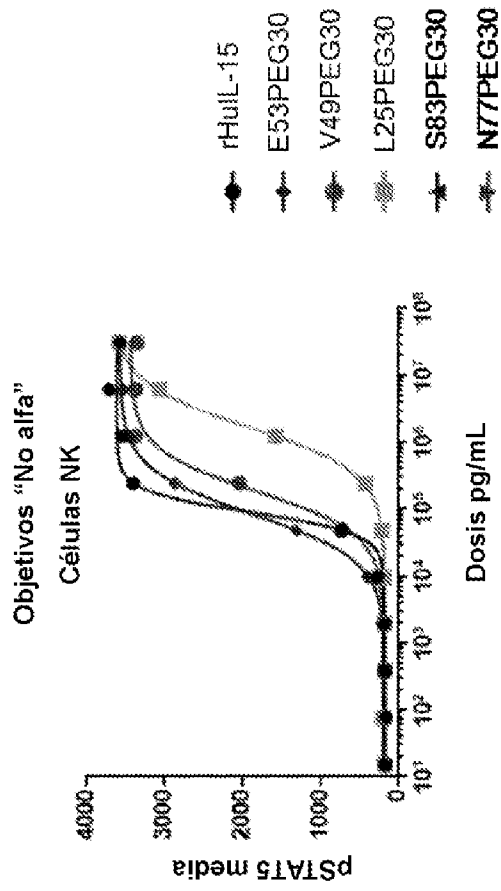


FIG. 12A

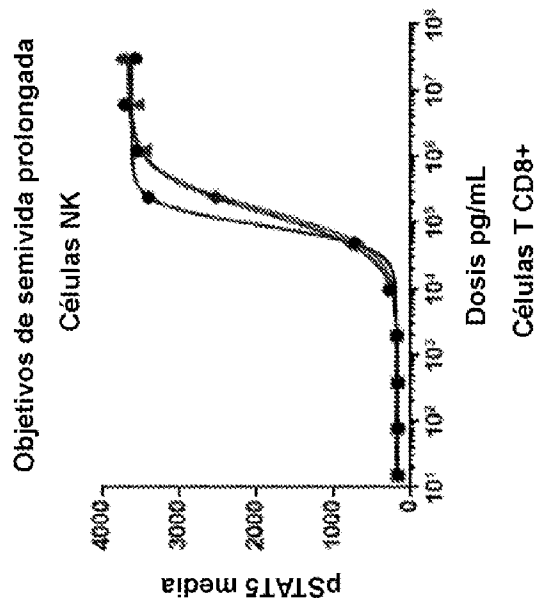


FIG. 12C

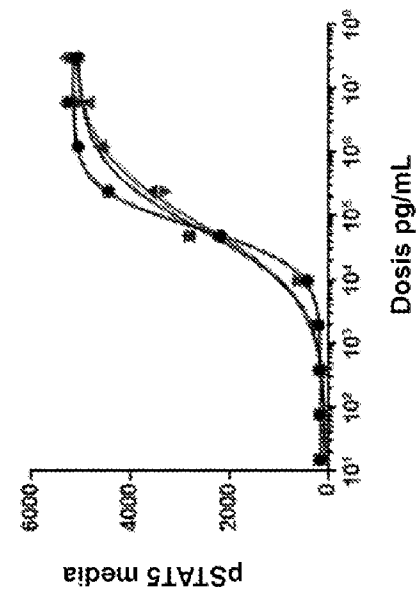


FIG. 12D

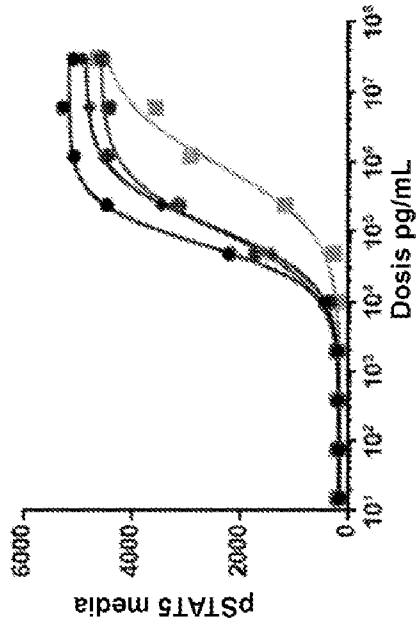


FIG. 13

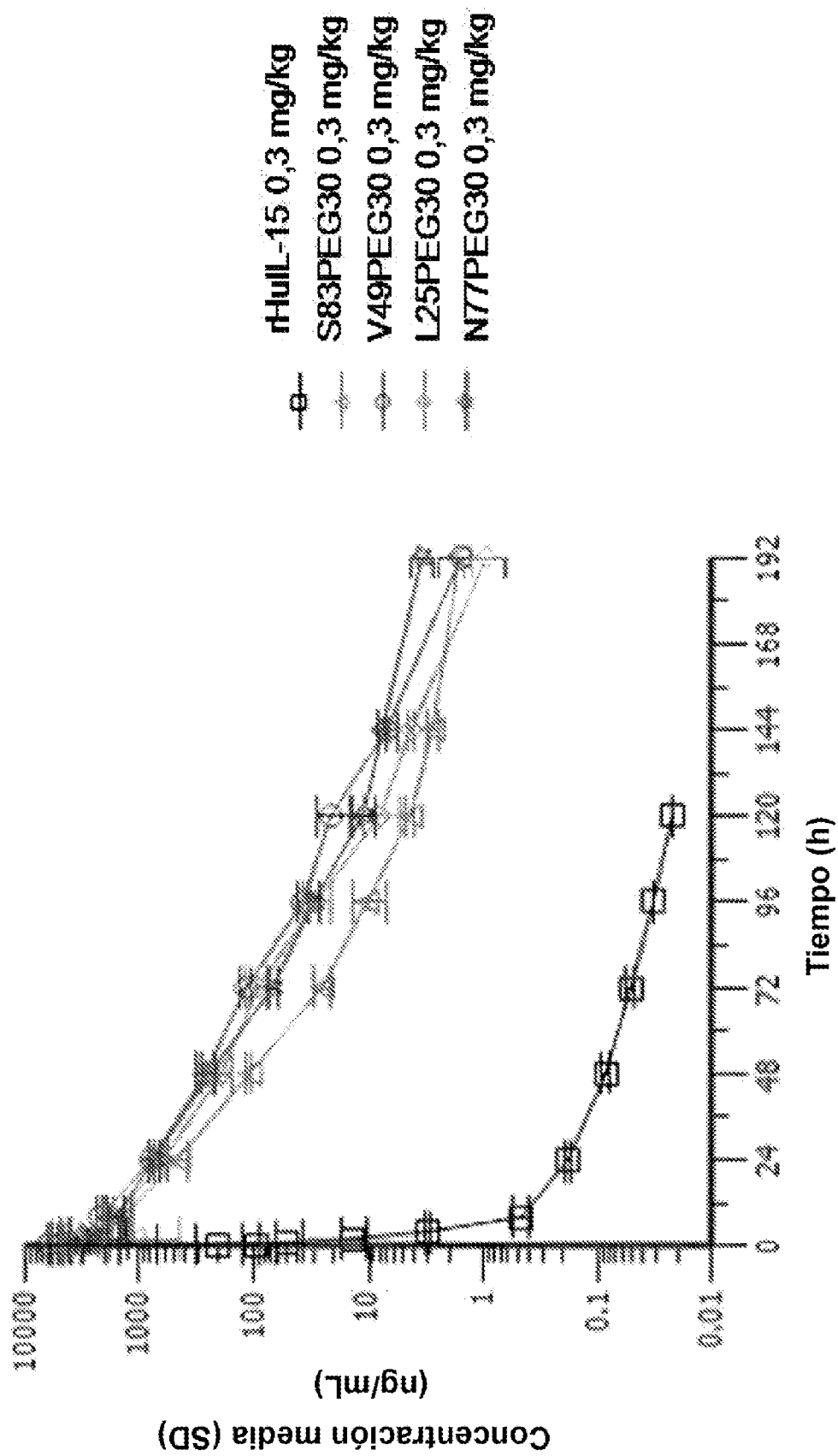


FIG. 14A

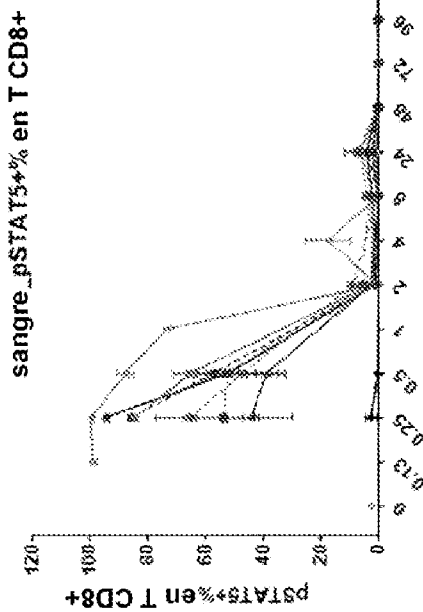


FIG. 14B

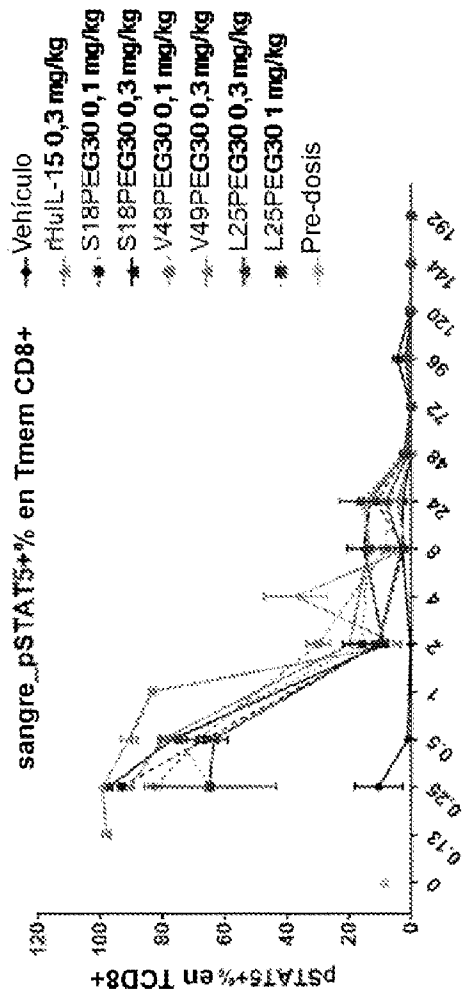


FIG. 14C

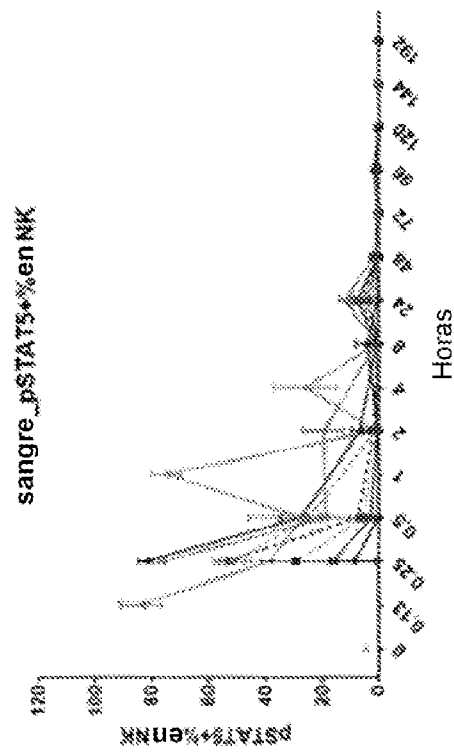


FIG. 14D

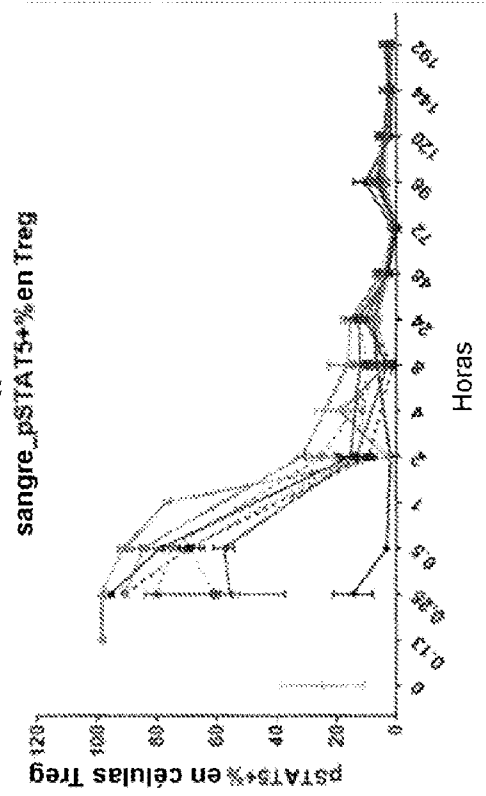


FIG. 15A

sangre_Ki67% en T CD8+

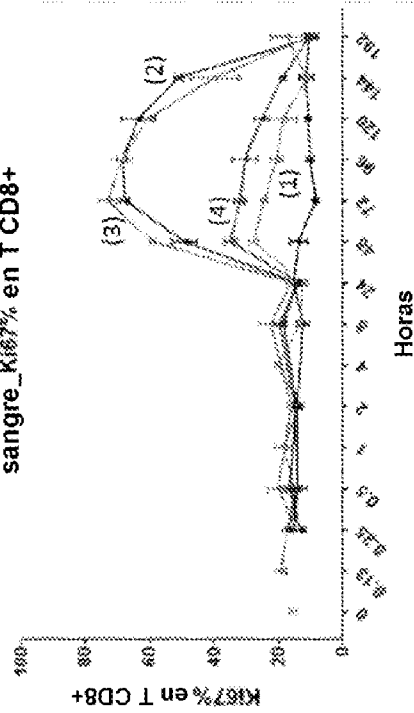
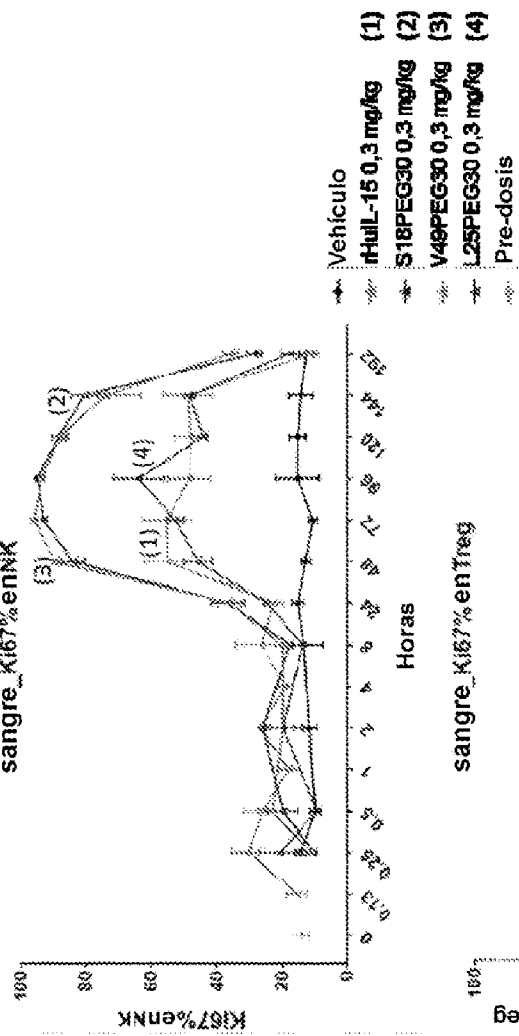
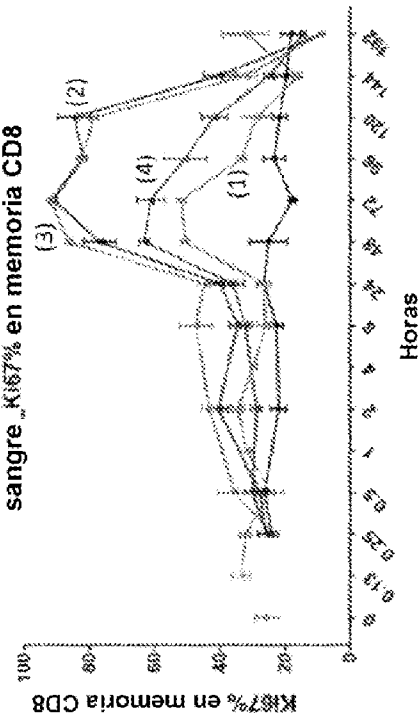


FIG. 15B

sangre_Ki67% en NK



sangre_Ki67% en memoria CD8



sangre_Ki67% en Treg

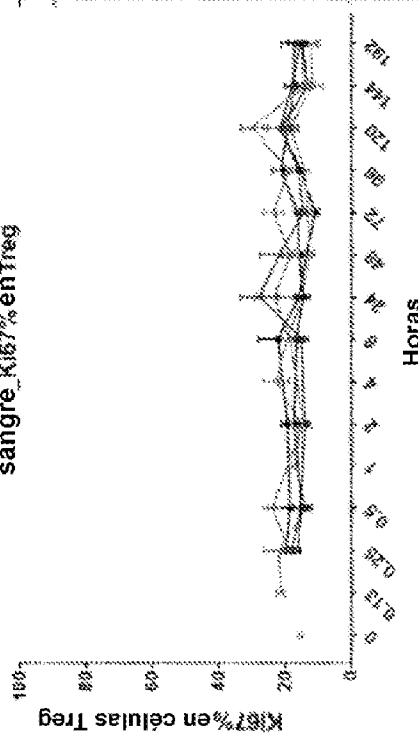


FIG. 15C

FIG. 15D

FIG. 16B

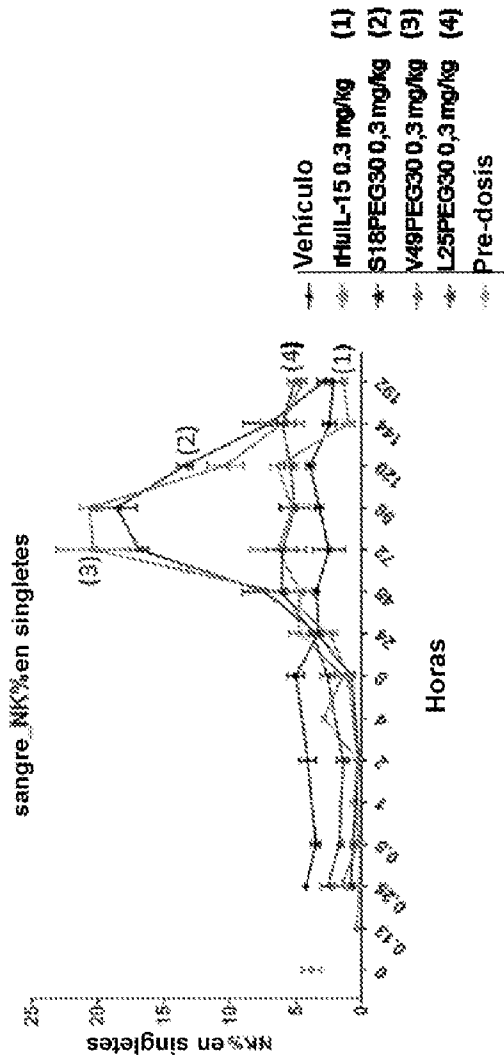
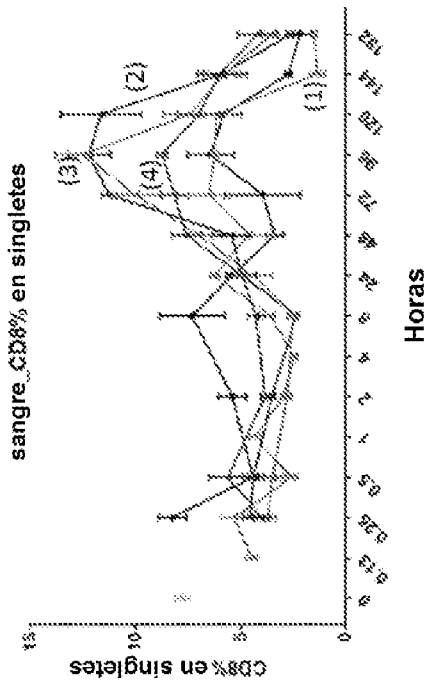


FIG. 16A



sangre_CD8% en CD3

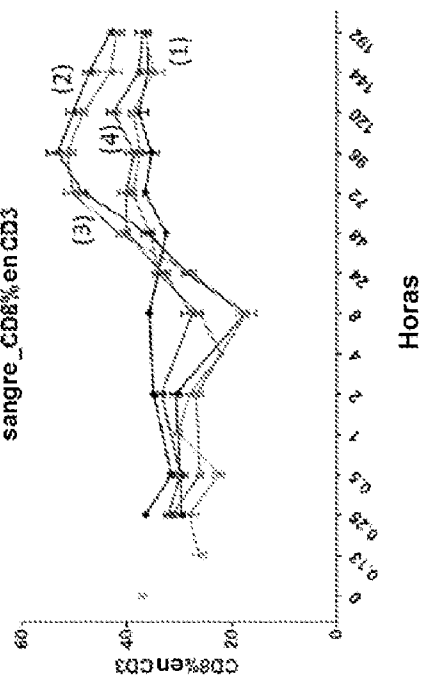


FIG. 16C

FIG. 17A

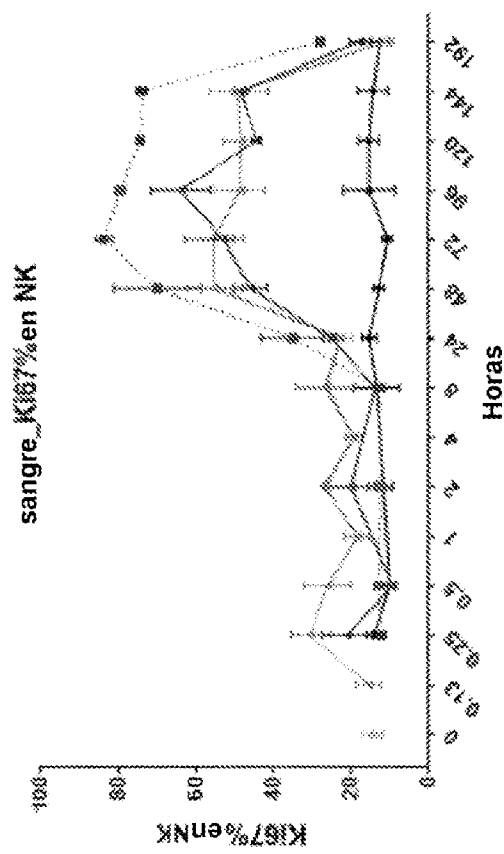
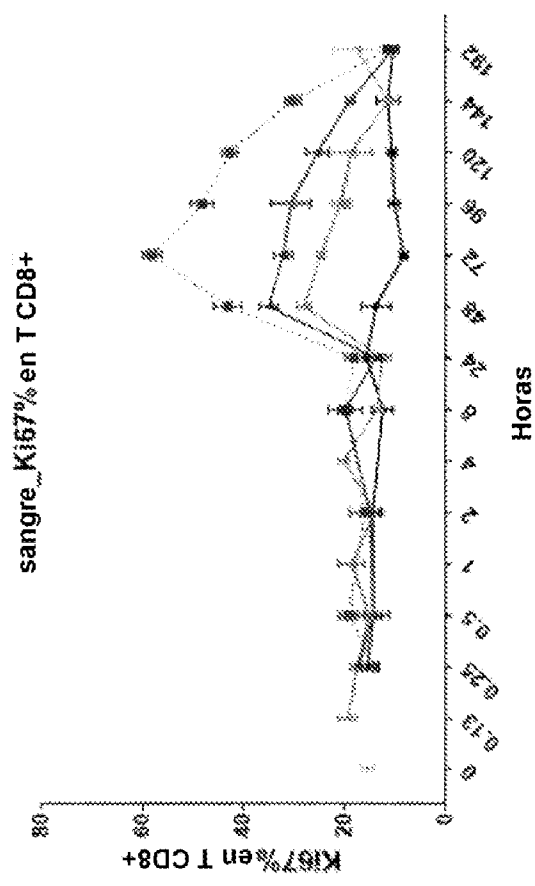


FIG. 17B



Vehículo
 rHuIL-15 0,3 mg/kg
 L25PEG300 0,3 mg/kg
 L25PEG300 1 mg/kg
 Pre-dosis