



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

(21) BR 112020017016-0 A2



(22) Data do Depósito: 26/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/12/2020

(54) Título: CONJUGADOS DA IL-15 E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61K 38/00; A61K 38/20; C07K 14/54; C12N 15/24.

(30) Prioridade Unionista: 26/02/2018 US 62/635,133.

(71) Depositante(es): SYNTHORX, INC..

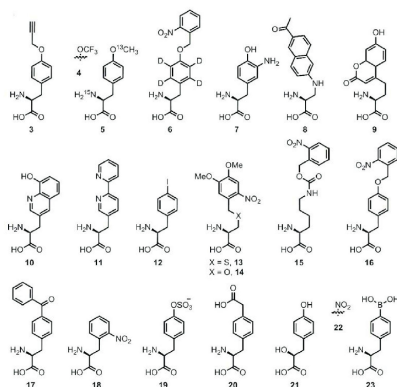
(72) Inventor(es): CAROLINA E. CAFFARO; JEROD PTACIN; MARCOS MILLA.

(86) Pedido PCT: PCT US2019019637 de 26/02/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/165453 de 29/08/2019

(85) Data da Fase Nacional: 20/08/2020

(57) Resumo: CONJUGADOS DA IL-15 E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a conjugados da interleucina (IL) 15 e uso no tratamento de uma ou mais indicações. Também são descritas aqui composições farmacêuticas e kits compreendendo um ou mais conjugados da IL-15.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CON-
JUGADOS DA IL-15 E USOS DOS MESMOS**".

REFERÊNCIA REMISSIVA

[001] Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório US nº 62/635.133, depositado em 26 de fevereiro de 2018, que está aqui integralmente incorporado, por referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Populações distintas de células T modulam o sistema imunológico para manter a homeostase e a tolerância imune. Por exemplo, as células T reguladoras (Treg) evitam respostas inadequadas do sistema imunológico, impedindo a auto reatividade patológica enquanto as células T citotóxicas direcionam e destroem as células infectadas e/ou as células cancerosas. Em algumas modalidades, a modulação das diferentes populações de células T oferece uma opção para o tratamento de uma doença ou indicação.

SUMÁRIO DA DESCRIÇÃO

[003] São revelados aqui, em algumas modalidades, conjugados da IL-15 e uso no tratamento de um câncer. Em algumas modalidades, também são descritos aqui métodos para modular a interação entre receptores IL-15 e IL-15 para estimular ou expandir populações específicas de células T. Em casos adicionais, são descritas aqui composições farmacêuticas e kits compreendendo um ou mais conjugados da IL-15 descritos aqui.

[004] São revelados aqui, em algumas modalidades, polipeptídeos da interleucina 15 (IL-15) modificados, compreendendo pelo menos um aminoácido não natural pós-translacionalmente modificado, em que pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição de resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com receptor α da interleucina 15 (IL-15R α), em que a diminuição da afinidade de ligação é relativa à afini-

dade de ligação entre um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem e a IL-15R α , e em que a interação do polipeptídeo da IL-15 modificado com o receptor da interleucina 2/interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) não é significativamente afetada. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada de 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 e S1144, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93; Y26, E46, V49, E53 e L25; A23, T24, E89 e E93; D22, L44, Q48 e E90; L25, E53, N77 e S83; ou L25 e E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre E89, E53, E93, V49, E46, Y26, L25, T24, A23, D22, I21 e L52, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 e S83, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre E46, Y26, V49, E53 e T24, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pe-

lo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre E46, V49, E53 e T24, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre Y26, V49, E53 e T24, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre V49, E53 e T24, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre E46 e Y26, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é E46, em que a posição do resíduo corresponde à posição estabelecida na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é Y26, em que a posição do resíduo corresponde à posição estabelecida na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é V49, em que a posição do resíduo corresponde à posição estabelecida na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é E53, em que a posição do resíduo corresponde à posição estabelecida na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é T24, em que a posição do resíduo corresponde à posição estabelecida na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre N4, K11, N65, L69, S18, H20 e S83, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não

natural compreende p-acetil-L-fenilalanina, p-iodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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 ou N6-(2-azidoetóxi)-carbonil-L-lisina. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural, conforme estabelecido na Figura 2C. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 modificado por um par tRNA sintetase/tRNA ortogonal. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é conjugado a uma porção conjugada por meio de pelo menos um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um polímero solúvel em água, uma proteína ou um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende: polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinas (POZ), poli(N-acrililmorfolina) ou uma combinação dos mesmos; ou um polissacarídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende PEG. Em algumas modalidades, o PEG é um PEG linear ou um PEG ramificado. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende um glicano. Em algumas modalidades, o polissacarídeo compreende dextrano, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico (HA), amilose, heparina, sulfato de heparano (HS), dextrina ou hidroxietil-amido (HES). Em algumas modalidades, a porção conjugada

compreende um ácido graxo saturado. Em algumas modalidades, o ácido graxo saturado compreende ácido hexadanoico, ácido tetradecanoico ou ácido 15-azidopentadecanoico. Em algumas modalidades, a proteína compreende uma albumina, uma transferrina, uma transtiretina ou uma porção Fc de um anticorpo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um peptídeo XTEN, um polímero de ácido homoamino rico em glicina (HAP), um polipeptídeo PAS, um polipeptídeo semelhante a elastina (ELP), um peptídeo CTP ou um polímero de proteína semelhante a gelatina (GLK). Em algumas modalidades, a porção conjugante está diretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada. Em algumas modalidades, a porção conjugante está indiretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante homobifuncional. Em algumas modalidades, o ligante homobifuncional compreende reagente de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis (propionato de sulfossuccinimidil) (DTSSP), suberato de disuccinimidila (DSS), suberato de bis(sulfossuccinimidil) (BS), tartarato de disuccinimidila (DST), tartarato de disuccinimidila (DST), tartarato de disuccinimidila (DST), etileno glicobis (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidila (DSG), carbonato de N,N'-disuccinimidila (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), butano de 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido) (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), composto contendo haleto de arila (DFDNB), como, por exemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno ou 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), dissulfeto de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etila] (BASED), formaldeído, glutaraldeído, éter 1,4-butanodiol diglicidila, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenila, ácido

diiodo-p-xileno sulfônico, N,N'-etileno-bis (iodoacetamida) ou N,N'-hexametileno-bis (iodoacetamida). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante hetero-bifuncional. Em algumas modalidades, o ligante hetero-bifuncional compreende propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) (sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa (LC-sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa solúvel em água (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonil- α -metil- α - (2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfossuccinimidil-6-[α -metil- α - (2-piridilditio) toluamido]hexanoato (sulfo -LC-sMPT), succinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sMCC), sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil (4-iodoacteil) aminobenzoato (sIAB), sulfossuccinimidil(4-iodoacteil) aminobenzoato (sulfo-sIAB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sMPB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sulfo-sMPB), éster de N- (γ -maleimidobutirilóóxi) succinimida (GMBs), éster de N- (γ -maleimidobutirilóóxi) sulfossuccinimida (GMBs), succinimidil 6- ((iodoacetil) amino) hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((iodoacetil) amino) hexanoil) amino] hexanoato (sIAXX), succinimidil 4- (((iodoacetil)amino) metil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-((((4-iodoacetil) amino) metil) ciclo-hexano-1-carbonil) amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil iodoacetato (NPIA), ligantes carbonil-reativo e sulfidril-reativo, como hidrazida de ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenil) (MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M2C2H), 3-(2-piridilditio) propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxissuccinimidil-4-azidossalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidossalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfossuccinimidil-(4-azidossalicilamido) hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfossuccinimidil-2-(p-azidossalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD),

N-hidroxissuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sANPAH), sulfossuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxissuccinimida (ANB-NOs), sulfossuccinimidil-2-(*m*-azido-*o*-nitrobenzamido) -etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfossuccinimidil (4-azidofenil) -1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfossuccinimidil 4-(*p*-azidofenil) butirato (sulfo-sAPB), sulfossuccinimidil 2- (7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida) etil-1,3'-ditiopropionato (sA-ED), sulfossuccinimidil 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), *p*-nitrofenil diazopiruvato (*p*NPDP), *p*-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1- (*p*-Azidossalicilamido)-4-(iodoacetamido) butano (AsIB), N-[4- (*p*-azidossalicilamido) butil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida (APDP), benzofenona-4-iodoacetamida, *p*-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4- (*p*-azidosalicilamido) butilamina (AsBA) ou *p*-azidofenil glioxal (APG). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante dipeptídico clivável ou não clivável. Em algumas modalidades, o ligante dipeptídico compreende Val-Cit, Pe-Lys, Val-Ala ou Val-Lys. Em algumas modalidades, o ligante compreende um grupo maleimida. Em algumas modalidades, o ligante compreende um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador compreende álcool *p*-aminobenzila (PAB), *p*-aminobenzoxicarbonila (PABC), um derivado, ou um análogo. Em algumas modalidades, a porção conjugada é capaz de estender a meia-vida sérica do polipeptídico da IL-15 modificado. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídico da IL-15 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação à IL-15R α é

de que cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um fragmento funcionalmente ativo de um polipeptídeo da IL-15 de comprimento total. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 humano recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado com a diminuição na afinidade de ligação com IL-15R α é capaz de expandir populações de célula T efetora (Teff) e Natural Assassina (NK).

[005] São revelados aqui, em algumas modalidades, polipeptídeos da interleucina 15 (IL-15) modificados, compreendendo pelo menos um aminoácido não natural pós-translacionalmente modificado, em que pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição de resíduo que não afeta significativamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com receptor α da interleucina 15 (IL-15R α) ou o receptor da interleucina IL-2/interleucina 15 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$). Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma meia-vida estendida. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada de 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 e S1144, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em

algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93; Y26, E46, V49, E53 e L25; A23, T24, E89 e E93; D22, L44, Q48 e E90; L25, E53, N77 e S83; ou L25 e E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre M1, S18, H20, K36, K41, G55, D56, S75, S76, N77, G78, V80, T81, S83 e K86, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende p-acetil-L-fenilalanina, p-iodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargilfenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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 ou N6-(2-azidoetóxi) -carbonil-L-lisina. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural, conforme estabelecido na Figura 2C. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 modificado por um par tRNA sintetase/tRNA ortogonal. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é conjugado a uma porção conjugada por meio de pelo menos um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um polímero solúvel em água, uma proteína ou um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende: polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli (hidroxiálquilmetacrilato), po-

li(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli (álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinias (POZ), poli (N-acriloilmorfolina) ou uma combinação dos mesmos; ou um polissacarídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende PEG. Em algumas modalidades, o PEG é um PEG linear ou um PEG ramificado. Em algumas modalidades, os polímeros solúveis em água compreendem um glicano. Em algumas modalidades, o polissacarídeo compreende dextrano, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico (HA), amilose, heparina, sulfato de heparano (HS), dextrina ou hidroxietil-amido (HES). Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um ácido graxo saturado. Em algumas modalidades, o ácido graxo saturado compreende ácido hexadecanoico, ácido tetradecanoico ou ácido 15-azidopentadecanoico. Em algumas modalidades, a proteína compreende uma albumina, uma transferrina, uma transtiretina ou uma porção Fc de um anticorpo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um peptídeo XTEN, um polímero de ácido homoamino rico em glicina (HAP), um polipeptídeo PAS, um polipeptídeo semelhante a elastina (ELP), um peptídeo CTP ou um polímero de proteína semelhante a gelatina (GLK). Em algumas modalidades, a porção conjugante está diretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada. Em algumas modalidades, a porção conjugante está indiretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante homo-bifuncional. Em algumas modalidades, o ligante homo-bifuncional compreende reagente de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis (propionato de sulfossuccinimidila) (DTSSP), suberato de dissuccinimidila (DSS), suberato de bis(sulfossuccinimidil) (BS), tartarato de dissuccinimidila (DST), tartarato de disuccinimidila (DST), tartarato de dissuccinimidila (DST), etileno glicobis (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de dissuccinimidila

(DSG), carbonato de N,N'-dissuccinimidila (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), butano de 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido) (DPDPB), bismaleimido-hexano (BMH), composto contendo haleto de arila (DFDNB), como, por exemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno ou 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), dissulfeto de bis- $[\beta$ -(4-azidosalicilamido)etila] (BASED), formaldeído, glutaraldeído, éter 1,4-butanodiol diglicidila, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenila, ácido diiodo-p-xileno sulfônico, N,N'-etileno-bis (iodoacetamida) ou N,N'-hexametileno-bis (iodoacetamida). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante hetero-bifuncional. Em algumas modalidades, o ligante hetero-bifuncional compreende propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) (sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa (LC-sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa solúvel em água (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonyl- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfossuccinimidil-6- $[\alpha$ -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sMCC), sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil (4-iodoacteil) aminobenzoato (sIAB), sulfossuccinimidil(4-iodoacteil) aminobenzoato (sulfo-sIAB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sMPB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sulfo-sMPB), éster de N-(γ -maleimidobutirilóxi) succinimida (GMBs), éster de N-(γ -maleimidobutirilóxi) sulfossuccinimida (GMBs), succinimidil 6-((iodoacetil) amino) hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((iodoacetil) amino)

hexanoil) amino] hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((iodoacetil)amino) metil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-((((4-iodoacetil) amino) metil) ciclo-hexano-1-carbonila) amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil iodoacetato (NPiA), ligantes carbonil-reativo e sulfidril-reativo, como hidrazida de ácido butírico b4-(4-N-maleimidofenila) (MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M2C2H), 3-(2-piridilditio) propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxissuccinimidil-4-azidossalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidossalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfossuccinimidil-(4-azidossalicilamido) hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfossuccinimidil-2-(p-azidossalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxissuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido -2'-nitrofenilamino) hexanoato (sANPAH), sulfossuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxissuccinimida (ANB-NOs), sulfossuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido) -etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfossuccinimidil (4-azidofenil) -1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfossuccinimidil 4-(p-azidofenil) butirato (sulfo-sAPB), sulfossuccinimidil 2- (7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida) etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfossuccinimidil 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1- (p-Azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido) butano (AsIB), N-[4- (p-azidossalicilamido) butil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida (APDP), benzofenona-4-iodoacetamida, p-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4- (p-azidossalicilamido) butilamina (AsBA) ou p-azidofenil glioxal (APG). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante dipeptídico clivável ou não clivável. Em algumas modalidades, o ligante dipeptídico compreende Val-Cit, Pe-Lys,

Val-Ala ou Val-Lys. Em algumas modalidades, o ligante compreende um grupo maleimida. Em algumas modalidades, o ligante compreende um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador compreende álcool *p*-aminobenzil (PAB), *p*-aminobenzoxycarbonil (PABC), um derivado, ou um análogo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um fragmento funcionalmente ativo de um polipeptídeo da IL-15 de comprimento total. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 humano recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado com a diminuição na afinidade de ligação com IL-15R α é capaz de expandir populações de célula T efetora (Teff) e Natural Assassina (NK).

[006] São revelados aqui, em algumas modalidades, polipeptídeos da interleucina 15 (IL-15) modificados, compreendendo pelo menos um aminoácido não natural pós-translacionalmente modificado, em que pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição de resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com receptor β da interleucina 2/interleucina 15 (IL-2/IL-15R β), mas não afeta a interação com o receptor α da interleucina 15 (IL-15R α). Em algumas modalidades, em que a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114; E28, P33, S102, e V104; ou I6 e V31. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionado den-

tre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 e N72. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionado dentre N4, S7, K11 e D61; D8, E64, N65, I68 e N72; ou N1, T62 e L69. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende p-acetil-L-fenilalanina, p-iodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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, fosfotirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina ou N6-(2-azidoetóxi)-carbonil-L-lisina. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural, conforme estabelecido nas Figuras 1-3. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 modificado por um par tRNA sintetase/tRNA ortogonal. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é conjugado a uma porção conjugada por meio de pelo menos um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um polímero solúvel em água, uma proteína ou um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende: polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmecrilamida), poli(hidroxiálquilmecrilato), poli(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinas (POZ), poli(N-acrilormorfina) ou uma combinação dos mesmos; ou um polissacarídeo. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água compreende PEG. Em algumas modalidades, o PEG é um PEG linear ou um PEG ramificado. Em algumas modalidades, o

polímero solúvel em água compreende um glicano. Em algumas modalidades, o polissacarídeo compreende dextrano, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico (HA), amilose, heparina, sulfato de heparano (HS), dextrina ou hidroxietil-amido (HES). Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um ácido graxo saturado. Em algumas modalidades, o ácido graxo saturado compreende ácido hexadanoico, ácido tetradecanoico ou ácido 15-azidopentadecanoico. Em algumas modalidades, a proteína compreende uma albumina, uma transferrina, uma transtiretina ou uma porção Fc de um anticorpo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende um peptídeo XTEN, um polímero de ácido homoamino rico em glicina (HAP), um polipeptídeo PAS, um polipeptídeo semelhante a elastina (ELP), um peptídeo CTP ou um polímero de proteína semelhante a gelatina (GLK). Em algumas modalidades, a porção conjugante está diretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada. Em algumas modalidades, a porção conjugante está indiretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante homo-bifuncional. Em algumas modalidades, o ligante homo-bifuncional compreende reagente de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis (propionato de sulfossuccinimidil) (DTSSP), suberato de dissuccinimidila (DSS), suberato de bis(sulfossuccinimidil) (BS), tartarato de dissuccinimidila (DST), tartarato de dissuccinimidila (DST), tartarato de disuccinimidil (DST), etileno glicobis (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidil (DSG), carbonato de N,N'-dissuccinimidila (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), butano de 1,4-di-(3'-(2'-piridilditio)propionamido) (DPDPB), bismaleimido-hexano (BMH), composto contendo haleto de arila (DFDNB), como, por exemplo, 1,5-

difluoro-2,4-dinitrobenzeno ou 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), dissulfeto de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etila] (BASED), formaldeído, glutaraldeído, éter 1,4-butanodiol diglicidila, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenila, ácido diiodo-p-xileno sulfônico, N,N'-etileno-bis (iodoacetamida) ou N,N'-hexametileno-bis (iodoacetamida). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante hetero-bifuncional. Em algumas modalidades, o ligante hetero-bifuncional compreende propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) (sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa (LC-sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa solúvel em água (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonil- α -metil- α - (2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfossuccinimidil-6-[α -metil- α - (2-piridilditio) toluamido]hexanoato (sulfo -LC-sMPT), succinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sMCC), sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil (4-iodoacteil) aminobenzoato (sIAB), sulfossuccinimidil(4-iodoacteil) aminobenzoato (sulfo-sIAB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sMPB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sulfo-sMPB), éster de N- (γ -maleimidobutirilóxi) succinimida (GMBs), éster de N- (γ -maleimidobutirilóxi) sulfossuccinimida (GMBs), succinimidil 6- ((iodoacetil) amino) hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((iodoacetil) amino) hexanoil) amino] hexanoato (sIAXX), succinimidil 4- (((iodoacetil)amino) metil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-((((4-iodoacetil) amino) metil) ciclo-hexano-1-carbonil) amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil iodoacetato (NPIA), ligantes carbonil-reativo e sulfidril-reativo, como hidrazida de ácido butírico b4-(4-N-maleimidofenil)

(MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M2C2H), 3-(2-piridilditio) propionil hidrazida (PDPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidossalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfossuccinimidil-4-azidossalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfossuccinimidil-(4-azidosalicilamido) hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfossuccinimidil-2-(*p*-azidosalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfossuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sANPAH), sulfossuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxissuccinimida (ANB-NOs), sulfossuccinimidil-2-(*m*-azido-*o*-nitrobenzamido) -etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfossuccinimidil (4-azidofenil) -1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfossuccinimidil 4-(*p*-azidofenil) butirato (sulfo-sAPB), sulfossuccinimidil 2- (7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida) etil-1,3'-ditiopropionato (sA-ED), sulfossuccinimidil 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), *p*-nitrofenil diazopiruvato (*p*NPDP), *p*-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), 1- (*p*-Azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido) butano (AsIB), N-[4- (*p*-azidosalicilamido) butil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida (APDP), benzofenona-4-iodoacetamida, *p*-azidobenzoil hidrazida (ABH), 4- (*p*-azidosalicilamido) butilamina (AsBA) ou *p*-azidofenil glioxal (APG). Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante dipeptídico clivável ou não clivável. Em algumas modalidades, o ligante dipeptídico compreende Val-Cit, Pe-Lys, Val-Ala ou Val-Lys. Em algumas modalidades, o ligante compreende um grupo maleimida. Em algumas modalidades, o ligante compreende um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador compreende álcool *p*-aminobenzil (PAB), *p*-aminobenzoxicarbonil (PABC), um derivado, ou um análogo. Em algumas modalidades, a porção conjugada é

capaz de estender a meia-vida sérica do polipeptídeo da IL-15 modificado. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação à IL-15R α é de que cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um fragmento funcionalmente ativo de um polipeptídeo da IL-15 de comprimento total. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um polipeptídeo da IL-15 humano recombinante. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado com a diminuição na afinidade de ligação com IL-15R α é capaz de expandir populações de célula T efetora (Teff) e Natural Assassina (NK).

[007] São revelados aqui, em algumas modalidades, conjugados da interleucina 15 (IL-15) compreendendo: um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado; e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em uma posição de aminoácidos selecionada de N4, E46, D61, E64, N65, I68 e L69, em que a numeração de resíduos de aminoácidos corresponde à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é N4. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é E46. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é D61. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é E64. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é N65. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é I68. Em algumas modalidades, a posição do aminoácido é L69. Em algumas modalidades, o resíduo do aminoácido é modificado para cisteína.

Em algumas modalidades, o resíduo do aminoácido é modificado para lisina. Em algumas modalidades, o resíduo de aminoácido selecionado de N4, E46, N65 e L69 é ainda modificado para um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, o aminoácido não natural compreende p-acetil-L-fenilalanina, p-iodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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 ou N6-(2-azidoetóxi) - carbonil-L-lisina. Em algumas modalidades, o pelo menos um aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural, conforme estabelecido na Figura 2C. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 tem uma menor afinidade com a subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α) em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade à IL-15R α é de que cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a porção conjugante prejudica ou bloqueia a ligação da IL-15 com a IL-15R α .

[008] São reveladas aqui, em algumas modalidades, composições farmacêuticas compreendendo: um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um conjugado da IL-15; e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração parenteral.

[009] São revelados aqui, em algumas modalidades, métodos para tratar uma doença ou uma condição proliferativa em um indivíduo que precisa do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um conjugado da IL-15. Em algumas modalidades, a doença ou a condição proliferativa é um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de cérebro, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer de olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer de rim, câncer de pulmão, melanoma, câncer de ovário, câncer pancreático ou câncer de próstata. Em algumas modalidades, o câncer é uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é a leucemia linfocítica crônica (CLL), o linfoma linfocítico pequeno (SLL), o linfoma folicular (FL), o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), o linfoma de células do manto (MCL), a macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiplo, linfoma de células B da zona marginal extranodal, linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grau não Burkitt, linfoma mediastinal de células B primário (PMBL), linfoma imunoblástico de grandes células, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitário, linfoma esplênico da zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma de derrame primário ou granulomatose linfomatoide. Em algumas modalidades, o método compreende ainda a administração de um agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 e o agente terapêutico adicional são administrados simultaneamente. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conju-

gado da IL-15 e o agente terapêutico adicional são administrados sequencialmente. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 é administrado antes do agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 é administrado após a administração do agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[0010] São revelados aqui, em algumas modalidades, métodos de expansão das populações da célula T efetora (Teff) e Natural Assassi-naassassina (NK), compreendendo: (a) colocar uma célula em contato com um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um conjugado da IL-15; e (b) interagir a IL-15 com as subunidades IL-15R β e IL-15R γ para formar um complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$; em que o conjugado da IL-15 tem uma menor afinidade com a subunidade IL-15R α , e em que o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula a expansão das células Teff e NK. Em algumas modalidades, a célula é uma célula eucariótica. Em algumas modalidades, a célula é uma célula mamífera. Em algumas modalidades, a célula é uma célula humana. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 compreende um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-2 isolado e purificado em um resíduo de aminoácidos selecionado de N4, E46, N65 e L69, em que a numeração de resíduos de aminoácidos corresponde à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade à IL-15R α é de que cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais da IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a por-

ção conjugante prejudica ou bloqueia a ligação da IL-15 com a IL-15R α .

[0011] São revelados aqui, em certas modalidades, kits compreendendo um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um conjugado da IL-15, ou uma composição farmacêutica.

[0012] São revelados aqui, em certas modalidades, kits compreendendo uma molécula de ácido polinucleico que codifica um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um polipeptídeo da IL-15.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] Vários aspectos da revelação são apresentados com particularidade nas reivindicações em anexo. Uma compreensão melhor das características e vantagens da presente revelação será obtida por referência à descrição detalhada a seguir, que apresenta modalidades ilustrativas, nas quais os princípios da revelação são utilizados, e aos desenhos em anexo, dos quais:

[0014] A Fig. 1 ilustra aminoácidos não naturais exemplificadores. Esta figura é adaptada da 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);

[0015] A Fig. 2A-Fig. 2B ilustra aminoácidos não naturais exemplificadores. A Fig. 2A ilustra derivados de lisina exemplificadores. A Fig. 2B ilustra derivados de fenilalanina exemplificadores.

[0016] A Fig. 3A-Fig. 3D ilustra aminoácidos não naturais exemplificadores. Esses aminoácidos não naturais (UAAs) foram geneticamente codificados em proteínas (Fig. 3A – UAA #1-42; Fig. 3B - UAA # 43-89; Fig. 3C – UAA # 90-128; Fig. 3D – UAA # 129-167). A Fig. 3A-Fig. 3D são adotadas da Tabela 1 de Dumas *et al.*, *Chemical Science* 2015, 6, 50-69.

[0017] A Fig. 4 ilustra um gráfico de cromatografia de troca aniônica.

[0018] A Fig. 5 ilustra um gráfico de cromatografia de fase reversa.

[0019] A Fig. 6 ilustra os valores de EC50 para conjugados da IL-15 exemplificadores com potência nativa no ensaio de proliferação CTLL2. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

[0020] A Fig. 7 ilustra os valores de EC50 para conjugados da IL-15 exemplificadores com potência reduzida no ensaio de proliferação CTLL2. Como mostrado aqui, a peguilação sítio-específica contribui para a farmacologia in vitro. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

[0021] A Fig. 8 ilustra os valores de EC50 para a IL-15 conjugada exemplificadora a diferentes tamanhos de PEG. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

[0022] A Fig. 9A- Fig. 9C mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHuIL-15, um composto conjugado com IL-15 que se liga à IL-15R α . A Fig. 9A: rHuIL-15; Fig. 9B: IL-15 conjugada a N77PEG30 e S83PEG30; e Fig. 9C: IL15 conjugada a E46PEG30 e E53PEG30.

[0023] A Fig. 10 mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHuIL-15, uma IL-15 N77PEG30 que se liga à IL-15R α e IL-2R β .

[0024] A Fig. 11 mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHuIL-15, uma IL-15 E53PEG30 que se liga à IL-15R α e IL-2R β .

[0025] A Fig. 12A- Fig. 12D ilustra a fosforilação STAT5 nas células T NK e CD8+ mediante estimulação com conjugados exemplificadores IL-15 PEG. A Fig. 12A e Figura 12C: extensão de meia-vida (S83PEG30 e N77PEG30); Fig. 12B e Figura 12D: Interação modulada com IL-15R α (V49PEG30, E53PEG30 e L25PEG30).

[0026] A Fig. 13 mostra os perfis de concentração plasmática de rHuIL-15, IL-15 S83PEG30, IL-15 V49PEG30, IL-15 L25 PEG30 e IL-

15 N77 PEG30 a 0,3 mg/kg.

[0027] A Fig. 14A- Fig. 14D mostra a porcentagem de fosforilação STAT5 em células T CD8+ (Fig. 14A), células de memória CD8 (Fig. 14B), células NK (Fig. 14C) e células Treg (Fig. 14D) em camundongos administrados com rHuIL-15 ou compostos peguilados.

[0028] A Fig. 15A- Fig. 15D mostra maior expressão do marcador molecular de proliferação precoce Ki67 nas células T CD8+ (Fig. 15A), células NK (Fig. 15B), Tmem CD8+ (Fig. 15C), mas não em células Treg (Fig. 15D) em animais administrados com compostos peguilados.

[0029] A Fig. 16A- Fig. 16C mostra a indução da proliferação de células T CD8+ (Fig. 16A), células NK (Fig. 16B) e células T de memória CD8 (Fig. 16C).

[0030] A Fig. 17A-Fig. 17B mostra aumento da expressão de Ki67 nas células NK (Fig. 17A) e T CD8+ (Fig. 17B) com dose aumentada de composto IL-15 L25PEG30 em camundongos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA REVELAÇÃO

[0031] O câncer é um grupo complexo de doenças que envolvem crescimento celular anormal com o potencial de invadir ou espalhar-se para outras partes do corpo. Terapias de câncer, como radiação e quimioterapia, que visam os condutores e as vias do câncer, podem ser bem-sucedidas. Em alguns casos, as células cancerosas são capazes de se adaptar a essas terapias, limitando a eficácia dessas terapias. A imunoterapia, ao contrário da cirurgia, quimioterapia ou radiação, estimula o sistema imunológico a reconhecer e matar células tumorais.

[0032] Várias citocinas são usadas na imunoterapia para sua capacidade de acionar uma resposta imune. Entretanto, as imunoterapias atuais que usam citocinas resultam em vários efeitos adversos, incluindo toxicidade e proliferação celular não controlada. São fornecidas aqui citocinas modificadas ou os conjugados de citocinas para uso

no tratamento do câncer com capacidade de estimular ou expandir populações específicas de células T e NK, resultando em melhor tratamento e redução de eventos adversos.

[0033] As citocinas compreendem uma família de proteínas de sinalização celular, como quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas e fatores de necrose tumoral. As citocinas são produzidas por células imunes, como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e diferentes células estromais. Em alguns casos, as citocinas modulam o equilíbrio entre respostas imunes humorais e baseadas em células.

[0034] As interleucinas são proteínas de sinalização que modulam o desenvolvimento e a diferenciação de linfócitos T e B e células hematopoiéticas. As interleucinas são produzidas por linfócitos T CD4 auxiliares, monócitos, macrófagos e células endoteliais. Em alguns casos, há cerca de 15 interleucinas, 1-13 interleucinas, interleucina 15 e interleucina 17.

[0035] A interleucina-15 (IL-15) é uma citocina pleiotrópica cuja estrutura é uma glicoproteína de 14-15 kDa. A transcrição, tradução e secreção da IL-15 são reguladas por vários mecanismos complexos. As proteínas da IL-15 e do receptor α da IL-15 (IL-15R α , CD215) são co-expressadas predominantemente por monócitos ativados e células dendríticas (DCs). A transcrição do heterodímero IL-15/IL-15R α ocorre após a interação de monócitos/DCs com interferons tipo 1 ou tipo 2 (IFN) ou ligação CD40 ou agentes que atuam através de receptores tipo Toll (TLR) que ativam NF-kB. Além disso, a expressão da proteína IL-15/IL-15R α é predominantemente controlada nos níveis de tradução e secreção.

[0036] Os sinais da IL-15 através de um receptor heterotrimérico compreendendo uma cadeia α única (IL-15R α), uma subunidade β compartilhada (IL-15R β , CD132) com IL-2 (CD122) e uma subunidade

γ comum (CD132; IL-15R γ) compartilhada com várias citocinas. IL-15R α tem alta afinidade para IL-15 com um K_d cerca de 10^{-11} M.

[0037] Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para modular as respostas das células T e, posteriormente, para o tratamento do câncer. Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para simular a proliferação de células T CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ e CD8⁺ ativadas e sua diferenciação em subconjuntos definidos de células T efetoras. Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para simular a geração e proliferação de células natural assassina (NK). Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para promover a manutenção e sobrevivência de células T CD8 de memória, células T CD8 virgens de tratamento e células NK. Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para induzir a formação de células T CD8 de memória. Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 é usada para preparar a ativação específica do alvo da célula NK. Em algumas modalidades, a sinalização da IL-15 não resulta na expansão de Treg.

[0038] São descritas aqui, em algumas modalidades, polipeptídeos da IL-15 modificados para modular as respostas das células T e, posteriormente, para tratar o câncer. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende a diminuição da ligação com o receptor α da interleucina 15 (IL-15R α). Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação é relativa à afinidade de ligação entre um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem e o IL-15R α . Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado tem pouco ou nenhum efeito na interação do polipeptídeo da IL-15 modificado com receptor $\beta\gamma$ da interleucina 2/interleucina 15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$). Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma ou mais modificações que têm pouco ou nenhum efeito na afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com IL-15R α e

IL-15R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende a diminuição da ligação com IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ e a interação do IL-15R α não é afetada.

[0039] São descritos aqui polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15 com capacidade aprimorada de estimular uma resposta antitumoral. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15 têm perfil de segurança aprimorado. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados ou os conjugados da IL-15 compreendem uma peguilação sítio específica para aumentar a meia-vida. Em algumas modalidades, a peguilação sítio específica aumenta a meia-vida e tem pouco ou nenhum efeito sobre a atividade biológica. Em algumas modalidades, a sinalização dos polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15 é polarizado para IL-15R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados ou os conjugados da IL-15 compreendem uma peguilação sítio específica para aumentar a meia-vida e reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, a peguilação sítio específica resulta em menos dosagem dos polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15. Em algumas modalidades, a toxicidade é reduzida pelos polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15 bloqueando a interação de IL-15R α . Em algumas modalidades, a atividade dos polipeptídeos da IL-15 modificados ou conjugados da IL-15 é limitada a um sítio tumoral. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados ou os conjugados da IL-15 compreendem uma peguilação sítio específica, de modo que a transapresentação da IL-15 não é necessária para a proliferação e função da célula natural assassina (NK) e efetora. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados ou os conjugados da IL-15 compreendem uma peguilação sítio específica de modo que a depuração é inibida ou proibida.

Polipeptídeos da IL-15 modificados e conjugados da IL-15

[0040] São descritos aqui, em algumas modalidades, polipeptídeos da IL-15 modificados. Em alguns casos, a modificação é para um aminoácido natural. Em alguns casos, a modificação é para um aminoácido não natural. Em alguns casos, é descrito aqui um polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado que compreende pelo menos um aminoácido não natural. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é um IL-15 de mamífero isolado e purificado, por exemplo, uma proteína IL-15 humana. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é uma proteína IL-15 humana. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 compreende de cerca de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 1 ou 2. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IM-15 compreende ou consiste na sequência da SEQ ID NO: 1 ou 2.

[0041] Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado é uma variante truncada. Em alguns casos, o truncamento é uma deleção N-terminal. Em outros casos, o truncamento é uma deleção C-terminal. Em casos adicionais, o truncamento compreende deleções N-terminal e C-terminal. Por exemplo, o truncamento pode ser uma deleção de pelo menos ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ou mais resíduos do N-terminal ou do C-terminal, ou ambos terminais. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ou mais resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 2 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 3 resíduos. Em alguns

casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 4 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 5 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 6 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 7 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 8 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 9 resíduos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal de pelo menos ou cerca de 10 resíduos.

[0042] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um fragmento funcionalmente ativo. Em alguns casos, o fragmento funcionalmente ativo compreende região da 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 ou 20-100, onde as posições dos resíduos são em referência às posições na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, o fragmento funcionalmente ativo compreende a região da IL-15: 5-114, 10-114, 15-114 ou 20-114, onde as posições dos resíduos são em referência às posições na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, o fragmento funcionalmente ativo compreende a região da IL-15: 1-110, 5-110, 10-110, 15-110 ou 20-110, onde as posições dos resíduos são em referência às posições na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, o fragmento funcionalmente ativo compreende a região da IL-15: 1-105, 5-105, 10-105, 15-105 ou 20-105, onde as posições dos resíduos são em referência às posições na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, o fragmento funcionalmente ativo compreende a região da IL-15: 1-100, 5-100, 10-100, 15-100 ou 20-100, onde as posi-

ções dos resíduos são em referência às posições na SEQ ID NO: 1.

[0043] Em algumas modalidades, o fragmento da IL-15 funcionalmente ativo compreende uma deleção interna. Em alguns casos, a deleção interna compreende uma região de loop. Em alguns casos, a deleção interna compreende uma deleção de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou mais resíduos.

[0044] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui compreende pelo menos um aminoácido não natural. Em alguns casos, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada de 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 e S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada de 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 e S1144, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é sele-

cionada dentre 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 e F110. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97 e E98. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 e N72. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre Y26, E46, V49, E53 e L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N4, S7, K11 e D61. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre L25, E53, N77 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre L25 e E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um ami-

noácido não natural é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre E46, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre E46 e Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E46. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é V49. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N77. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N3, K11, N65, L69, S18, H20 e S83. Uma sequência de aminoácidos exemplificadores para IL-15 está ilustrada na Tabela 1 abaixo.

NOME	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO.
IL-15 (forma madura)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD VHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIH DTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	1

NOME	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO.
IL-15 GenBank: CAA71044.1 (precursor)	MDFQVQIFSFLISASVIMSRANWVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFINTS	2

[0045] Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado próximo ao N-terminal. Conforme usado aqui, proximal refere-se a um resíduo localizado a pelo menos 1 resíduo do N-terminal e a cerca de 50 resíduos do resíduo do N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 10, 20, 30, 40 ou 50 resíduos do resíduo N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 10 resíduos do resíduo N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 20 resíduos do resíduo N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 30 resíduos do resíduo N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 40 resíduos do resíduo N-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 50 resíduos do resíduo N-terminal.

[0046] Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural é o resíduo N-terminal.

[0047] Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado próximo ao C-terminal. Conforme usado aqui, proximal refere-se a um resíduo localizado a pelo menos 1 resíduo do C-terminal e a cerca de 50 resíduos do resíduo do C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 10, 20, 30, 40 ou 50 resíduos do resíduo C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localiza-

do dentre os primeiros 10 resíduos do resíduo C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 20 resíduos do resíduo C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 30 resíduos do resíduo C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 40 resíduos do resíduo C-terminal. Em alguns casos, o pelo menos um aminoácido não natural está localizado dentre os primeiros 50 resíduos do resíduo C-terminal.

[0048] Em alguns casos, pelo menos um aminoácido não natural é o resíduo C-terminal.

[0049] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 modificados compreendem pelo menos um aminoácido não natural, em que uma posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição do resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 com o receptor α da interleucina 15 (IL-15R α). Em algumas modalidades, a diminuição na afinidade de ligação é relativa à afinidade de ligação entre um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem e o IL-15R α . Em algumas modalidades, a ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado ao IL-15R α não afeta a interação do polipeptídeo da IL-15 modificado com o receptor $\beta\gamma$ da interleucina 2/interleucina 15 (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) ou melhora a interação do polipeptídeo da IL-15 modificado com IL-2/IL-15R $\beta\gamma$. Em alguns casos, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre Y26, E46, V49, E53 e L25, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas

modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre A23, T24, E89 e E93, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D22, L44, Q48 e E90, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é Y26. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E46. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é V49. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E53. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é L25. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda um PEG. Em alguns casos, o PEG é conjugado a uma posição do resíduo selecionado dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda um PEG para meia-vida aumentada. Em alguns casos, o PEG é conjugado a uma posição do resíduo selecionada dentre 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 e F110, para meia-vida aumentada. Em alguns casos, o PEG é conjugado em uma posição do resíduo selecionada dentre N71, N72 e N77. Em alguns casos, o resíduo conjugado com o PEG é mutado a um aminoácido natural. Em outros casos, o resíduo conjugado com o PEG é mutado a um aminoácido não natural. Em casos adicionais, a mutação em N71, N72 ou N77 melhora ainda uma condição CMC (por exemplo, rendimento, pureza, estabilidade, agre-

gação reduzida e/ou melhoria da dobragem de proteínas), potência ou uma combinação destes.

[0050] Em alguns casos, os polipeptídeos da IL-15 modificados compreendem pelo menos um aminoácido não natural, em que pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição do resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com o IL-2/IL-15R β , IL-15R γ , ou uma combinação destes. Em algumas modalidades, a IL-15 modificada tem pouco ou nenhum efeito na interação com o IL-15R α . Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N1, V3, N4, I6, S7, D8, K10, K11, E28, S29, D30, V31, H32, P33, D61, T62, E64, N65, I68, L69, N72, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição do resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com IL-2/IL-15R β . Em alguns casos, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 e N72, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N4, S7, K11 e D61. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D8, E64, N65, I68 e N72. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N1, T62 e L69. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N4. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S7. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é K11. Em

alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é D61. Em algumas modalidades, pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição do resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com IL-2/IL-15R γ . Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre E28, P33, S102 e V104. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre I6 e V31. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é V3. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é K10. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S29. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é D30. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é H32. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é H105. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é Q108. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é M109. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é I111. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N112. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é T113. Em alguns casos, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natu-

ral é S114. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda um PEG. Em alguns casos, o PEG é conjugado a uma posição do resíduo selecionada dentre N1, V3, N4, I6, S7, D8, K10, K11, E28, S29, D30, V31, H32, P33, D61, T62, E64, N65, I68, L69, N72, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda um PEG para meia-vida aumentada. Em alguns casos, o PEG é conjugado a uma posição do resíduo selecionada dentre 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 e F110 para meia-vida aumentada. Em alguns casos, o PEG é conjugado em uma posição do resíduo selecionada dentre N71, N72 e N77. Em alguns casos, o resíduo conjugado com o PEG é mutado a um aminoácido natural. Em outros casos, o resíduo conjugado com o PEG é mutado a um aminoácido não natural. Em casos adicionais, a mutação em N71, N72 ou N77 melhora ainda uma condição CMC (por exemplo, rendimento, pureza, estabilidade, agregação reduzida e/ou melhoria da dobragem de proteínas), potência ou uma combinação destes.

[0051] Em alguns casos, os polipeptídeos da IL-15 modificados compreendem pelo menos um aminoácido não natural, em que pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição do resíduo que não afeta a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com IL-15R α e IL-15R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda um PEG para meia-vida aumentada. Em algumas modalidades, a IL-15 modificada compreende um PEG sem mudança na atividade biológica. Em algumas modalidades, o resíduo é modificado para extensão de meia-vida. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido

não natural é selecionada dentre 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 e F110, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97 e E98, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre E13, L15, M19, H20, K36, V37, T38, S54, H60, I67, N71, G78, K86, E87 e Q101, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre I21, S34, C35, L44, V63, S73, L74, E82, C85, C88, L91, I96, L100 e F110, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N71, N72 e N77, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N77 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é D14. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é Q17. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S18. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é K41. Em algumas modalidades, a posição do

resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S51. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é L52. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é G55. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é D56. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é A57. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S58. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S75. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S76. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N77. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N79. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é V80. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é T81. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é G84. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E92. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é K94. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é N95. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é K97. Em algumas modalidades, a posição do resíduo do pelo menos um aminoácido não natural é E98. Em alguns casos, a mutação em N71, N72 ou N77 compreende uma mutação para um aminoácido natural. Em alguns casos, a mutação em N71, N72 ou N77 melhora ainda uma condição CMC (por exemplo, rendimento, pureza, estabilidade, agregação

reduzida e/ou melhoria da dobragem de proteínas), potência ou uma combinação destes.

[0052] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 compreendendo pelo menos um aminoácido não natural é ainda conjugado com uma porção conjugada para gerar um conjugado da IL-15. Em alguns casos, a posição do aminoácido de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre 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 ou S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, a posição do aminoácido de pelo menos um aminoácido não natural é 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 ou S114. Em alguns casos, a porção conjugante está ligada ao pelo menos um aminoácido não natural. Em alguns casos, a porção conjugada é ligada ao resíduo de aminoácidos N-terminal ou C-terminal. Em algumas modalidades, a porção conjugante está diretamente ligada ao pelo menos um aminoácido não natural ou a um resíduo terminal. Em outros casos, a porção conjugante está indiretamente ligada ao pelo

menos um aminoácido não natural ou a um resíduo terminal por meio de um ligante descrito abaixo.

[0053] Em algumas modalidades, a menor afinidade do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 com uma subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α) em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 10%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 20%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 40%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 50%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 60%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 80%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 90%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 95%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de 100%.

[0054] Em algumas modalidades, a menor afinidade do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 com uma subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α) em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem é de cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 1 vez. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 2 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 4 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 5 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 6 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 8 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 10 vezes.

[0055] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 não interage com IL-15R α .

[0056] Em algumas modalidades, a menor afinidade do polipeptí-

deo da IL-15 ou conjugado da IL-15 com uma subunidade do receptor da IL-2 (IL-2R) em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99%. Em algumas modalidades, a subunidade de IL-2R é IL-2R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 10%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 20%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 40%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 50%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 60%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 80%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 90%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 95%. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de 100%.

[0057] Em algumas modalidades, a menor afinidade do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 com uma subunidade do receptor da IL-2 (IL-2R) em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem é de cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais. Em algumas modalidades, a subunidade de IL-2R é IL-2R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 1 vez. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 2 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 4 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 5 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 6 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 8 vezes. Em algumas modalidades, a menor afinidade é de cerca de 10 vezes.

[0058] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 não interage com IL-2R α .

[0059] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada. Em alguns casos, a

meia-vida aumentada é comparada a uma meia-vida de uma proteína IL-15 do tipo selvagem ou conjugado da IL-15 do tipo selvagem.

[0060] Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo 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 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 30 dias, ou mais do que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 90 minutos ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 2 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 3 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 4 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 5 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 6 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 10 horas ou mais que a meia-vida da proteína

IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 12 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 18 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 24 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 36 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 48 horas ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 3 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 4 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 5 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 6 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-

vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 7 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 10 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 12 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 14 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 21 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 28 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de pelo menos 30 dias ou mais que a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou do conjugado da IL-15 do tipo selvagem.

[0061] Em alguns casos, a meia-vida aumentada do polipeptídeo da IL-15 ou conjugado da IL-15 é de cerca de 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 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias ou 30 dias, em comparação com a meia-vida da proteína IL-15 do tipo selvagem ou conjugado da IL-15 do tipo selvagem. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumenta-

da de cerca de 90 minutos. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 2 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 3 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 4 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 5 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 6 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 7 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 8 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 9 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 10 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 11 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 12 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 18 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 24 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 36 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida

aumentada de cerca de 48 horas. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 3 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 4 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 5 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 6 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 7 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 10 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 12 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 14 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 21 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 28 dias. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 biologicamente ativo ou conjugado da IL-15 tem uma meia-vida aumentada de cerca de 30 dias.

[0062] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado mantém uma potência de sinalização significativa com o complexo de sinalização receptor $\beta\gamma$ da interleucina 15 (IL-15R $\beta\gamma$). Em alguns casos, a potência de sinalização é comparada a uma potência de sinalização entre um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem e IL-15R $\beta\gamma$. Em alguns casos, uma diferença na potência de sinalização do receptor entre o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ modificado e o complexo IL-15/IL-

IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem é menor que 1000 vezes, menor que 500 vezes, menor que 200 vezes, menor que 100 vezes, menor que 50 vezes, menor que 10 vezes, menor que 5 vezes, menor que 4 vezes, menor que 3 vezes, menor que 2 vezes ou menor que 1 vez. Em alguns casos, uma diferença na potência de sinalização do receptor entre o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ modificado e o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem é maior que 10 vezes, maior que 20 vezes, maior que 30 vezes, maior que 40 vezes, maior que 50 vezes, maior que 100 vezes, maior que 200 vezes, maior que 300 vezes, maior que 400 vezes, ou maior que 500 vezes. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um agonista parcial, por exemplo, um agonista que ativa um receptor (por exemplo, um complexo de sinalização do IL-15R $\beta\gamma$), mas tem apenas uma eficácia parcial no receptor em relação a um agonista completo. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado é um agonista completo, por exemplo, um agonista que ativa um receptor (por exemplo, um complexo de sinalização do IL-15R $\beta\gamma$) em uma resposta máxima.

[0063] Em alguns casos, a potência de sinalização do receptor é medida por um valor EC50. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado fornece um valor EC50 menor que 1000 vezes, menor que 500 vezes, menor que 200 vezes, menor que 100 vezes, menor que 50 vezes, menor que 10 vezes, menor que 5 vezes, menor que 4 vezes, menor que 3 vezes, menor que 2 vezes, ou menor que 1 vez diferente de um valor EC50 do complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado fornece um valor EC50 maior que 10 vezes, maior que 20 vezes, maior que 30 vezes, maior que 40 vezes, maior que 50 vezes, maior que 100 vezes, maior que 200 vezes, maior que 300 vezes, maior que 400 vezes ou maior que 500 vezes diferente de um valor EC50 do complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem.

[0064] Em alguns casos, a potência de sinalização do receptor é medida por um valor ED50. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado fornece um valor ED50 menor que 1000 vezes, menor que 500 vezes, menor que 200 vezes, menor que 100 vezes, menor que 50 vezes, menor que 10 vezes, menor que 5 vezes, menor que 4 vezes, menor que 3 vezes, menor que 2 vezes, ou menor que 1 vez diferente de um valor EC50 do complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 modificado fornece um valor ED50 maior que 10 vezes, maior que 20 vezes, maior que 30 vezes, maior que 40 vezes, maior que 50 vezes, maior que 100 vezes, maior que 200 vezes, maior que 300 vezes, maior que 400 vezes ou maior que 500 vezes diferente de um valor EC50 do complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ do tipo selvagem.

[0065] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é modificado (por exemplo, peguilado) para estender a meia-vida, melhorar a estabilidade, melhorar o rendimento da purificação, melhorar a pureza, diminuir a agregação, melhorar a dobra de proteínas ou uma combinação destes, durante o estágio de Química, Fabricação e Controles (Chemistry, Manufacturing and Controls - CMC). Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado em uma posição de aminoácidos: N71, N72 ou N77, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1. Em alguns casos, um polipeptídeo da IL-15 é modificado no resíduo N77, por exemplo, através de peguilação, para estender a meia-vida, melhorar a estabilidade, melhorar o rendimento da purificação, melhorar a pureza, diminuir a agregação, melhorar a dobra de proteínas ou uma combinação destes, durante o estágio de CMC. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificando ainda na posição 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 ou S114. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado ainda na posição D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 ou E93, em que a modificação prejudica a interação com IL-15R α . Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado ainda na posição N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 ou N72, em que a modificação prejudica a interação com IL-15R β . Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado ainda na posição V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 ou S114, em que a modificação prejudica a interação com IL-15R γ . Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado ainda na posição 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 ou F110, em que a modificação melhora a extensão da meia-vida. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é modificado ainda em uma ou mais das posições acima para prejudicar a interação com ao IL-15R α , prejudicando a interação com o IL-15R β , prejudicando a interação com o IL-15R γ , melhorando a extensão da meia-vida ou uma combinação destas.

Precursores dos conjugados da IL-15

[0066] São divulgados aqui os precursores dos conjugados da IL-15, compreendendo um polipeptídeo da IL-15 modificado, em que um ou mais aminoácidos foram modificados do aminoácido do tipo selvagem. Tais precursores são frequentemente usados com os métodos

revelados aqui para o tratamento de doenças ou condições. Em algumas modalidades, um precursor da IL-15 não é conjugado. Essas mutações variadamente incluem adições, exclusões ou substituições. Em alguns casos, a adição inclui a inclusão de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais resíduos no N-terminal, no C-terminal ou em uma região interna do polipeptídeo da IL-15. Em casos adicionais, a deleção compreende a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais resíduos do N-terminal, do C-terminal ou dentro de uma região interna do polipeptídeo da IL-15.

Aminoácidos naturais e não naturais

[0067] Em algumas modalidades, um resíduo de aminoácidos revelado aqui (por exemplo, dentro de um polipeptídeo da IL-15) é mutado para lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina ou tirosina antes de se ligar (ou reagir com) a uma porção conjugada. Por exemplo, a cadeia lateral de lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina ou tirosina pode se ligar a uma porção conjugada revelada aqui. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para cisteína, lisina ou histidina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para cisteína. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para lisina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para histidina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para tirosina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é modificado para triptofano. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido está localizado próximo ao N-terminal ou C-terminal, no N- ou C-terminal, ou em uma posição do resíduo interna. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido é o resíduo N- ou C-terminal e a mutação é para cisteína ou lisina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido está localizado proximal ao resíduo N- ou C-terminal (por exemplo, dentro de 50, 40, 30, 20 ou 10 resíduos do resíduo N- ou C-terminal) e a mu-

tação é para cisteína ou lisina.

[0068] Em alguns casos, um resíduo do aminoácido é adicionado ao resíduo N- ou C-terminal, ou seja, o polipeptídeo da IL-15 compreende um resíduo do aminoácido adicional no N- ou C-terminal e o resíduo do aminoácido adicional é cisteína ou lisina. Em alguns casos, o resíduo do aminoácido adicional é cisteína. Em alguns casos, o aminoácido adicional é conjugado com uma porção conjugada.

[0069] Em algumas modalidades, um resíduo de aminoácido descrito aqui (por exemplo, dentro de um polipeptídeo da IL-15) é modificado para um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, um aminoácido não natural não é conjugado com uma porção conjugada. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 revelado aqui compreende um aminoácido não natural, no qual a IL-15 é conjugada à proteína, em que o ponto de fixação não é o aminoácido não natural.

[0070] Em algumas modalidades, um resíduo de aminoácido descrito aqui (por exemplo, dentro de um polipeptídeo da IL-15) é modificado para um aminoácido não natural antes de se ligar a uma porção conjugada. Em alguns casos, a mutação para um aminoácido não natural previne ou minimiza uma resposta de auto antígeno do sistema imunológico. Como usado aqui, o termo "aminoácido não natural" refere-se a um aminoácido que não seja os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente na proteína. Exemplos não limitantes de aminoácidos não naturais incluem: p-acetil-L-fenilalanina, p-iodo-L-fenilalanina, p-metoxifenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil) alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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, fosfonotirosina, p-bromofenilalanina, selenocisteína, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-

fenilalanina, N6-[(2-azidoetóxi) carbonil]-L-lisina (AzK), um análogo não natural de um aminoácido tirosina; um análogo não natural de um aminoácido glutamina; um análogo não natural de um aminoácido fenilalanina; um análogo não natural de um aminoácido serina; um análogo não natural de um aminoácido treonina; um aminoácido substituído com alquila, arila, acila, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxila, alquenila, alquinila, éter, tiol, sulfonila, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldeído, hidroxilamina, ceto ou amino, ou uma combinação dos mesmos; um aminoácido com um reticulador fotoativável; um aminoácido marcado com spin; um aminoácido fluorescente; um aminoácido de ligação a metal; um aminoácido contendo metal; um aminoácido radioativo; um aminoácido fotoencapsulado e/ou fotoisomerizável; um aminoácido contendo biotina ou análogo de biotina; um aminoácido contendo ceto; um aminoácido compreendendo polietilenoglicol ou poliéter; um aminoácido substituído por átomo pesado; um aminoácido quimicamente clivável ou fotoclivável; um aminoácido com uma cadeia lateral alongada; um aminoácido contendo um grupo tóxico; um aminoácido substituído com açúcar; um aminoácido contendo açúcar ligado a carbono; um aminoácido redox ativo; um ácido contendo um α -hidróxi; um amino tioácido; um aminoácido α , α dissubstituído; um β -aminoácido; um aminoácido cíclico diferente de prolina ou histidina, e um aminoácido aromático diferente de fenilalanina, tirosina ou triptofano.

[0071] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural compreende um grupo reativo seletivo, ou um grupo reativo para a rotulagem sítio seletiva de um polipeptídeo alvo. Em alguns casos, a química é uma reação biortogonal (por exemplo, reações biocompatíveis e seletivas). Em alguns casos, a química é uma reação de formação de triazol alcino-azida catalisada por Cu(I) ou "livre de cobre", a ligadura de Staudinger, a reação de Diels-Alder de demanda de elétrons inver-

sa (IEDDA), a química de "clique fotográfico" ou um processo mediado por metal, como metatese de olefina e acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura ou Sonogashira.

[0072] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural compreende um grupo fotorreativo, que se reticula, após irradiação com, por exemplo, UV.

[0073] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural compreende um aminoácido fotoencapsulado.

[0074] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado de aminoácidos *para*-substituído, *meta*-substituído ou *orto*-substituído.

[0075] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende p-acetil-L-fenilalanina, p-azido metil-L-fenilalanina (pAMF), p-iodo-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, p-metoxifenilalanina, p-propargil-oxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-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, fosfonosserina, fosfontirosina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina ou isopropil-L-fenilalanina.

[0076] Em alguns casos, o aminoácido não natural é 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxi-fenilalanina ou 3-iodotirosina.

[0077] Em alguns casos, o aminoácido não natural é fenilselenocisteína.

[0078] Em alguns casos, o aminoácido não natural é benzofenona, cetona, iodeto, metoxi, acetila, benzoíla ou azida contendo derivados de fenilalanina.

[0079] Em alguns casos, o aminoácido não natural é benzofenona, cetona, iodeto, metóxi, acetila, benzoíla ou azida contendo derivados de lisina.

[0080] Em alguns casos, o aminoácido não natural é compreende uma cadeia lateral aromática.

[0081] Em alguns casos, o aminoácido não natural não compreende uma cadeia lateral aromática.

[0082] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo azida.

[0083] Em alguns casos, o aminoácido não natural é compreende um grupo aceptor de Michael. Em alguns casos, os grupos aceptores de Michael compreendem uma porção insaturada capaz de formar uma ligação covalente por meio de uma reação de 1,2 adições. Em alguns casos, os grupos aceptores de Michael compreendem alquenos ou alcinos com deficiência de elétrons. Em alguns casos, os grupos aceptores de Michael incluem, mas não se limitam a alfa, beta insaturados: cetonas, aldeídos, sulfóxidos, sulfonas, nitrilas, iminas ou aromáticos.

[0084] Em alguns casos, o aminoácido não natural é desidroalanina.

[0085] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo de aldeído ou cetona.

[0086] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado de lisina compreendendo um grupo de aldeído ou cetona.

[0087] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado lisina compreendendo um ou mais átomos O, N, Se ou S na posição beta, gama ou delta. Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado lisina compreendendo átomos O, N, Se ou S na posição gama.

[0088] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado lisina em que o átomo épsilon N é substituído por um átomo de oxigênio.

[0089] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado

lisina que é lisina modificada pós-translacionalmente de não ocorrência natural.

[0090] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um aminoácido compreendendo uma cadeia lateral, em que o sexto átomo da posição alfa compreende um grupo carbonila. Em alguns casos, o aminoácido não natural é um aminoácido compreendendo uma cadeia lateral, em que o sexto átomo da posição alfa compreende um grupo carbonila, e o quinto átomo da posição alfa é um nitrogênio. Em alguns casos, o aminoácido não natural é um aminoácido compreendendo uma cadeia lateral, em que o sétimo átomo da posição alfa é um átomo de oxigênio.

[0091] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado de serina compreendendo selênio. Em alguns casos, o aminoácido não natural é a selenoserina (ácido 2-amino-3-hidroselenopropânico). Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-3-((2-((3-(benzilóxi)-3-oxopropil)amino)etil)selanil)propânico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-3-(fenilselanil)propânico. Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende o selênio, em que a oxidação do selênio resulta na formação de um aminoácido não natural que compreende um alqueno.

[0092] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo ciclo-octinila.

[0093] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo transciclo-octenila.

[0094] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo norbornenila.

[0095] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo ciclopropenila.

[0096] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo diazirina.

[0097] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um grupo tetrazina.

[0098] Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado de lisina em que o nitrogênio de cadeia lateral é carbamilatado. Em alguns casos, o aminoácido não natural é um derivado de lisina em que o nitrogênio de cadeia lateral é acilado. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(terc-butóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(terc-butóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-Boc-N6-metilisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-acetilisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é a pirrolisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-trifluoroacetilisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(benzilóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(p-iodobenzilóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(p-nitrobenzilóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-prolilisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(ciclopentilóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(ciclopentanocarbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(tetrahydrofurano-2-carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(3-etiniltetrahydrofurano-2-carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((prop-2-in-1-ilóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-{{(2-azidociclopentilóxi)carbonil}amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-[(2-azidoetóxi)carbonil]lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-

6-[[2-nitrobenzilóxi)carbonil]amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-[[2-ciclooctinilóxi)carbonil]amino}hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(2-aminobut-3-inoil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-6-((2-aminobut-3-inoil)óxi)hexanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(aliloxicarbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(butenil-4-oxicarbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(pentenil-5-oxicarbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((but-3-in-1-ilóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((pent-4-in-1-ilóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(tiazolidina-4-carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-8-oxononanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-8-oxooctanoico. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(2-oxoacetil)lisina.

[0099] Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-propionililina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-butilililina, em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-(but-2-enoil)lisina, em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((espiro[2.3]hex-1-en-5-ilmetóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((4-(1-(trifluorometil)cicloprop-2-en-1-il)benzil)óxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilmetóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é a cisteinililina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((2-(3-metil-3H-diazirin-3-il)etóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é

N6-((3-(3-metil-3H-diazirin-3-il)propóxi)carbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((meta nitrobenilóxi)N6-metilcarbonil)lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetóxi)carbonil)-lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é N6-((ciclo-hept-3-in-1-ilóxi)carbonil)-L-lisina.

[00100] Em alguns casos, o aminoácido não natural é o ácido 2-amino-3-(benzilóxi)carbonil)amino)metil)selanil)propanoico.

[00101] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um códon de parada ocre, opal ou âmbar readaptado.

[00102] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um códon de 4 bases.

[00103] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um raro códon de sentido readaptado ou um códon de senso comum readaptado.

[00104] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um códon sintético compreendendo um ácido nucleico não natural.

[00105] Em alguns casos, o aminoácido não natural é incorporado à IL-15 um par tRNA /sintetase modificado ortogonal. Esses pares ortogonais compreendem uma sintetase não natural que é capaz de carregar o tRNA não natural com o aminoácido não natural, enquanto minimiza a carga de a) outros aminoácidos endógenos para o tRNA não natural e b) aminoácidos não naturais para outros tRNAs endógenos. Esses pares ortogonais compreendem tRNAs capazes de serem carregados pela sintetase não natural, evitando, ao mesmo tempo, ser carregados com outros aminoácidos endógenos por sintetases endógenas. Em algumas modalidades, esses pares são identificados a partir de vários organismos, como bactérias, leveduras, arcaea ou fontes humanas. Em algumas modalidades, um par de sintetase

/tRNA ortogonal compreende componentes de um único organismo. Em algumas modalidades, um par de sintetase/tRNA ortogonal compreende componentes de dois organismos diferentes. Em algumas modalidades, um par de sintetase/tRNA ortogonal compreende componentes que antes da modificação promovem a tradução de dois aminoácidos diferentes. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma alanina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma arginina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma asparagina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é um ácido aspártico sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma cisteína sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma glutamina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é um ácido glutâmico sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma alanina glicina modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma histidina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma leucina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma isoleucina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma lisina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma metionina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma fenilalanina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma prolina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma serina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma treonina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é um triptofano sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma tirosina sintetase modificada. Em

algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma valina sintetase modificada. Em algumas modalidades, uma sintetase ortogonal é uma fosfoserina sintetase modificada. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de alanina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de arginina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de asparagina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de ácido aspártico modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de cisteína modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de glutamina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de ácido glutâmico modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é uma glicina alanina modificada. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de histidina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de leucina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de isoleucina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de lisina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de metionina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de fenilalanina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de prolina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de serina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de treonina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de triptofano modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de tirosina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de valina modificado. Em algumas modalidades, um tRNA ortogonal é um tRNA de fosfoserina modificado.

[00106] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um par aminoacil (aaRS ou

RS)-tRNA sintetase-tRNA. Os pares exemplares de aaRS-tRNA incluem, mas não se limitam a, pares aaRS/tRNA de *Methanococcus jannaschii* (Mj-Tyr), pares TyrRS (*Ec-Tyr*) de *E.coli*/ tRNA_{CUA} de *B. steaerothermophilus*, pares LeuRS (*Ec-Leu*) de *E.coli*/ tRNA_{CUA} de *B. steaerothermophilus* e pares de pirrolisil-tRNA. Em alguns casos, o aminoácido não natural é incorporado à citocina (por exemplo, o polipeptídeo da IL) por um par *Mj-TyrRS*/tRNA. UAAs exemplificadores que podem ser incorporados por um par *Mj-TyrRS*/tRNA incluem, mas não se limitam a, derivados de fenilalanina para-substituídos, como *p*-aminofenilalanina e *p*-metoifenilalanina; derivados de tirosina meta-substituídos, como 3-aminotirosina, 3-nitrotirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina e 3-iodotirosina; fenilselenocisteína; *p*-boronofenilalanina; e *o*-nitrobenziltirosina.

[00107] Em alguns casos, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um par *Ec-Tyr*/tRNA_{CUA} ou um *Ec-Leu*/tRNA_{CUA}. UAAs exemplificadores que podem ser incorporados por um par *Ec-Tyr*/tRNA_{CUA} ou um *Ec-Leu*/tRNA_{CUA} incluem, mas não se limitam a, derivados de fenilalanina contendo substituintes de benzeno, cetona, iodeto ou azida; *o*-propargiltirosina; ácido α -aminocapílico *O*-metil-tirosina, *O*-nitrobenzil cisteína e ácido 3-(naftaleno-2-ilamino)-2-amino-propanoico.

[00108] Em alguns casos, o aminoácido não natural é incorporado ao polipeptídeo da IL-15 por um par pirrolisil-tRNA. Em alguns casos, a PylRS é obtida de um arqueobacteriano, por exemplo, de um arqueobacteriano metanogênico. Em alguns casos, o PylRS é obtido a partir de *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* ou *Methanosarcina acetivorans*. UAAs exemplares que podem ser incorporados por um par pirrolisil-tRNA incluem, mas não se limitam a, lisinas substituídas por amida e carbamato, como ácido 2-amino-6-((R)-tetrahydrofurano-2-carboxamido)hexanoico, *N*- ϵ -D-prolil-L-lisina, e *N*- ϵ -

ciclopentiloxicarbonil-L-lisina; *N*- ϵ -acriloil-L-lisina; *N*- ϵ -[(1-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)etóxi)carbonil]-L-lisina; e *N*- ϵ -(1-metilciclopro-2-enocarboxamido)lisina.

[00109] Em alguns casos, um aminoácido não natural é incorporado a um polipeptídeo da IL-15 por uma sintetase revelada em US 9.988.619 e 9.938.516. UAAs exemplificadores que podem ser incorporados por tais sintetases incluem aminoácidos não naturais parametilazido-L-fenilalanina, aralquila, heterociclila, heteroaralquila, entre outros. Em algumas formas, tais UAAs compreendem piridila, pirazinila, pirazolila, triazolila, oxazolila, tiazolila, tiofenila ou outro heterocíclico. Tais aminoácidos em algumas modalidades compreendem azidas, tetrazinas ou outro grupo químico capaz de conjugar a um parceiro de acoplamento, como uma porção solúvel em água. Em algumas modalidades, tais sintetases são expressadas e utilizadas para incorporar UAAs em citocinas in-vivo. Em algumas modalidades, tais sintetases são usadas para incorporar UAAs em citocinas usando um sistema de tradução sem células.

[00110] Em alguns casos, o aminoácido não natural é incorporado a um polipeptídeo da IL-15 por uma sintetase de ocorrência natural. Em algumas modalidades, um aminoácido não natural é incorporado a uma citocina por um organismo que é auxotrófico para um ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, as sintetases correspondentes ao aminoácido auxotrófico são capazes de carregar o tRNA correspondente com um aminoácido não natural. Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é a selenocisteína, ou um derivado deste. Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é a selenometionina, ou um derivado deste. Em algumas modalidades, o aminoácido não natural é um aminoácido aromático, no qual o aminoácido aromático compreende um haleto de arila, como um iodeto. Em modalidades, o aminoácido não natural é estruturalmente semelhante ao

aminoácido auxotrófico.

[00111] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural ilustrado na **FIG. 1**.

[00112] Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um derivado ou análogo de lisina ou fenilalanina. Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um derivado de lisina ou um análogo de lisina. Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende uma pirrolisina (Pyl). Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um derivado de fenilalanina ou análogo de fenilalanina. Em alguns casos, o aminoácido não natural é um aminoácido não natural descrito em Wan, et al., "Pyrrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool," *Biochem Biophys Acta* 1844(6): 1059-4070 (2014). Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural ilustrado na **Fig. 2** (p.ex., **Fig. 2A** e **Fig. 2B**).

[00113] Em algumas modalidades, o aminoácido não natural compreende um aminoácido não natural ilustrado na **Fig. 3A - Fig. 3D** (adotadas da Tabela 1 de Dumas *et al.*, *Chemical Science* 2015, **6**, 50-69).

[00114] Em algumas modalidades, um aminoácido não natural incorporado a um polipeptídeo da IL-15 é revelado nos EUA 9.840.493; US 9.682.934; US 2017/0260137; US 9.938.516; ou US 2018/0086734. UAAs exemplificadores que podem ser incorporados por tais sintetases incluem aminoácidos não naturais para-metilazido-L-fenilalanina, aralquila, heterociclila e heteroaralquila, e aminoácidos não naturais derivados de lisina. Em algumas formas, tais UAAs compreendem piridill, pirazinila, pirazolila, triazolila, oxazolila, tiazolila, tiofenil ou outro heterocíclico. Tais aminoácidos em algumas modalidades compreendem azidas, tetrazinas ou outro grupo químico capaz de conjugar a um parceiro de acoplamento, como uma porção solúvel em

água. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma azida ligada a uma porção aromática por meio de um ligante alquila. Em algumas modalidades, um ligante alquila é um ligante C₁-C₁₀. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma tetrazina ligada a uma porção aromática através de um ligante alquila. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma tetrazina ligada a uma porção aromática por meio de um grupo amino. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma tetrazina ligada a uma porção aromática por meio de um grupo alquilamino. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma azida ligada ao nitrogênio terminal (por exemplo, N6 de um derivado lisina, ou N5, N4 ou N3 de um derivado compreendendo uma cadeia lateral alquila mais curta) de uma cadeia lateral de aminoácidos através de uma cadeia alquila. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma tetrazina ligada ao nitrogênio terminal de uma cadeia lateral de aminoácidos através de uma cadeia de alquila. Em algumas modalidades, um UAA compreende uma azida ou tetrazina ligada a uma amida através de um ligante alquila. Em algumas modalidades, o UAA é uma azida ou tetrazina contendo carbamato ou amida de 3-aminoalanina, serina, lisina ou derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, tais UAAs são incorporados a citocinas in-vivo. Em algumas modalidades, tais UAAs são incorporadas em citocinas usando um sistema sem células.

Porções conjugantes

[00115] Em certas modalidades, são reveladas aqui porções conjugantes ligadas a um ou mais polipeptídeos da IL-15 modificados descritos supra. Em algumas modalidades, a porção conjugante é uma molécula que perturba a interação da IL-15 com o seu receptor. Em algumas modalidades, a porção conjugante é qualquer que quando se liga à IL-15, permite que o conjugado da IL-15 module uma resposta imune. Em algumas modalidades, a porção conjugante está ligada à

IL-15 através de uma ligação covalente. Em alguns casos, uma IL-15 descrita aqui é anexada a uma porção conjugante com um grupo triazol. Em alguns casos, uma IL-15 descrita aqui está anexado a uma porção conjugante com um grupo de di-hidropiridazina ou piridazina. Em algumas modalidades, a porção conjugante compreende um polímero solúvel em água. Em outros casos, a porção conjugante compreende uma proteína ou um fragmento de ligação desta. Em casos adicionais, a porção conjugante compreende um peptídeo. Em casos adicionais, a porção conjugante compreende um ácido nucleico. Em modalidades adicionais, a porção conjugante compreende uma molécula pequena. Em casos adicionais, a porção conjugante compreende um bioconjugado (por exemplo, um agonista de TLR, como um agonista TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 ou TLR9; ou um ligante sintético, como Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poly I:C, Poly A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA ou Flagelina). Em alguns casos, a porção conjugante aumenta a meia-vida sérica e/ou melhora a estabilidade. Em alguns casos, a porção conjugante reduz a interação da citocina com um ou mais domínios ou subunidades receptores de citocinas. Em casos adicionais, a porção conjugante bloqueia a interação da IL-15 com um ou mais domínios da IL-15 ou subunidades com seus receptores cognados. Em algumas modalidades, os conjugados da IL-15 descritos aqui compreendem múltiplas porções conjugantes. Em algumas modalidades, uma porção conjugante é ligada a um aminoácido natural ou não natural no polipeptídeo da IL-15. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreende uma porção conjugante ligada a um aminoácido natural. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 é ligado a um aminoácido não natural no peptídeo de citocinas. Em algumas modalidades, uma porção conjugante é ligada ao aminoácido N- ou C-terminal do polipeptídeo da IL-15. Vários locais de combinações são revelados

aqui, por exemplo, uma primeira porção conjugante é ligada a um aminoácido natural ou natural no polipeptídeo da IL-15, e uma segunda porção conjugante é ligada ao aminoácido N- ou C-terminal do polipeptídeo da IL-15. Em algumas modalidades, uma única porção conjugante é ligada a vários resíduos do polipeptídeo da IL-15 (por exemplo, um grampo). Em algumas modalidades, uma porção conjugante é ligada a ambos os aminoácidos N- e C-terminal do polipeptídeo da IL-15.

Polímeros solúveis em água

[00116] Em algumas modalidades, a porção conjugante descrita aqui é um polímero solúvel em água. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água é não peptídico, não tóxico e biocompatível. Tal como usado aqui, uma substância é considerada biocompatível se os efeitos benéficos associados ao uso da substância isoladamente ou com outra substância (por exemplo, um agente ativo, como uma porção da IL-15) em conexão com os tecidos vivos (por exemplo, administração a um paciente) supera qualquer efeito deletério avaliado por um clínico, por exemplo, um médico. Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água é ainda não imunogênico. Em algumas modalidades, uma substância é considerada não imunogênica se o uso pretendido da substância in vivo não produzir uma resposta imune indesejada (por exemplo, a formação de anticorpos) ou, se uma resposta imune for produzida, tal que a resposta não é considerada clinicamente significativa ou importante, conforme avaliado por um clínico, por exemplo, um médico, um toxicologista ou um especialista em desenvolvimento clínico.

[00117] Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água é caracterizado como tendo de cerca de 2 a cerca de 300 términos. Polímeros solúveis em água exemplares incluem, mas não se limitam a, poli(alquilenos glicóis), como polietileno glicol ("PEG"), po-

li(propilenoglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol e similares, poli(poliol oxetilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli(hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinás ("POZ") (que são descritos em WO 2008/106186), poli(N-acriloilmorfolina), e combinações de qualquer um dos anteriores.

[00118] Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água não é limitado a uma estrutura específica. Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água é linear (por exemplo, uma extremidade terminada, por exemplo, PEG alcóxi ou um PEG bifuncional), ramificado ou multiarmado (por exemplo, PEG bifurcado ou PEG ligado a um núcleo de polioliol), uma arquitetura dendrítica (ou estrela), cada uma com ou sem uma ou mais ligações degradáveis. Além disso, a estrutura interna do polímero solúvel em água pode ser organizada em qualquer número de diferentes padrões de repetição e pode ser selecionada no grupo consistindo em homopolímero, copolímero alternado, copolímero aleatório, copolímero de bloco, tripolímero alternado, tripolímero aleatório e tripolímero de bloco.

[00119] Em algumas modalidades, o peso molecular ponderal médio do polímero solúvel em água no conjugado da IL-21 é de cerca de 100 Dáltons a cerca de 150,000 Dáltons. Os intervalos exemplificadores incluem, por exemplo, pesos moleculares ponderais médios na faixa maior que 5.000 Dáltons a cerca de 100.000 Dáltons, na faixa de cerca de 6.000 Dáltons a cerca de 90.000 Dáltons, na faixa de cerca de 10.000 Dáltons a cerca de 85.000 Dáltons, na faixa maior que 10.000 Dáltons a cerca de 85.000 Dáltons, na faixa de cerca de 20.000 Dáltons a cerca de 85.000 Dáltons, na faixa de cerca de 53.000 Dáltons a cerca de 85.000 Dáltons, na faixa de cerca de 25.000 Dáltons a cerca de 120.000 Dáltons, na faixa de cerca de 29.000 Dáltons a cerca

de 120.000 Dáltons, na faixa de cerca de 35.000 Dáltons a cerca de 120.000 Dáltons, e na faixa de cerca de 40.000 Dáltons a cerca de 120.000 Dáltons.

[00120] Pesos moleculares exemplares para o polímero solúvel em água incluem cerca de 100 Dáltons, cerca de 200 Dáltons, cerca de 300 Dáltons, cerca de 400 Dáltons, cerca de 500 Dáltons, cerca de 600 Dáltons, cerca de 700 Dáltons, cerca de 750 Dáltons, cerca de 800 Dáltons, cerca de 900 Dáltons, cerca de 1.000 Dáltons, cerca de 1.500 Dáltons, cerca de 2.000 Dáltons, cerca de 2.200 Dáltons, cerca de 2.500 Dáltons, cerca de 3.000 Dáltons, cerca de 4.000 Dáltons, cerca de 4.400 Dáltons, cerca de 4.500 Dáltons, cerca de 5.000 Dáltons, cerca de 5.500 Dáltons, cerca de 6.000 Dáltons, cerca de 7.000 Dáltons, cerca de 7.500 Dáltons, cerca de 8.000 Dáltons, cerca de 9.000 Dáltons, cerca de 10.000 Dáltons, cerca de 11.000 Dáltons, cerca de 12.000 Dáltons, cerca de 13.000 Dáltons, cerca de 14.000 Dáltons, cerca de 15.000 Dáltons, cerca de 20.000 Dáltons, cerca de 22.500 Dáltons, cerca de 25.000 Dáltons, cerca de 30.000 Dáltons, cerca de 35.000 Dáltons, cerca de 40.000 Dáltons, cerca de 45.000 Dáltons, cerca de 50.000 Dáltons, cerca de 55.000 Dáltons, cerca de 60.000 Dáltons, cerca de 65.000 Dáltons, cerca de 70.000 Dáltons e cerca de 75.000 Dáltons. Também podem ser usadas versões ramificadas do polímero solúvel em água (por exemplo, um polímero ramificado solúvel em água de 40.000 Dalton, composto por dois polímeros de 20.000 Dalton) com uma massa molecular total de qualquer um dos anteriores. Em uma ou mais modalidades, o conjugado não terá quaisquer porções PEG anexadas, direta ou indiretamente, com um PEG com peso molecular ponderal médio menor que cerca de 6.000 Dáltons.

[00121] Os PEGs geralmente compreendem vários monômeros (OCH_2CH_2) [ou monômeros ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)], dependendo de como o PEG

é definido]. Conforme usado aqui, o número de unidades repetidas é identificado pelo subscrito "n" em "(OCH₂CH₂)_n." Assim, o valor de (n) normalmente fica dentro de uma ou mais das seguintes faixas: de 2 a cerca de 3.400, de cerca de 100 a cerca de 2.300, de cerca de 100 a cerca de 2.270, de cerca de 136 a cerca de 2.050, de cerca de 225 a cerca de 1.930, de cerca de 450 a cerca de 1.930, de cerca de 1.200 a de cerca de 1.930, de cerca de 568 a de cerca de 2727, de cerca de 660 a de cerca de 2.730, de cerca de 795 a de cerca de 2.730, de cerca de 795 a de cerca de 2.730, de de cerca de 909 a de cerca de 2.730, e de cerca de 1.200 a de cerca de 1.900. Para qualquer polímero em que se conheça o peso molecular, é possível determinar o número de unidades repetidas (ou seja, "n") dividindo o peso molecular ponderal média total do polímero pelo peso molecular do monômero repetitivo.

[00122] Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água é um polímero com terminais encapados, ou seja, um polímero com pelo menos um terminal terminado com um grupo relativamente inerte, como um grupo inferior alcoxi C₁₋₆ ou um grupo hidroxila. Quando o polímero é PEG, por exemplo, pode ser usado um metóxi-PEG (normalmente referido como mPEG), que é uma forma linear de PEG, em que um terminal do polímero é um grupo metóxi (- OCH₃), enquanto o outro terminal é uma hidroxila ou outro grupo funcional que pode ser opcionalmente modificado quimicamente.

[00123] Em algumas modalidades, os polímeros solúveis em água exemplificadores incluem, mas não se limitam a, PEG discreto linear ou ramificado (dPEG) da Quanta Biodesign, Ltd; PEGs lineares, ramificados ou bifurcados da Nektar Therapeutics; derivados de PEG lineares, ramificados ou em Y da JenKem Technology.

[00124] Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 descrito aqui é conjugado a um polímero solúvel em água selecionado de po-

li(alquilenoglicóis), como polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol e similares, poli(poliol oxietilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacetamida), poli(hidroxiálquilmacetato), poli(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli(álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinas (POZ), poli(N-acrilormorfina) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado com PEG (por exemplo, peguado). Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PPG. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao POZ. Em alguns casos, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PVP.

[00125] Em alguns casos, o polímero solúvel em água compreende um poliglicerol (PG). Em alguns casos, o poliglicerol é um PG hiperramificado (HPG) (por exemplo, conforme descrito 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)). Em outros casos, o poliglicerol é um PG linear (LPG). Em casos adicionais, o poliglicerol é um PG meio funcional, um PG de bloco linear hiperramificado (por exemplo, conforme descrito 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)), ou um PG funcional de cadeia lateral (por exemplo, como descrito por Li, et. al., "Synthesis of linear polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation," *Bioconjugate Chem.* **20**:780–789 (2009)).

[00126] Em alguns casos, um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui é conjugado a um PG, por exemplo, um HPG, um LPG, um PG meio funcional, um PG de bloco linear hiper-ramificado ou um PG funcional de cadeia lateral.

[00127] Em algumas modalidades, o polímero solúvel em água é

um PEG sintético degradável alternativo. Alternativas de PEG sintético degradável exemplificadores incluem, mas não se limitam a, poli[oligo(etilenoglicol)metacrilato de metila] (POEGMA); derivados de PEG modificados por cadeia principal gerados por polimerização de telecético, macromônmeros à base de PEG di-terminal-funcionalizado; derivados de PEG que compreendem co-mônmeros compreendendo ligação degradável, como poli(etileno oxie)-co-(óxido de metileno etileno)[P(EO-co-MEO)], acetais de ceteno cíclicos, como 5,6-benzo-2-metileno-1,3-dioxepano (BMDO), 2-metileno-1,3-dioxepano (MDO) e 2-metileno-4-fenil-1,3-dioxolano (MPDL) copolimerizado com OEGMA; ou poli(ϵ -caprolactona) -enxerto-poli(óxido de etileno) (PCL-g-PEO).

[00128] Em alguns casos, um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui é conjugado com um PEG sintético degradável alternativo, como, por exemplo, POEGM; derivados de PEG modificados pela cadeia principal gerados pela polimerização de telecético, ou macromônmeros à base de PEG di-terminal-funcionalizado; P(EO-co-MEO); acetais cíclicos de ceteno, como BMDO, MDO e MPDL copolimerizado com OEGMA; ou PCL-g-PEO.

[00129] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um poli(zwitterión). Poli(zwitteríons) exemplificadores incluem, mas não se limitam a, poli(metacrilato de sulfobetaina) (PSBMA), poli(metacrilato de carboxibetaina) (PCBMA) e poli(2-metiacriloiloxietil fosforilcolina) (PMPC). Em alguns casos, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um poli(zwitterión), como PSBMA, PCBMA ou PMPC.

[00130] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um policarbonato. Os policarbonos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, pentafluorofenil 5-metilo-2-oxo-1,3-dioxano-5-carboxilato (MTC-OC₆F₅). Em alguns casos, um polipeptí-

deo da IL-15 descrito aqui é conjugado a um policarbonato, como MTC-OC₆F₅.

[00131] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um híbrido de polímero, como por exemplo, um híbrido de polímero de policarbonato/PEG, um conjugado de polímero peptídico/proteína ou um polímero derivado contendo hidroxila e/ou zwitteriônico (por exemplo, um polímero PEG derivado contendo hidroxila e/ou zwitteriônico). Em alguns casos, um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui é conjugado a um híbrido de polímero, como um híbrido de polímero policarbonato/PEG, um conjugado de polímero peptídico/proteína ou um polímero derivado contendo hidroxila e/ou zwitteriônico (por exemplo, um polímero PEG derivado contendo hidroxila e/ou zwitteriônico).

[00132] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um polissacarídeo. Polissacarídeos exemplificadores incluem, mas não estão limitados a, dextrano, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico (HA), amilose, heparina, sulfato de heparano (HS), dextrina ou hidroxietil-amido (HES). Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao dextrano. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PSA. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao HA. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado à amilose. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado à heparina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao HS. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado à dextrina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao HES.

[00133] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um glicano. As classes exemplificadoras de glicanos incluem glicanos *N*-ligados, glicanos *O*-ligados, glicolípídeos, *O*-

GlcNORC e glicosaminoglicanos. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um glicano. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a glicanos N-ligados. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a glicanos O-ligados. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a glicolipídeos. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao O-GlcNAc. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a glicosaminoglicanos.

[00134] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um polímero de polioxazolina. Um polímero de polioxazolina é um polímero sintético linear, e semelhante ao PEG, compreende uma baixa polidispersão. Em algumas modalidades, um polímero de polioxazolina é um polímero de polioxazolina polidisperso, caracterizado por um peso molecular médio. Em algumas modalidades, o peso molecular médio de um polímero de polioxazolina inclui, por exemplo, 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 ou 500,000 Da. Em algumas modalidades, um polímero de polioxazolina compreende poli(2-metil 2-oxazolina) (PMOZ), poli(2-etil 2-oxazolina) (PEOZ) ou poli(2-propil 2-oxazolina) (PPOZ). Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um polímero de polioxazolina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PMOZ. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PEOZ. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao PPOZ.

[00135] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende um polímero de ácido poliacrílico. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um polímero de ácido poliacrílico.

[00136] Em algumas modalidades, um polímero solúvel em água compreende uma poliamina. A poliamina é um polímero orgânico compreendendo dois ou mais grupos primários de amino. Em algumas modalidades, uma poliamina inclui uma poliamina ramificada, uma poliamina linear ou uma poliamina cíclica. Em algumas modalidades, uma poliamina é uma poliamina linear de baixo peso molecular. As poliaminas exemplares incluem putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etilenodiamina, 1,3-diaminopropano, hexametilendiamina, tetraetilenodiamina e piperazina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a uma poliamina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, etileno diamina, 1,3-diaminopropano, hexametilendiamina, tetraetilenodiamina ou piperazina.

Lipídios

[00137] Em algumas modalidades, uma porção conjugada descrita aqui é um lipídio. Em alguns casos, o lipídio é um ácido graxo. Em alguns casos, o ácido graxo é um ácido graxo saturado. Em outros casos, o ácido graxo é um ácido graxo insaturado. Os ácidos graxos exemplificadores incluem, mas não se limitam a, ácidos graxos compreendendo de cerca de 6 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 20 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 18 átomos de carbono, de cerca de 20 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 20 átomos de carbono, ou de cerca de 12 a cerca de 18 átomos de carbono. Em alguns casos, o lipídio se liga a uma ou mais proteínas séricas, aumentando assim a estabilidade sérica e/ou a meia-vida sérica.

[00138] Em algumas modalidades, o lipídio é conjugado a um poli-

peptídeo da IL-15 descrito aqui. Em alguns casos, o lipídio é um ácido graxo, por exemplo, um ácido graxo saturado ou um ácido graxo insaturado. Em certos casos, o ácido graxo é de cerca de 6 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 20 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 18 átomos de carbono, de cerca de 20 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 20 átomos de carbono, ou de cerca de 12 a cerca de 18 átomos de carbono. Em alguns casos, o ácido graxo compreende cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 átomos de carbono de comprimento. Em alguns casos, o ácido graxo compreende ácido caproico (ácido hexanoico), ácido enantônico (ácido heptanoico), ácido capílico (ácido octanoico), ácido pelargônico (ácido nonanoico), ácido caprico (ácido decanoico), ácido undecílico (ácido undecanoico), ácido láurico (ácido decanoico), ácido tridecílico (ácido tridecanoico), ácido mirístico (ácido tetradecanoico), ácido pentadecílico (ácido pentadecanoico), ácido palmítico (ácido hexadecanoico), ácido margarico (ácido heptadecanoico), ácido esteárico (ácido octadecanoico), ácido não adecílico (ácido não adecanoico), ácido araquídico (ácido eicosanoico), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico), ácido beénico (ácido docosanoico), ácido tricosílico (ácido tricosanoico), ácido lignocérico (ácido tetracosanoico), ácido pentacosílico (ácido pentacosanoico) ou ácido cerótico (ácido hexacosanoico).

[00139] Em algumas modalidades, o conjugado lipídico da IL-15 aumenta a estabilidade sérica e/ou a meia-vida sérica.

Proteínas

[00140] Em algumas modalidades, a porção conjugante descrita

aqui é uma proteína ou um fragmento de ligação do mesmo. Proteínas exemplares incluem albumina, transferrina ou transtiretina. Em algumas modalidades, a proteína ou um fragmento de ligação da mesma compreende um anticorpo ou seus fragmentos de ligação. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreende uma proteína ou um fragmento de ligação desta. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreendendo uma proteína ou um fragmento de ligação desta tem uma meia-vida sérica aumentada e/ou estabilidade. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreendendo uma proteína ou um fragmento de ligação desta tem uma interação da IL-15 reduzida com uma ou mais subunidades IL-15R/IL-2R. Em casos adicionais, a proteína ou um fragmento de ligação desta bloqueia a interação da IL-15 com uma ou mais subunidades IL-15R/IL-2R.

[00141] Em algumas modalidades, a porção conjugante é a albumina. A albumina é uma família de proteínas globulares solúveis em água. É comumente encontrada no plasma sanguíneo, compreendendo cerca de 55-60% de todas as proteínas plasmáticas. A albumina sérica humana (HSA) é um polipeptídeo de 585 aminoácidos no qual a estrutura terciária é dividida em três domínios, domínio I (resíduos de aminoácidos 1-195), domínio II (resíduos de aminoácidos 196-383) e domínio III (resíduos de aminoácidos 384-585). Cada domínio compreende ainda um sítio de ligação, que pode interagir de forma reversível ou irreversível com ligantes endógenos, como ácidos graxos de cadeia longa e média, bilirrubina ou hemina, ou compostos exógenos, como compostos heterocíclicos ou aromáticos.

[00142] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a uma albumina. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a uma albumina sérica humana (HSA). Em casos adicionais, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um fragmento funcional da albumina.

[00143] Em algumas modalidades, a porção conjugante é a transferrina. A transferrina é um polipeptídeo de 679 aminoácidos com cerca de 80 kDa de tamanho e compreende dois sítios de ligação Fe^{3+} com um no domínio N-terminal e o outro no domínio C-terminal. Em algumas modalidades, a transferrina humana tem uma meia-vida de cerca de 7 a 12 dias.

[00144] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado com transferrina. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado com a transferrina humana. Em casos adicionais, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um fragmento funcional da transferrina.

[00145] Em algumas modalidades, a porção conjugante é a transtirretina (TTR). A transtirretina é uma proteína de transporte localizada no soro e no líquido cérebro-espinhal que transporta a tiroxina do hormônio da tireoide (T_4) e a proteína de ligação do retinol ligada ao retinol.

[00146] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado com transtirretina (por meio de um de seus terminais ou por meio de uma região de dobradiça interna). Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um fragmento funcional da transtirretina.

[00147] Em algumas modalidades, a porção conjugante é um anticorpo, ou seus fragmentos de ligação. Em algumas modalidades, um anticorpo ou seus fragmentos de ligação compreendem um anticorpo humanizado ou seu fragmento de ligação, anticorpo murino ou seu fragmento de ligação, anticorpo quimérico ou seu fragmento de ligação, anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, fragmentos F(ab)'₃, fragmento variável de cadeia única (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacorpo, minicorpo, nanocorpo, triacorpo, tetracorpo, humacorpo, proteína Fv estabilizada por dissulfeto

(dsFv), anticorpo de domínio único (sdAb), Ig NAR, anticorpo camélídeo ou seu fragmento de ligação, anticorpo biespecífico ou seu fragmento de ligação, ou um derivado quimicamente modificado do mesmo.

[00148] Em alguns casos, a porção conjugada compreende um scFv, bis-scFv, (scFv)₂, dsFv ou sdAb. Em alguns casos, a porção conjugada compreende um scFv. Em alguns casos, a porção conjugada compreende um bis-scFv. Em alguns casos, a porção conjugada compreende um (scFv)₂. Em alguns casos, a porção conjugada compreende um dsFv. Em alguns casos, a porção conjugada compreende um sdAb.

[00149] Em alguns casos, a porção conjugada compreende uma porção Fc de um anticorpo, por exemplo, de IgG, IgA, IgM, IgE ou IgD. Em algumas modalidades, a porção compreende uma porção Fc de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₃ ou IgG₄).

[00150] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um anticorpo ou seus fragmentos de ligação. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um anticorpo humanizado ou seu fragmento de ligação, anticorpo murino ou seu fragmento de ligação, anticorpo quimérico ou seu fragmento de ligação, anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, fragmentos F(ab)'₃, fragmento variável de cadeia única (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacorpo, minicorpo, nanocorpo, triacorpo, tetracorpo, humacorpo, proteína Fv estabilizada por dissulfeto (dsFv), anticorpo de domínio único (sdAb), Ig NAR, anticorpo camélídeo ou seu fragmento de ligação, anticorpo biespecífico ou seu fragmento de ligação, ou um derivado quimicamente modificado do mesmo. Em casos adicionais, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a uma porção Fc de um anticorpo. Em casos adicionais, o polipeptídeo da IL-15 é conjugado a uma porção Fc de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₃ ou IgG₄).

[00151] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um polímero solúvel em água (por exemplo, PEG) e a um anticorpo ou seu fragmento de ligação. Em alguns casos, um anticorpo ou seus fragmentos de ligação compreendem um anticorpo humanizado ou seu fragmento de ligação, anticorpo murino ou seu fragmento de ligação, anticorpo quimérico ou seu fragmento de ligação, anticorpo monoclonal ou seu fragmento de ligação, Fab' monovalente, Fab₂ divalente, fragmentos F(ab)₃, fragmento variável de cadeia única (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, diacorpo, minicorpo, nanocorpo, triacorpo, tetracorpo, humacorpo, proteína Fv estabilizada por dissulfeto (dsFv), anticorpo de domínio único (sdAb), Ig NAR, anticorpo camelídeo ou seu fragmento de ligação, anticorpo biespecífico ou seu fragmento de ligação, ou um derivado quimicamente modificado do mesmo. Em alguns casos, o anticorpo ou seus fragmentos de ligação compreendem um scFv, bis-scFv, (scFv)₂, dsFv ou sdAb. Em alguns casos, o anticorpo ou seus fragmentos de ligação compreendem um scFv. Em alguns casos, o anticorpo ou seu fragmento de ligação guia o conjugado da IL-15 para uma célula alvo de interesse e o polímero solúvel em água aumenta a estabilidade e/ou a meia-vida sérica.

[00152] Em alguns casos, um ou mais conjugados de polipeptídeo da IL-15 – polímero solúvel em água (por exemplo, PEG) são ainda ligados a um anticorpo ou seus fragmentos de ligação. Em alguns casos, a razão do conjugado da IL-15 com o anticorpo é de cerca de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1 ou 12:1. Em alguns casos, a razão entre o conjugado da IL-15 e o anticorpo é de cerca de 1:1. Em outros casos, a razão do conjugado da IL-15 com o anticorpo é de cerca de 2:1, 3:1 ou 4:1. Em casos adicionais, a razão do conjugado da IL-15 com o anticorpo é de cerca de 6:1 ou mais.

[00153] Em algumas modalidades, um ou mais conjugados de polipeptídeo da IL-15 – polímero solúvel em água (por exemplo, PEG) são

ainda ligados diretamente ao anticorpo ou seus fragmentos de ligação. Em outros casos, o conjugado da IL-15 é ligado indiretamente ao anticorpo ou aos seus fragmentos de ligação com um ligante. Ligantes exemplificadores incluem ligantes homo-bifuncionais, ligantes hetero-bifuncionais, ligantes baseados em maleimida, ligantes de traço zero, ligantes autoimolativos, espaçadores e outros.

[00154] Em algumas modalidades, o anticorpo ou seus fragmentos de ligação são ligados, direta ou indiretamente, à porção do polipeptídeo da IL-15 do conjugado polipeptídeo da IL-15 – polímero solúvel em água (por exemplo, PEG). Nesses casos, o sítio de conjugação do anticorpo ao polipeptídeo da IL-15 está em um sítio que não impede a ligação do polipeptídeo da IL-15 com o IL-15R. Em casos adicionais, o sítio de conjugação do anticorpo ao polipeptídeo da IL-15 encontra-se em um sítio que bloqueia parcialmente a ligação do polipeptídeo da IL-15 com o IL-15R. Em outras modalidades, o anticorpo ou seus fragmentos de ligação são ligados, direta ou indiretamente, à porção do polímero solúvel em água do conjugado polipeptídeo da IL-15 – polímero solúvel em água (por exemplo, PEG).

Peptídeos

[00155] Em algumas modalidades, uma porção conjugada descrita aqui é um peptídeo. Em algumas modalidades, o peptídeo é um peptídeo não estruturado. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, interleucina, IFN ou TNF) é conjugado a um peptídeo. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreendendo um peptídeo tem uma meia-vida sérica aumentada e/ou estabilidade. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 compreendendo um peptídeo tem uma interação da IL-15 reduzida com uma ou mais subunidades IL-15R. Em casos adicionais, o peptídeo bloqueia a interação da IL-15 com uma ou mais subunidades IL-15R.

[00156] Em algumas modalidades, a porção conjugada é um peptí-

deo XTEN™ (Amunix Operating Inc.) e a modificação é chamada de XTENilação. XTENilação é a fusão genética de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de interesse com um ácido nucleico que codifica um peptídeo XTEN™ (Amunix Operating Inc.), um peptídeo hidrofílico não estruturado longo que compreende diferentes porcentagens de seis aminoácidos: Ala, Glu, Gly, Ser e Thr. Em algumas modalidades, um peptídeo XTEN™ é selecionado com base em propriedades como expressão, estabilidade genética, solubilidade, resistência de agregação, meia-vida aprimorada, potência aumentada e/ou atividade in vitro aumentada em combinação com um polipeptídeo de interesse. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, interleucina, IFN ou TNF) é conjugado a um peptídeo XTEN. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um peptídeo XTEN.

[00157] Em algumas modalidades, a porção conjugada é um polímero de ácido homoamino rico em glicina (HAP) e a modificação é chamada de HAPilação. A HAPilação é a fusão genética de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de interesse com um ácido nucleico que codifica um polímero de ácido homoamino rico em glicina (HAP). Em algumas modalidades, o polímero HAP compreende um motivo de repetição $(Gly_4Ser)_n$ e, às vezes, são cerca de 50, 100, 150, 200, 250, 300 ou mais resíduos de comprimento. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, interleucina, IFN ou TNF) é conjugado ao HAP. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao HAP.

[00158] Em algumas modalidades, a porção conjugada é um polipeptídeo PAS e a modificação é chamada de PASilação. PASilação é a fusão genética de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de interesse com um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo PAS. Um polipeptídeo PAS é um polipeptídeo hidrofílico não carregado que

consiste em resíduos Pro, Ala e Ser. Em algumas modalidades, o comprimento de um polipeptídeo PAS é de pelo menos 100, 200, 300, 400, 500 ou 600 aminoácidos. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, interleucina, IFN ou TNF) é conjugado a um polipeptídeo PAS. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado a um polipeptídeo PAS.

[00159] Em algumas modalidades, a porção conjugada é um polipeptídeo semelhante à elastina (ELP) e a modificação é chamada de ELPilação. ELPilação é a fusão genética de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de interesse com um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo semelhante à elastina (ELPs). Um ELP é composto por um motivo de repetição VPGxG no qual x é qualquer aminoácido, exceto prolina. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, interleucina, IFN ou TNF) é conjugado ao ELP. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é conjugado ao ELP.

[00160] Em algumas modalidades, a porção conjugante é um peptídeo CTP. Um peptídeo CTP compreende um peptídeo de resíduo de 31 aminoácidos FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLPGPS*DTPILPQ em que o S* denota sítios de O-glicosilação (OPKO). Em algumas modalidades, um peptídeo CTP é geneticamente fundido a um polipeptídeo de citocina (por exemplo, um polipeptídeo da IL-15). Em algumas modalidades, um polipeptídeo de citocina (por exemplo, um polipeptídeo da IL-15) é conjugado a um peptídeo CTP.

[00161] Em algumas modalidades, uma citocina (por exemplo, polipeptídeo da IL-15) é modificada pela glutamilação. A glutamilação (ou poliglutamilação) é uma modificação pós-translacional reversível do glutamato, na qual o grupo γ -carbóxi do glutamato forma uma ligação do tipo peptídeo o grupo amino de um glutamato livre no qual o grupo α -carbóxi se estende em uma cadeia de poliglutamato.

[00162] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é mo-

dificado por um polímero de proteína semelhante a gelatina (GLK). Em algumas modalidades, o polímero GLK compreende várias repetições de Gly-Xaa-Yaa, em que Xaa e Yaa compreendem principalmente prolina e 4-hidroxiprolina, respectivamente. Em algumas modalidades, o polímero GLK compreende ainda resíduos de aminoácidos Pro, Gly, Glu, Qln, ASN, Ser e Lys. Em algumas modalidades, o comprimento do polímero GLK é de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150 resíduos ou mais.

Porções conjugantes adicionais

[00163] Em algumas modalidades, a porção conjugada compreende um biomarcador extracelular. Em algumas modalidades, o biomarcador extracelular é um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, o biomarcador extracelular exemplar compreende 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 e B220. Em algumas modalidades, a porção conjugante é ligada ou conjugada com a IL-15. Em algumas modalidades, a porção conjugante é geneticamente fundida, por exemplo, no N-terminal ou no C-terminal da IL-15.

[00164] Em algumas modalidades, a porção conjugante compreende uma molécula de uma modificação pós-translacional. Em algumas modalidades, exemplos de modificação pós-translacional incluem a miristoilação, a palmitoilação, a isoprenilação (ou prenilação) (por exemplo, farnesilação ou geranilgeranilação), a glipliação, a acilação (por exemplo, O-acilação, N-acilação, S-acilação), a alquilação (por exemplo, adicionais de grupos alquila como grupos metila ou etila), amidação, glicosilação, hidroxilação, iodação, adição de nucleotídeos, oxidação, fosforilação, succinilação, sulfatação, glicação, carbamilação, glutamilação ou desamidação. Em algumas modalidades, a IL-15

é modificada por uma modificação pós-translacional, como miristoilação, palmitoilação, isoprenilação (ou prenilação) (por exemplo, farnesilação ou geranilgeranilação), glipliação, acilação (por exemplo, O-acilação, N-acilação, S-acilação), alquilação (por exemplo, grupos alquila adicionais, como grupos metila ou etila), amidação, glicosilação, hidroxilação, iodação, adição de nucleotídeos, oxidação, fosforilação, succinilação, sulfatação, glicação, carbamilação, glutamilação ou desamidação.

Ligantes

[00165] Em algumas modalidades, grupos reativos funcionais úteis para a conjugação ou ligação de uma porção conjugante a um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui incluem, por exemplo, ligantes de ordem zero ou superior. Em alguns casos, um aminoácido não natural incorporado a uma interleucina descrita aqui compreende um grupo reativo funcional. Em alguns casos, um ligante compreende um grupo reativo funcional que reage com um aminoácido não natural incorporado a uma interleucina descrita aqui. Em alguns casos, uma porção conjugante compreende um grupo reativo funcional que reage com um aminoácido não natural incorporado a uma interleucina descrita aqui. Em alguns casos, uma porção conjugante compreende um grupo reativo funcional que reage com um ligante (opcionalmente pré-acoplado a um peptídeo de citocina) descrito aqui. Em algumas modalidades, um ligante compreende um grupo reativo que reage com um aminoácido natural em um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui. Em alguns casos, os ligantes de ordem superior compreendem ligantes bifuncionais, como ligantes homobifuncionais ou ligantes hetero-bifuncionais. Ligantes homo-bifuncionais exemplificativos incluem, mas não se limitam a, reagente de Lomant ditiobis (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis (propionato de sulfossuccinimidil) (DTSSP), suberato de disuccinimidil (DSS), suberato de bis(sulfossuccinimidil) (BS), tartarato de disuccini-

midil (DST), tartarato de disuccinimidila (DST), tartarato de disuccinimidila (DST), etileno glicobis (succinimidilsuccinato) (EGS), glutarato de disuccinimidila (DSG), carbonato de N,N'-disuccinimidil (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), butano de 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamido (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), composto contendo haleto de arila (DFDNB), como, por exemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno ou 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), dissulfeto de bis-[β -(4-azidosalicilamido)etila] (BASED), formaldeído, glutaraldeído, éter 1,4-butanodiol diglicidila, ácido adípico dihidrazida, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-dimetilbenzidina, benzidina, α,α' -p-diaminodifenila, ácido diiodo-p-xileno sulfônico, N,N'-etileno-bis (iodoacetamida) ou N,N'-hexametileno-bis (iodoacetamida).

[00166] Em algumas modalidades, o ligante bifuncional compreende um ligante hetero-bifuncional. Ligantes heterobifuncionais exemplificativos incluem, mas não se limitam a, reticuladores amina reativos e sulfidril como propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) (sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa (LC-sPDP), propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) de cadeia longa solúvel em água (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfossuccinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sMCC), sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil (4-iodoacteil) aminobenzoato (sIAB), sulfossuccinimidil(4-iodoacteil) aminobenzoato (sulfo-sIAB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil) butirato (sMPB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)

butirato (sulfo-sMPB), éster de N- (γ -maleimidobutirilóxi) succinimida (GMBs), éster de N- (γ -maleimidobutirilóxi) sulfossuccinimida (GMBs), succinimidil 6- ((iodoacetil) amino) hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-(((iodoacetil) amino) hexanoil) amino] hexanoato (sIAXX), succinimidil 4- ((iodoacetil)amino)metil) ciclo-hexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-((((4-iodoacetil) amino) metil) ciclo-hexano-1-carbonil) amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil iodoacetato (NPIA), ligantes carbonil-reativo e sulfidril-reativo, como hidrazida de ácido butírico 4-(4-N-maleimidofenil) (MPBH), 4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M_2C_2H), 3-(2-piridilditio) propionil hidrazida (PDPH), reticuladores carbonil reativo e sulfidril reativo, como ácido N-hidroxissuccinimidil-4-azidossalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidossalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfossuccinimidil-(4-azidosalicilamido) hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfossuccinimidil-2-(p -azidosalicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxissuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxissulfossuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido -2'-nitrofenilamino) hexanoato (sANPAH), sulfossuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxissuccinimida (ANB-NOs), sulfossuccinimidil-2-(m -azido- o -nitrobenzamido) -etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4 (4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfossuccinimidil (4-azidofenil) -1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfossuccinimidil 4-(p -azidofenil) butirato (sulfo-sAPB), sulfossuccinimidil 2- (7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida) etil-1,3'-ditiopropionato (sA-ED), sulfossuccinimidil 7-azido-4-metilcoumain-3-acetato (sulfo-sAMCA), p -nitrofenil diazopiruvato (p NPDP), p -nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP), reticuladores sulfidril reativo e fotorreativo, como 1- (p -Azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido) butano (AsIB), N-[4- (p -azidosalicilamido) butil]-3'-(2'-piridilditio) propionamida

(APDP), benzofenona-4-iodoacetamida, benzofenona-4-maleimida, reticuladores carbonil reativo e fotorreativos, como *p*-azidobenzoil hidrazida (ABH), reticuladores carboxilato reativos e fotorreativos, como 4-(*p*-azidosalicilamido) butilamina (AsBA), e reticuladores arginina reativos e fotorreativos, como *p*-azidofenil glioxal (APG).

[00167] Em alguns casos, o grupo funcional reativo compreende um grupo nucleofílico que é reativo a um grupo eletrofílico presente numa porção de ligação (por exemplo, numa porção conjugante ou na IL-15). Grupos eletrofílicos exemplificadores incluem grupos carbonila, como aldeído, cetona, ácido carboxílico, éster, amida, enona, haleto de acila ou anidrido ácido. Em algumas modalidades, o grupo funcional reativo é o aldeído. Os grupos nucleofílicos exemplificadores incluem hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina e arilidrazida. Em algumas modalidades, um aminoácido não natural incorporado a uma interleucina descrita aqui compreende um grupo eletrofílico.

[00168] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante clivável é um ligante dipeptídico. Em algumas modalidades, o ligante dipeptídico é valina-citrulina (Val-Cit), fenilalanina-lisina (Phe-Lys), valina-alanina (Val-Ala) e valina-lisina (Val-Lys). Em algumas modalidades, o ligante dipeptídico é valina-citrulina.

[00169] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante peptídico compreendendo, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende no máximo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou menos aminoácidos. Em casos adicionais, o ligante peptídico compreende cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 aminoácidos.

[00170] Em algumas modalidades, o ligante compreende uma porção ligante autoimolativa. Em algumas modalidades, a porção do ligante autoimolativa compreende álcool *p*-aminobenzílico (PAB), *p*-aminobenzoxicarbonila (PABC), ou derivados ou análogos dos mesmos. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma porção de ligante dipeptídico e uma porção de ligante autoimolativa. Em algumas modalidades, a porção do ligante autoimolativa é como descrita na Patente US nº 9089614 e no WIPO No. WO2015038426.

[00171] Em algumas modalidades, o ligante clivável é o glucuronido. Em algumas modalidades, o ligante clivável é um ligante clivável do ácido. Em algumas modalidades, o ligante clivável do ácido é a hidralazina. Em algumas modalidades, o ligante clivável é um ligante redutível.

[00172] Em algumas modalidades, o ligante compreende um grupo maleimida. Em alguns casos, o grupo maleimida também é chamado de espaçador de maleimida. Em alguns casos, o grupo maleimida compreende ainda um ácido caproico, formando maleimidocaproíla (mc). Em alguns casos, o ligante compreende um maleimidocaproil (mc). Em alguns casos, o ligante é o maleimidocaproíla (mc). Em outros casos, o grupo maleimida compreende um grupo maleimidometila, como succinimidil-4-(N-maleimometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (sMCC) ou sulfossuccinimidil-4-(N-maleimometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC) descrito acima.

[00173] Em algumas modalidades, o grupo maleimida é uma maleimida autoestabilizadora. Em alguns casos, a maleimida autoestabilizadora utiliza ácido diaminopropiônico (DPR) para incorporar um grupo amino básico adjacente à maleimida para fornecer catálise intramolecular da hidrólise do anel tiosuccinimida, eliminando assim a maleimida de sofrer uma reação de eliminação por meio de uma reação retro-Michael. Em alguns casos, a maleimida auto-estabilizante é um

grupo de maleimida descrito em Lyon , *et al.*, "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," *Nat. Biotechnol.* 32(10):1059-1062 (2014). Em alguns casos, o ligante compreende uma maleimida auto-estabilizadora. Em alguns casos, o ligante é uma maleimida auto-estabilizadora.

Química de conjugação

[00174] Várias reações de conjugação são usadas para conjugar ligantes, porções de conjugação e aminoácidos não naturais incorporados aos polipeptídeos da IL-15 descritos aqui. Tais reações de conjugação são frequentemente compatíveis com condições aquosas, como reações "bioortogonais". Em algumas modalidades, as reações de conjugação são mediadas por reagentes químicos como catalisadores, grupos químicos leves ou reativos encontrados em ligantes, porções de conjugação ou aminoácidos não naturais. Em algumas modalidades, as reações de conjugação são mediadas por enzimas. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação usada aqui é descrita em Gong, Y., Pan, L. *Tett. Lett.* 2015, 56, 2123. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação aqui usada é descrita em Chen, X.; Wu. Y-W. *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14, 5417.

[00175] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação compreende a reação de uma cetona ou um aldeído com um nucleófilo. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a reação de uma cetona com um grupo aminóxi para formar uma oxima. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a reação de uma cetona com um grupo amina arila ou heteroarila para formar uma imina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a reação de um aldeído com um grupo amina arila ou heteroarila para formar uma imina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui resulta em um polipeptídeo da IL-15 compreendendo um ligante ou uma porção de

conjugação ligada por meio de uma oxima. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma reação de PictBridge-Spengler de um aldeído ou uma cetona com um nucleófilo triptamina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma reação hidrazina-Pictet-Spengler. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma ligação de Pictet-Spengler.

[00176] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de uma azida e uma fosfina (ligação Staudinger). Em algumas modalidades, a fosfina é uma fosfina arila. Em algumas modalidades, a fosfina arila compreende um grupo de éster orto. Em algumas modalidades, a fosfina compreende a estrutura metil 2-(difenilfosfaneil)benzoato. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui resulta no polipeptídeo da IL-15 compreendendo um ligante ou uma porção de conjugação ligada por meio de uma arilamida. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui resulta em um polipeptídeo da IL-15 compreendendo um ligante ou uma porção de conjugação ligada por meio de uma amida.

[00177] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de cicloadição 1,3 dipolar. Em algumas modalidades, a reação de cicloadição 1,3-dipolar compreende a reação de uma azida e uma fosfina (reação de "clique"). Em algumas modalidades, a reação de conjugação é catalisada pelo cobre. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui resulta em um polipeptídeo da IL-15 compreendendo um ligante ou uma porção de conjugação ligada por meio de um triazol. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de uma azida com uma olefina alongada. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compre-

ende a reação de uma azida e um alcino alongado. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de uma azida com um cicloalquino, por exemplo, OCT, DIFO, DIFBO, DIBO, BARAC, TMTM, ou outro cicloalquino alongado, cujas estruturas são mostradas em Gong, Y., Pan, L. *Tett. Lett.* 2015, 56, 2123. Em algumas modalidades, uma reação de cicloadição 1,3 dipolar é catalisada pela luz ("photoclick"). Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um grupo alila terminal com um tetrazol e luz. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um grupo alquinila terminal com um tetrazol e luz. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um aminoácido O-alila com uma tetrazina e luz. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de tirosina O-alila com uma tetrazina e luz.

[00178] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de cicloadição de demanda de elétrons inversos compreendendo um dieno e um dienófilo. Em algumas modalidades, o dieno compreende uma tetrazina. Em algumas modalidades, o dienófilo compreende um alceno. Em algumas modalidades, o dienófilo compreende um alcino. Em algumas modalidades, o alcino é um alcino alongado. Em algumas modalidades, o alceno é um dieno alongado. Em algumas modalidades, o alcino é um trans-ciclo-octino. Em algumas modalidades, o alcino é um cicloocteno. Em algumas modalidades, o alceno é um ciclopropeno. Em algumas modalidades, o alceno é um fluorociclopropeno. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui resulta na formação de um polipeptídeo da IL-15 ligado a um ligante ou porção de conjugação através de um heterociclo de anel de 6 membros compreendendo dois átomos de nitrogênio no anel.

[00179] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de metátese de olefina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um alceno e um alcino com um catalisador de rutênio. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de dois alcenos com um catalisador de rutênio. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de dois alcinos com um catalisador de rutênio. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um alceno ou alcino com um catalisador de rutênio e um aminoácido compreendendo um grupo alil. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um alceno ou alcino com um catalisador de rutênio e um aminoácido compreendendo um sulfeto de alila ou seleneto. Em algumas modalidades, um catalisador de rutênio é o catalisador de 2ª geração de Hoveyda-Grubbs. Em algumas modalidades, uma reação de metátese de olefina compreende a reação de um ou mais alcenos ou alcinos alongados.

[00180] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de cicloadição 4+2+ com um alceno.

[00181] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de acoplamento cruzado. Em algumas modalidades, as reações de acoplamento cruzado compreendem catalisadores de metal de transição, como irídio, ouro, rutênio, ródio, paládio, níquel, platina ou outro catalisador de metal de transição e um ou mais ligantes. Em algumas modalidades, os catalisadores de metal de transição são solúveis em água. Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de acoplamento cruzado Suzuki-

Miyaura. Em algumas modalidades aqui descritas, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um haleto de arila (ou triflato, ou tosilato), um ácido borônico de arila ou alquenila e um catalisador de paládio. Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de acoplamento cruzado de Sonogashira. Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um catalisador de haleto de arila (ou triflato, ou tosilato), um alcino e um de paládio. Em algumas modalidades, as reações de acoplamento cruzado resultam na fixação de um ligante ou de uma porção conjugada a um polipeptídeo da IL-15 por meio de uma ligação carbono-carbono.

[00182] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma desproteção ou reação de "desencadeamento" de um grupo reativo antes da conjugação. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende o desencadeamento de um grupo reativo com luz, seguido de uma reação de conjugação. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido por uma porção alquila compreendendo um ou mais grupos nitro. Em algumas modalidades, o desencadeamento de um grupo reativo resulta em um grupo reativo livre de amina, sulfeto ou outro. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende o desencadeamento de um grupo reativo com um catalisador de metal de transição, seguido de uma reação de conjugação. Em algumas modalidades, o catalisador de metal de transição compreende paládio e um ou mais ligantes. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido com uma porção alila. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido com carbamato alílico. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido com uma porção propargílica. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido

com um carbamato de propargil. Em algumas modalidades, um grupo reativo é protegido por um dienófilo, onde a exposição a um dieno (como uma tetrazina) resulta na desproteção do grupo reativo.

[00183] Em algumas modalidades descritas aqui, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação ligante-direcionada, em que um ligante (opcionalmente) acoplado a um grupo reativo) facilita o sítio da conjugação entre o grupo reativo e o polipeptídeo da IL-15. Em algumas modalidades, o ligante é clivado durante ou após a reação do polipeptídeo da IL-15 com o grupo reativo. Em algumas modalidades, o sítio de conjugação do polipeptídeo da IL-15 é um aminoácido natural. Em algumas modalidades, o sítio de conjugação do polipeptídeo da IL-15 é uma lisina, cisteína ou serina. Em algumas modalidades, o sítio de conjugação do polipeptídeo da IL-15 é um aminoácido não natural descrito aqui. Em algumas modalidades, o grupo reativo compreende um grupo de saída, como um grupo arila ou heteroarila pobre em elétrons. Em algumas modalidades, o grupo reativo compreende um grupo de saída, como um grupo alquila pobre em elétrons que é deslocado pelo polipeptídeo da IL-15. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a reação de um agente de captura do radical com uma espécie de radical. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende uma reação de adição do radical oxidativo. Em algumas modalidades, o agente de captura do radical é uma arilamina. Em algumas modalidades, uma espécie radical é um radical tirosila. Em algumas modalidades, espécies radicais são geradas por um catalisador de rutênio (como $[Ru(bpy)_3]$) e luz.

[00184] As reações enzimáticas são opcionalmente usadas para reações de conjugação descritas aqui. As conjugações enzimáticas exemplificadoras incluem conjugação mediada por SortA, conjugação mediada por TGs ou conjugação mediada por FGE. Em algumas mo-

dalidades, uma reação de conjugação descrita aqui compreende a ligação de proteína nativa (NPL) de um grupo terminal 1-amino-2-tio com um tioéster para formar uma ligação de amida.

[00185] Várias reações de conjugação são descritas aqui para reagir um ligante ou porção conjugante com um polipeptídeo da IL-15, onde a reação ocorre com um aminoácido natural ("canônico") no polipeptídeo da IL-15. Em algumas modalidades, o aminoácido natural é encontrado em uma posição de conjugação em uma sequência do tipo selvagem, ou alternativamente a posição foi mutada. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a formação de uma ligação de dissulfeto em um resíduo IL-15. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma reação adicional 1,4 de Michael de uma cisteína ou lisina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma ligação cianobenzotiazol de uma IL-15. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a ligação cruzada com uma porção de acetona, como 1,3-dicloro-2-propionona. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende uma reação adicional 1,4 de Michael de uma cisteína com O-mesitilenosulfonilhidroxilamina. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende a reação de uma tirosina com triazolinediona (TAD) ou derivada de TAD. Em algumas modalidades, uma reação de conjugação compreende um triptofano com um carbenoide de ródio.

Métodos de uso

Doenças ou condições proliferativas

[00186] Em algumas modalidades, é descrito aqui um método para tratar uma doença proliferativa ou uma condição em um paciente que precisa dela, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêutica eficaz de um conjugado da IL-15 descrito aqui. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 compreende um poli-

peptídeo da IL-15 isolado e purificado e uma porção conjugante, em que o conjugado da IL-15 tem uma menor afinidade com uma subunidade α do receptor IL-15 (IL-15R α) relativa a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 compreende um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado; e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em uma posição de aminoácidos selecionada de 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 e S114, em que a numeração dos resíduos de aminoácidos corresponde à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 compreende um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado; e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em uma posição de aminoácidos selecionada de 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 e S114.

[00187] Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 interage preferencialmente com as subunidades IL-15R β e IL-15R $\beta\gamma$ para formar um complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$. Em algumas modalidades, o com-

plexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula e/ou melhora a expansão das células de Teff (por exemplo, células Teff CD8⁺) e/ou células NK. Em casos adicionais, a expansão das células Teff inclina a razão Teff:Treg em direção à população de Teff.

[00188] Em algumas modalidades, a doença ou a condição proliferativa é um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado a um indivíduo que precisa dele, para tratar um tumor sólido. Nesses casos, o indivíduo tem câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de cérebro, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer de olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer de rim, câncer de pulmão, melanoma, câncer de ovário, câncer pancreático ou câncer de próstata. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de bexiga. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de mama. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer colorretal. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de esôfago. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de cabeça e pescoço. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de rim. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de pulmão. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um melanoma. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de ovário. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer pancreático.

co. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer de próstata. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer metastático. Em casos adicionais, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um câncer recidivado ou refratário.

[00189] Em algumas modalidades, o câncer é uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado a um indivíduo que precisa dele, para tratar uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, o indivíduo tem leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), linfoma de células do manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiplo, linfoma de células B da zona marginal extranodal, linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grau não Burkitt, linfoma mediastinal de células B primário (PMBL), linfoma imunoblástico de grandes células, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitário, linfoma esplênico da zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma de derrame primário ou granulomatose linfomatoide. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de CLL. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de SLL. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de FL. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de DLBCL. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de MCL. Em algumas modali-

dades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento da macroglobulinemia de Waldenstrom. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de um mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de linfoma de Burkitt. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de uma malignidade hematológica metastática. Em casos adicionais, o conjugado da IL-15 é administrado a um indivíduo para o tratamento de uma malignidade hematológica recidivada ou refratária.

[00190] Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado ainda ao indivíduo. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado simultaneamente com um conjugado da IL-15. Em outros casos, o agente terapêutico adicional e o conjugado da IL-15 são administrados sequencialmente, por exemplo, o conjugado da IL-15 é administrado antes do agente terapêutico adicional ou que o conjugado da IL-15 é administrado após a administração do agente terapêutico adicional.

[00191] Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional compreende um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, uma terapia direcionada, radioterapia ou uma combinação deles. Os agentes terapêuticos adicionais ilustrativos incluem, mas não se limitam a, agentes alquilantes, como altretamina, busulfano, carboplatina, carmustina, clorambucila, cisplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalana, oxalapatina, temozolomida ou tiotepa; antimetabólitos, como 5-fluorouracila (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxureia, metotrexato ou pemetrexed; antraciclinas, como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina ou idarrubicina; inibidores da topoisomerase I, como topotecano ou irinotecano (CPT-11); inibidores da topoisomera-

se II, como etoposídeo (VP-16), teniposídeo ou mitoxantrona; inibidores mitóticos como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina ou vinorelbina; ou corticosteroides, como prednisona, metilprednisolona ou dexametasona.

[00192] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional compreende uma terapia de primeira linha. Conforme aqui usado, a "terapia de primeira linha" compreende um tratamento primário para um indivíduo com câncer. Em alguns casos, o câncer é um câncer primário ou local. Em outros casos, o câncer é um câncer metastático ou recorrente. Em alguns casos, a terapia de primeira linha compreende quimioterapia. Em outros casos, o tratamento de primeira linha inclui imunoterapia, terapia direcionada ou radioterapia. Um versado na técnica compreenderia prontamente que diferentes tratamentos de primeira linha podem ser aplicáveis a diferentes tipos de cânceres.

[00193] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 é administrado com um agente terapêutico adicional selecionado de um agente alquilante, como altretamina, busulfano, carboplatina, carmustina, clorambucila, cisplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalana, oxalapatina, temozolomida ou tiotepa; um antimetabólito, como 5-fluorouracila (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxixureia, metotrexato ou pemetrexed; uma antraciclina, como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina ou idarrubicina; um inibidor da topoisomerase I, como topotecano ou irinotecano (CPT-11); um inibidor da topoisomerase II, como etoposídeo (VP-16), teniposídeo ou mitoxantrona; um inibidor mitótico como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina ou vinorelbina; ou um corticosteroide, como prednisona, metilprednisolona ou dexametasona.

[00194] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado com um inibidor da enzima poli-ADP ribose polimerase

(PARP). Os inibidores PARP exemplificadores incluem, mas não se limitam a, olaparibe (AZD-2281, Lynparza®, da Astra Zeneca), rucaparibe (PF-01367338, Rubraca®, da Clovis Oncology), niraparibe (MK-4827, Zejula®, da Tesaro), talazoparibe (BMN-673, da BioMarin Pharmaceutical Inc.), veliparibe (ABT-888, da AbbVie), CK-102 (anteriormente CEP 9722, da Teva Pharmaceutical Industries Ltd.), E7016 (da Eisai), iniparibe (BSI 201, da Sanofi), e pamiparibe (BGB-290, da BeiGene). Em alguns casos, o conjugado da IL-15 é administrado em combinação com um inibidor de PARP, como olaparibe, rucaparibe, niraparibe, talazoparibe, veliparibe, CK-102, E7016, iniparibe ou pamiparibe.

[00195] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado com um inibidor de tirosina quinase (TKI). Os TKIs exemplares incluem, mas não se limitam a, afatinibe, alectinibe, axitinibe, bosutinibe, cabozantinibe, ceritinibe, cobimetinibe, crizotinibe, dabrafenibe, dasatinibe, erlotinibe, gefitinibe, ibrutinibe, imatinibe, lapatinibe, lenvatinibe, nilotinibe, nintedanibe, osimertinibe, pazopanibe, ponatinibe, regorafenibe, ruxolitinibe, sorafenibe, sunitinibe, tofacitinibe e vandetanibe.

[00196] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado com um modulador de ponto de controle imune. Os moduladores de ponto de controle exemplares incluem:

[00197] moduladores PD-L1, como MPDL3280A (RG7446) da Genentech, Avelumabe (Bavencio) da Merck/Pfizer, durvalumabe (Imfinzi) da AstraZeneca, clone do anticorpo anti-camundongo da PD-L1 10F.9G2 (Cat # BE0101) da BioXcell, anticorpo monoclonal anti-PD-L1 MDX-1105 (BMS-936559), BMS-935559 e BMS-986192 from Bristol-Meyer's Squibb, MSB0010718C, Clone anti-PD-L1 de camundongo 29E.2A3, CX-072 da XytomX Therapeutics, FAZ053 da Novartis Pharmaceuticals, KN035 da 3D Medicine, LY3300054 da Eli Lilly, e

AstraZeneca's MEDI4736;

[00198] moduladores PD-L2, como AMP-224 (Amplimmune) da GlaxoSmithKline e rHIgM12B7;

[00199] moduladores da PD-1, como o Clone do anticorpo da PD-1 anti-camundongo J43 (Cat # BE0033-2) da BioXcell, Clone do anticorpo da PD-1 anti-camundongo RMP1-14 (Cat # BE0146) da BioXcell, Clone do anticorpo da PD-1 anti-camundongo EH12, anticorpo da PD-1 anti-camundongo da Merck MK-3475 (Keytruda, pembrolizumabe, lambrolizumabe), anticorpo anti-PD-1 da AnaptysBio conhecido como ANB011, anticorpo MDX-1 106 (ONO-4538), anticorpo monoclonal da IgG4 humana da Bristol-Myers Squibb nivolumabe (Opdivo®, BMS-936558, MDX1106), AMP-514 e AMP-224 da AstraZeneca, sintilimabe (IBI-308) da Eli Lilly/Innovent Biologics, AGEN 2034 da Agenus, BGB-A317 da BeiGene, BI-754091 da Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, CBT-501 (genolimzumab) da CBT Pharmaceuticals, INC-SHR1210 da Incyte, JNJ-63723283 da Janssen Research & Development, MEDI0680 da MedImmune, PDR001 da Novartis Pharmaceuticals, PF-06801591 da Pfizer, REGN2810 da Regeneron Pharmaceuticals e Pidilizumab (CT-011) da CureTech Ltd;

[00200] moduladores CTLA-4, como o anticorpo anti-CTLA-4 da Bristol Meyers Squibb ipilimumabe (também conhecido como Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 e MDX-101), clone do anticorpo anti-CTLA4 9H10 da Millipore, tremelimumabe da Pfizer (CP-675,206, ticilimumabe), AGEN 1884 da Agenus e clone do anticorpo anti-CTLA4 BNI3 da Abcam;

[00201] moduladores LAG3, como o clone do anticorpo anti-Lag-3 eBioC9B7W (C9B7W) da eBioscience, anticorpo anti-Lag3 LS-B2237 da LifeSpan Biosciences, IMP701 e LAG525 da Novartis Pharmaceuticals, IMP321 (ImmuFact) da Immutep, anticorpo anti-Lag3 BMS-986016 da Bristol-Myers Squibb, REGN3767 da Regeneron Pharma-

ceuticals, e o anticorpo quimérico LAG-3 A9H12;

[00202] moduladores B7-H3 como MGA271;

[00203] moduladores KIR, como Lirilumabe (IPH2101) da Bristol-Myers Squibb;

[00204] moduladores CD137, como urelumabe (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (anti-4-1BB, PF-2566, Pfizer) ou XmAb-5592 (Xencor);

[00205] moduladores PS, como Bavituximabe;

[00206] moduladores OX40, como BMS-986178 da Bristol-Myers Squibb, GSK3174998 da GlaxoSmithKline, INCAGN1949 da Agenus, MEDI0562 da MedImmune, PF-04518600 da Pfizer ou RG7888 da Genentech;

[00207] moduladores GITR como GWN323 da Novartis Pharmaceuticals, INCAGN1876 da Agenus ou TRX518 da Leap Therapeutics;

[00208] moduladores TIM3 como MBG453 da Novartis Pharmaceuticals ou TSR-042 da TESARO;

[00209] e moduladores como um anticorpo ou fragmentos (por exemplo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo humano, humanizado ou quimérico), moléculas de RNAi ou pequenas moléculas para CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, ICOS, BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 ou SLAM.

[00210] Em alguns casos, o conjugado IL-15 é administrado em combinação com pembrolizumabe, nivolumabe, tremelimumabe ou ipilimumabe.

[00211] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado com um anticorpo como alemtuzumabe, trastuzumabe, ibritumomabe tiuxetana, bruximabe vedotina, ado-trastuzumabe emtansina ou blinatumabe.

[00212] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 é administrado com um agente terapêutico adicional selecionado a partir de um anti-

corpo anti-VEGFR. Anticorpos anti-VEGFR exemplificadores incluem, mas não se limitam a, bevacizumabe ou ramucirumabe. Em alguns casos, o conjugado da IL-15 melhora o efeito da ADCC do agente terapêutico adicional.

[00213] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 é administrado com um agente terapêutico adicional selecionado a partir de cetuximabe, imgatuzumabe, matuzumabe (EMD 72000), tomuzotuximabe, ou panitumumabe. Em alguns casos, o conjugado da IL-15 melhora o efeito da ADCC do agente terapêutico adicional.

[00214] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 é administrado com um agente terapêutico adicional selecionado a partir de uma citocina adicional (por exemplo, uma citocina nativa ou uma citocina modificada, como uma citocina peguilada e/ou de fusão). Em alguns casos, a citocina adicional melhora e/ou sinergiza a expansão e/ou proliferação da célula T efetora. Em alguns casos, a citocina adicional compreende IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21 ou TNF α . Em alguns casos, a citocina adicional é IL-2. Em alguns casos, a citocina adicional é IL-21. Em alguns casos, a citocina adicional é IL-10. Em alguns casos, a citocina adicional é TNF α .

[00215] Em alguns casos, um conjugado da IL-15 é administrado com um agente terapêutico adicional selecionado a partir de um agonista receptor. Em alguns casos, o agonista receptor compreende um ligante receptor tipo Toll (TLR). Em alguns casos, o ligante TLR compreende TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 ou TLR9. Em alguns casos, o ligante TLR compreende um ligante sintético, como, por exemplo, Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poly I:C, poly A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA ou Flagellin. Em alguns casos, o conjugado da IL-21 é administrado com um ou mais agonistas de TLR selecionados de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e TLR9. Em alguns casos, o conju-

gado da IL-15 é administrado com um ou mais agonistas de TLR selecionados de Pam3Cys, CFA, MALP2, Pam2Cys, FSL-1, Hib-OMPC, Poly I:C, poly A:U, AGP, MPL A, RC-529, MDF2 β , CFA e Flagellin.

[00216] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é usado em conjunto com uma terapia de transferência de célula T adotiva (ACT). Em uma modalidade, ACT envolve a identificação de linfócitos T autólogos em um indivíduo com, por exemplo, atividade antitumoral, expansão dos linfócitos T autólogos *in vitro* e subsequente reinfusão dos linfócitos T expandidos no indivíduo. Em outra modalidade, ACT compreende o uso de linfócitos T alogênicos com, por exemplo, atividade antitumoral, expansão dos linfócitos T *in vitro* e infusão subsequente dos linfócitos T alogênicos expandidos em um indivíduo que precisa do mesmo. Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é usado em conjunto com linfócitos T autólogos como parte de uma terapia ACT. Em outros casos, um conjugado da IL-15 descrito aqui é usado em conjunto com linfócitos T alogênicos como parte de uma terapia ACT. Em algumas modalidades, o conjugado da IL-15 é administrado simultaneamente com a terapia ACT a um paciente que precisa do mesmo. Em outros casos, o conjugado da IL-15 é administrado sequencialmente com a terapia ACT a um paciente que precisa do mesmo.

[00217] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é usado para uma ativação e/ou expansão *ex vivo* de uma transferência de células T autóloga e/ou alogênica. Nesses casos, o conjugado da IL-15 é usado para ativar e/ou expandir uma amostra compreendendo células T autólogas e/ou alogênicas e o conjugado da IL-15 é opcionalmente removido da amostra antes de administrar a amostra a um indivíduo que precisa do mesmo.

[00218] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 descrito aqui é administrado com uma vacina. Em alguns casos, um conjugado

da IL-21 é usado em combinação com um vírus oncolítico. Nesses casos, o conjugado da IL-21 atua como um agente estimulador para modular a resposta imune. Em alguns casos, o conjugado da IL-21 é usado com um vírus oncolítico como parte de uma terapia adjuvante. Vírus oncolíticos exemplificadores incluem T-Vec (Amgen), G47 Δ (Todo et al.), JX-594 (Sillajen), CG0070 (Cold Genesys) e Reolysin (Oncolytics Biotech). Em alguns casos, o conjugado da IL-21 é usado em combinação com um vírus oncolítico, como T-Vec, G47 Δ , JX-594, CG0070 ou Reolysin.

[00219] Em algumas modalidades, um conjugado da IL-15 é administrado em combinação com uma radioterapia.

Métodos de expansão da população celular

[00220] Em algumas modalidades, descritas adicionalmente aqui, estão métodos de expansão das populações de linfócitos, por exemplo, populações de célula T efetora (Teff), célula T de memória (Tmem) e/ou células Natural Assassina (NK). Em algumas modalidades, o método compreende colocar uma célula em contato com um conjugado de citocinas descrito aqui e a interagir a citocina com um receptor de citocinas para formar um complexo, onde o complexo estimula a expansão de uma população de linfócitos distinta.

[00221] Em algumas modalidades, o método de expansão da célula T efetora (Teff), da célula T de memória (Tmem) e/ou da população de células Natural Assassina (NK), compreendendo: (a) colocar uma célula em contato com um polipeptídeo da IL-15 modificado ou um conjugado da IL-15; e interagir a IL-15 com as subunidades IL-15R β e IL-15R γ para formar um complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$; em que o conjugado da IL-15 tem uma menor afinidade com a subunidade IL-15R α , e em que o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula a expansão das células Teff, Tmem e NK. Conforme descrito aqui, em algumas modalidades, o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende pelo menos um aminoáci-

do não natural pós-translacionalmente modificado em uma posição de resíduo selecionada dentre 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 e S114, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionado dentre 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 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre 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 e F110. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97 e E98. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 e N72. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32,

P33, S102, V104. H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre Y26, E46, V49, E53 e L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre N4, S7, K11 e D61. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre L25, E53, N77 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre L25 e E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46 e Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é E46. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é V49. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é N77. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é S83.

[00222] Métodos de expansão das populações da célula T efetora (Teff), células T de memória (Tmem) e/ou célula Natural Assassina (NK), conforme descritos aqui, em algumas modalidades, compreendem o colocar uma célula em contato com um conjugado da IL-15. Conforme descrito aqui, em algumas modalidades, os conjugados da

interleucina 15 (IL-15) compreendem um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado; e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em uma posição de aminoácidos selecionada de 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 e S114, em que as posições do resíduo correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionado dentre 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 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre 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 e F110. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97 e E98. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69

e N72. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 e E93. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre Y26, E46, V49, E53 e L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre N4, S7, K11 e D61. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre L25, E53, N77 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre L25 e E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53, T24, N4, K11, N65, L69, S18, H20 e S83. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre Y26, V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre V49, E53 e T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é selecionada dentre E46 e Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é E46. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é L25. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é Y26. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é V49. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é E53. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é T24. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é N77. Em algumas modalidades, a posição do resíduo é S83.

Produção do polipeptídeo da IL-15

[00223] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui, contendo uma mutação de aminoácidos natural ou uma mu-

tação de aminoácidos não natural, são gerados de forma recombinante ou são sintetizados quimicamente. Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 descritos aqui são gerados de forma recombinante, por exemplo, por um sistema de célula hospedeira ou em um sistema sem células.

[00224] Em algumas modalidades, os polipeptídeos da IL-15 são gerados de forma recombinante por meio de um sistema de célula hospedeira. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula eucariótica (por exemplo, célula de mamíferos, células de insetos, células de leveduras ou células vegetais), uma célula procariótica (por exemplo, bactéria gram-positiva ou bactéria gram-negativa) ou uma célula arqueia. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira eucariótica é uma célula hospedeira de mamíferos. Em alguns casos, uma célula hospedeira de mamíferos é uma linhagem celular estável, ou uma linhagem celular que incorporou um material genético de interesse em seu próprio genoma e tem a capacidade de expressar o produto do material genético após muitas gerações de divisão celular. Em outros casos, uma célula hospedeira de mamíferos é uma linhagem celular transitória, ou uma linhagem celular que não incorporou um material genético de interesse em seu próprio genoma e não tem a capacidade de expressar o produto do material genético após muitas gerações de divisão celular.

[00225] As células hospedeiras de mamíferos exemplificadoras incluem a linhagem celular 293T, a linhagem celular 293A, a linhagem celular 293FT, células 293F, células 293H, células A549, células MDCK, células CHO DG44, células CHO-S, células CHO-K1, células Expi293F™, linhagem celular Flp-In™ T-REx™ 293, linhagem celular Flp-In™-293, linhagem celular Flp-In™-3T3, linhagem celular Flp-In™-BHK, linhagem celular Flp-In™-CHO, linhagem celular Flp-In™-CV-1, linhagem celular Flp-In™-Jurkat, células FreeStyle™ 293-F, células

FreeStyle™ CHO-S, linhagem celular GripTite™ 293 MSR, linhagem celular GS-CHO, células HepaRG™, linhagem celular T-REx™ Jurkat, células Per.C6, linhagem celular T-REx™-293, linhagem celular T-REx™-CHO e linhagem celular T-REx™-HeLa.

[00226] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira eucariótica é uma célula hospedeira de inseto. A célula hospedeira de inseto exemplificadora inclui as células de *Drosophila* S2, células Sf9, células Sf21, células High Five™ e células expresSF+®.

[00227] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira eucariótica é uma célula hospedeira de levedura. As células hospedeiras de levedura exemplificadoras incluem cepas de leveduras *Pichia pastoris*, como GS115, KM71H, SMD1168, SMD1168H e X-33, e cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, como INVSc1.

[00228] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira eucariótica é uma célula hospedeira vegetal. Em algumas modalidades, as células vegetais compreendem uma célula de algas. Linhagens celulares de vegetais exemplificadoras incluem cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 137c ou *Synechococcus elongatus* PPC 7942.

[00229] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira é uma célula hospedeira procariótica. As células hospedeiras procarióticas exemplificadoras incluem BL21, Mach1™, DH10B™, TOP10, DH5α, DH10Bac™, OmniMax™, MegaX™, DH12S™, INV110, TOP10F', INVαF, TOP10/P3, ccdB Survival, PIR1, PIR2, Stbl2™, Stbl3™ ou Stbl4™.

[00230] Em algumas modalidades, moléculas ou vetores de ácido polinucleico adequados para a produção de um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui incluem quaisquer vetores adequados derivados de fontes eucarióticas ou procarióticas. As moléculas ou vetores de ácido polinucleico exemplificadoras incluem vetores de bactérias (por exemplo, *E. coli*), insetos, leveduras (por exemplo, *Pichia pastoris*), algas ou

fontes de mamíferos. Os vetores bacterianos incluem, por exemplo, pACYC177, pASK75, séries de vetores pBAD, séries de vetores pBADM, séries de vetores pET, série de vetores pETM, série de vetores pGEX, pHAT, pHAT2, pMal-c2, pMal-p2, série de vetores pQE, pRSET A, pRSET B, pRSET C, séries pTrcHis2, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12c, pTAC-MAT-1, pFLAG CTC ou pTAC-MAT-2.

[00231] Os vetores de insetos incluem, por exemplo, pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBac M30b, pFastBac M30c, pVL1392, pVL1393, pVL1393 M10, pVL1393 M11, pVL1393 M12, vetores FLAG como pPolh-FLAG1 ou pPolh-MAT 2, ou vetores MAT como pPolh-MAT1 ou pPolh-MAT2.

[00232] Os vetores de levedura incluem, por exemplo, vetor Gateway® pDEST™ 14, vetor Gateway® pDEST™ 15, vetor Gateway® pDEST™ 17, vetor Gateway® pDEST™ 24, vetor Gateway® pYES-DEST52, vetor de destino pBAD-DEST49 Gateway®, vetor pAO815 de *Pichia*, vetor pFLD1 de *Pichi pastoris*, vetor pGAPZA, B, & C de *Pichia pastoris*, vetor pPIC3.5K de *Pichia*, vetor pPIC6 A, B, & C de *Pichia*, vetor pPIC9K de *Pichia*, pTEF1/Zeo, vetor de levedura pYES2, vetor de levedura pYES2/CT, vetor de levedura pYES2/NT A, B, & C ou vetor de levedura pYES3/CT.

[00233] Os vetores de algas incluem, por exemplo, vetor pChlamy-4 ou vetor MCS.

[00234] Os vetores de mamíferos incluem, por exemplo, vetores de expressão transiente ou vetores de expressão estável. Os vetores de expressão transiente de mamíferos exemplificadores incluem 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 ou pBICEP-CMV 4. Os vetores de expressão estável de mamíferos exemplificadores incluem 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 ou pBICEP-CMV 2.

[00235] Em algumas modalidades, um sistema sem células é usado para a produção de um polipeptídeo da IL-15 descrito aqui. Em algumas modalidades, um sistema sem células compreende uma mistura de componentes citoplasmáticos e/ou nucleares de uma célula (por exemplo, composto por componentes recombinantes totalmente purificados ou componentes parcialmente purificados) e é adequado para síntese de ácido nucleico in vitro. Em alguns casos, um sistema sem células utiliza componentes de células procarióticas. Em outros casos, um sistema sem células utiliza componentes de células eucarióticas. A síntese de ácido nucleico é obtida em um sistema sem células baseado, por exemplo, em células de *Drosophila*, ovos de *Xenopus*, *Archaea* ou células HeLa. Sistemas sem células exemplificadores incluem o sistema de extração S30 da *E. coli*, o sistema T7 S30 da *E. coli* ou PURExpress®, XpressCF e XpressCF+.

[00236] Os sistemas de tradução sem células incluem, de forma variável, componentes como plasmídeos, mRNA, DNA, tRNAs, sintetases, fatores de liberação, ribossomas, proteínas chaperonas, fatores de início e alongamento de translação, aminoácidos naturais e/ou não naturais e/ou outros componentes usados para expressão de proteínas. Tais componentes são opcionalmente modificados para melhorar o rendimento, aumentar a taxa de síntese, aumentar a fidelidade do produto proteico ou incorporar aminoácidos não naturais. Em algumas modalidades, as citocinas descritas aqui são sintetizadas por meio de sistemas de tradução sem células descritos em US 8.778.631; US

2017/0283469; US 2018/0051065; US 2014/0315245; ou US 8,778,631. Em algumas modalidades, os sistemas de tradução sem células compreendem fatores de liberação modificados ou até mesmo a remoção de um ou mais fatores de liberação do sistema. Em algumas modalidades, os sistemas de tradução sem células compreendem uma concentração reduzida de protease. Em algumas modalidades, os sistemas de tradução sem células compreendem tRNAs modificados com códons reatribuídos usados para codificar aminoácidos não naturais. Em algumas modalidades, as sintetases descritas aqui para a incorporação de aminoácidos não naturais são usadas em sistemas de tradução sem células. Em algumas modalidades, os tRNAs são pré-carregados com aminoácidos não naturais usando métodos enzimáticos ou químicos antes de serem adicionados a um sistema de tradução sem células. Em algumas modalidades, os componentes de um sistema de tradução sem células são obtidos a partir de organismos modificados, como bactérias modificadas, leveduras ou outros organismos.

[00237] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da IL-15 é gerado como uma forma circularmente permutada, seja por meio de um sistema hospedeiro de expressão ou através de um sistema sem células.

Produção de polipeptídeo da IL-15 compreendendo um aminoácido não natural

[00238] Um código genético ortogonal ou expandido pode ser usado na presente revelação, em que um ou mais códons específicos presentes na sequência de ácido nucleico de um polipeptídeo da IL-15 são alocados para codificar o aminoácido não natural para que possa ser geneticamente incorporado à IL-15 usando um par tRNA sintetase/tRNA ortogonal. O par tRNA sintetase/tRNA ortogonal é capaz de carregar um tRNA com um aminoácido não natural e é capaz de incor-

porar esse aminoácido não natural à cadeia de polipeptídeo em resposta ao códon.

[00239] Em algumas modalidades, o códon é o códon âmbar, ocre, opal ou um códon quádruplo. Em alguns casos, o códon corresponde ao tRNA ortogonal que será usado para carregar o aminoácido não natural. Em alguns casos, o códon é âmbar. Em outros casos, o códon é um códon ortogonal.

[00240] Em alguns casos, o códon é um códon quádruplo, que pode ser decodificado por um ribossomo ribo-Q1 ortogonal. Em alguns casos, o códon quádruplo é ilustrado em Neumann, *et al.*, “Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome”, *Nature*, **464**(7287): 441-444 (2010).

[00241] Em alguns casos, um códon usado na presente revelação é um códon recodificado, por exemplo, um códon sinônimo ou um códon raro que é substituído por um códon alternativo. Em alguns casos, o códon recodificado é como descrito em Napolitano, *et al.*, “Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in *Escherichia coli*”, *PNAS*, **113**(38): E5588-5597 (2016). Em alguns casos, o códon recodificado é o descrito em Ostrov *et al.*, “Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome”, *Science* **353**(6301): 819-822 (2016).

[00242] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos não naturais são utilizados levando à incorporação de um ou mais aminoácidos não naturais na IL-15. Ácidos nucleicos não naturais exemplificadores incluem, mas não estão limitados a, uracil-5-ila, hipoxantina-9-ila (I), 2-aminoadenina-9-ila, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-propila e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, 5-propinil uracila e citosina, 6-azo uracila, citosina e timina,

5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxil e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5-halo, especialmente 5-bromo, 5-trifluorometila e outras uracilas 5-substituídas e citosinas, 7-metilguanina, e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-deazaguanina e 7-daazaadenina e 3-deazaguanina e 3-deazaadenina. Determinados ácidos nucleicos não naturais, como pirimidinas 5 substituídas, 6-azapirimidinas e purinas N-2 substituídas, purinas N-6 substituídas, purinas O-6 substituídas, 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila, 5-propinilcitosinina, 5-metilcitosina, aqueles que aumentam a estabilidade da formação de duplex, ácidos nucleicos universais, ácidos nucleicos hidrofóbicos, ácidos nucleicos promíscuos, ácidos nucleicos de tamanho expandido, ácidos nucleicos fluorados, pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e purinas N-2, N-6 e O-6 substituídas, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila, outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-propil e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila, 5-halocitosina, 5-propinila ($-C\equiv C-CH_3$) uracila, 5-propinila citosina, outros derivados de alcinila de ácidos nucleicos de pirimidina, 6-azo uracila, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila, outras uracilas e citosinas 5-substituídas, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-deazaadenina, 3-deazaguanina, 3-deazaadenina, pirimidinas tricíclicas, fenoxazina citidina ([5,4-b] [1,4] benzoxazin-2 (3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimida [5,4 -b] [1,4] benzotiazin-2 (3H) -ona), grampos G, fenoxazina citidina (por exemplo 9-(2-aminoetóxi)-H-pirimido

[5,4-b] [1,4] benzoxazin-2 (3H) -ona), carbazol citidina (2H-pirimido [4,5-b] indol-2- um), piridoindol citidina (H-pirido [3', 2': 4,5] pirrolo [2,3-d] pirimidin-2-ona), aqueles em que a base purina ou pirimidina é substituída por outros heterociclos, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina, 2-piridona, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracila, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, citosina arabinosídeo, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, 5,6-fluorouracil di-hidrocitosina, 5-iodocitosina, hidroxioureia, iodouracila, 5-nitrocitosina, 5-bromouracila, 5-clorouracila, 5-fluorouracila e 5-iodouracila, 2-amino-adenina, 6-tioguanina, 2-tio-timina, 4-tio-timina, 5-propinil-uracila, 4-tio-uracila, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina, 7-desaza-8-azaguanina, 5-hidroxicitosina, 2'-desoxiuridina, 2-amino-2'-desoxiadenosina e aqueles descritos nas Patentes US Nos. 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 e 6.005.096; WO 99/62923; Kandimalla et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; a Enciclopédia Concisa de Ciência e Engenharia de Polímeros, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley e Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; e Sanghuvi, Capítulo 15, Antidense Research and Applications, Crooke and Lebleu Eds., CRC Press, 1993-273-288. Modificações adicionais na base podem ser encontradas, por exemplo, em Patente U.S. No 3.687.808; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; e Sanghuvi, Capítulo 15, Antidense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke and Lebleu ed., CRC Press, 1993.

[00243] Os ácidos nucleicos não naturais que compreendem várias bases heterocíclicas e várias porções de açúcar (e análogos do açúcar) estão disponíveis na técnica, e os ácidos nucleicos em alguns ca-

soos incluem uma ou várias bases heterocíclicas que não os cinco principais componentes de base dos ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente. Por exemplo, a base heterocíclica inclui, em alguns casos, grupos uracil-5-ila, citosina-5-ila, adenina-7-ila, adenina-8-ila, guanina-7-ila, guanina-8-ila, 4-aminopirrolo [2.3-d] pirimidina-5-ila, 2-amino-4-oxopirrolo [2.3-d] pirimidin-5-ila, 2-amino-4-oxopirrolo [2.3-d] pirimidin-3-ila, onde as purinas estão ligadas à porção de açúcar do ácido nucleico através da posição 9, as pirimidinas através da posição 1, as pirrolopirimidinas através da posição 7 e as pirazolopirimidinas através da posição 1.

[00244] Em algumas modalidades, os análogos de nucleotídeos também são modificados na porção fosfato. As porções fosfato modificadas incluem, mas não se limitam a, as que apresentam modificações na ligação entre dois nucleotídeos e contêm, por exemplo, um fosforiato, fosforotiato quiral, fosforoditioato, fosfodiéster, aminoalquilfosfodiéster, metila e outros fosfonatos alquil incluindo 3'-alquilenos fosfonato e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos incluindo 3'-amino fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres e boranofosfatos. Entende-se que esta ligação fosfato ou fosfato modificado entre dois nucleotídeos é feita através de uma ligação de 3'-5' ou de uma ligação de 2'-5', e a ligação contém polaridade invertida, como 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'. Vários sais, misturas de sais e formas de ácido livre também estão incluídos. Inúmeras patentes dos Estados Unidos ensinam a fazer e usar nucleotídeos contendo fosfatos modificados e incluem, sem limitação, 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; e 5.625.050.

[00245] Em alguns casos, os ácidos nucleicos não naturais incluem 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidro-nucleosídeos (PCT/US2002/006460), derivados de DNA e RNA substituídos por 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; and 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), ou monômeros substituídos por 5' feito como os monofosfatos com bases modificadas (Wang et al., *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2004, 23 (1 & 2), 317-337).

[00246] Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos não naturais incluem modificações na posição 5' e na posição 2' do anel de açúcar (PCT/US94/02993), como os nucleosídeos O-protegidos 2'-substituído por 5'-CH₂ (Wu et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2000, 83, 1127-1143 and Wu et al., *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 921-924). Em alguns casos, os ácidos nucleicos não naturais incluem dímeros de nucleosídeo ligados à amida, tendo sido preparados para incorporação em oligonucleotídeos, em que o nucleosídeo ligado a 3' no dímero (5' to 3') compreende um 2'-OCH₃ e um 5'-(S)-CH₃ (Mesmaeker et al., *Synlett*, 1997, 1287-1290). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir nucleosídeos modificados de 5'-CH₂ (ou O) substituídos por 2' (PCT/US92/01020). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir monômeros de DNA e RNA de 5'-metilenofosfonato e dímeros (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). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir monômeros de 5'fosfonato com substituição de 2' (US2006/0074035) e

outros monômeros de 5'-fosfonato modificados (WO1997/35869). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir monômeros de metileno-fosfonato 5'-modificados (EP614907 e EP629633). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir análogos de 5' ou 6'-fosfonatos ribonucleosídeos, compreendendo um grupo hidroxila na posição de 5' e/ou 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; e Hampton et al., *J. Med. Chem.*, 1976, 19(8), 1029-1033). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir monômeros e dímeros de 5'-fosfonato deoxiribonucleosídeo e dímeros com um grupo de 5'-fosfato (Nawrot et al., *Oligonucleotides*, 2006, 16(1), 68-82). Os ácidos nucleicos não naturais podem incluir nucleosídeos com um grupo 6-fosfonato, em que a posição de 5' ou/e 6' não é substituída ou substituída por um grupo tio-terc-butil ($\text{SC}(\text{CH}_3)_3$) (e seus análogos); um grupo metileno amino (CH_2NH_2) (e seus análogos) ou um grupo ciano (CN) (e seus análogos) (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; Vrudhula et al., *J. Med. Chem.*, 1987, 30, 888-894; Hampton et al., *J. Med. Chem.*, 1976, 19, 1371-1377; Geze et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105(26), 7638-7640; e Hampton et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95(13), 4404-4414).

[00247] Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos não naturais também incluem modificações da porção do açúcar. Em alguns casos, os ácidos nucleicos contêm um ou mais nucleosídeos em que o grupo de açúcar foi modificado. Tais nucleosídeos modificados por açúcar podem conferir maior estabilidade de nuclease, maior afinidade de ligação ou alguma outra propriedade biológica benéfica. Em certas modalidades, os ácidos nucleicos compreendem uma porção de anel ribouranose quimicamente modificada. Exemplos de anéis ribofuranose quimicamente modificados incluem, sem limitação, a adição de grupos

substituentes (incluindo grupos substituentes 5' e/ou 2'; a ligação de dois átomos de anel para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); a substituição do átomo de oxigênio do anel ribosila por combinações S, N(R) ou C(R₁)(R₂) (R= H, C₁-C₁₂ alquila ou um grupo protetor); e suas combinações. Exemplos de açúcares quimicamente modificados podem ser encontrados em WO2008/101157, US2005/0130923 e WO2007/134181.

[00248] Em alguns casos, um ácido nucleico modificado compreende açúcares modificados ou análogos de açúcar. Assim, além da ribose e da desoxirribose, a porção do açúcar pode ser pentose, deoximentose, hexose, deoxihexose, glicose, arabinose, xilose, lixose ou um grupo de ciclopentil "analógico" de açúcar. O açúcar pode estar em uma forma de piranosila ou furanosila. A porção do açúcar pode ser o furanosídeo da ribose, desoxirribose, arabinose ou 2'-O-alquilribose, e o açúcar pode ser anexado às respectivas bases heterocíclicas quer na configuração anomérica [alfa] ou [beta]. As modificações do açúcar incluem, mas não se limitam a, análogos de 2'-alcóxi-RNA, análogos de 2'-amino-RNA, 2'-fluoro-DNA e 2'-alcoxi ou quimeras de amino-RNA/DNA. Por exemplo, uma modificação de açúcar pode incluir 2'-O-metil-uridina ou 2'-O-metil-citidina. As modificações do açúcar incluem desoxirribonucleosídeos substituídos por 2'-O-alquila e 2'-O-etilenoglicol do tipo ribonucleosídeos. A preparação desses açúcares ou análogos de açúcar e os respectivos "nucleosídeos" em que tais açúcares ou análogos estão ligados a uma base heterocíclica (base de ácido nucleico) é conhecida. Modificações do açúcar também podem ser feitas e combinadas com outras modificações.

[00249] Modificações na porção do açúcar incluem modificações naturais da ribose e deoxibose, bem como modificações não naturais. As modificações do açúcar incluem, mas não se limitam a, as seguintes modificações na posição 2': OH; F; O-, S- ou N-alquila; O-, S-, ou

N-alquenila; O-, S- ou N-alquinila; ou O-alquila-O-alquila, onde alquila, alquenila e alquinila podem ser alquila C₁ a C₁₀ ou alquenila e alquinila C₂ a C₁₀ substituídas ou não substituídas. As modificações 2' do açúcar também incluem, mas não se limitam a, -O[(CH₂)_nO]_m CH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nCH₃, -O(CH₂)_nONH₂ e -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, onde n e m são de 1 a cerca de 10.

[00250] Outras modificações na posição 2' incluem, mas não se limitam a: alquila C₁ a C₁₀ inferior, alquila, alquarila, aralquila, O-alquarila, O-aralquila, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino substituído inferiores, silila substituída, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalador, um grupo para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um oligonucleotídeo ou um grupo para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de um oligonucleotídeo e outros substituintes com propriedades semelhantes. Modificações semelhantes também podem ser feitas em outras posições sobre o açúcar, particularmente a posição 3' do açúcar no nucleotídeo 3' terminal ou em oligonucleotídeos 2'-5' ligados e a posição 5' do nucleotídeo terminal 5'. Os açúcares modificados também incluem aqueles que contêm modificações no oxigênio do anel de ligação, como CH₂ e S. Os análogos de açúcar nucleotídeo também podem ter miméticos de açúcar, como porções ciclobutila no lugar do açúcar pentouranosila. Existem inúmeras patentes dos Estados Unidos que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcar modificadas e que detalham e descrevem uma variedade de modificações de base, como as patentes US n^{os}. 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; e 5.700.920, cada um dos quais está aqui incorporado como referência em sua totalidade.

[00251] Exemplos de ácidos nucleicos com porções de açúcar modificadas incluem, mas não estão limitadas a, ácidos nucleicos compreendendo grupos substituintes de 5'-vinila, 5'-metil (R ou S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ e 2'-O(CH₂)₂OCH₃. O substituinte na posição 2' também pode ser selecionado de alila, amino, azido, tio, O-alila, O-(C₁-C₁₀ alquila), OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), e O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), onde cada R_m e R_n é independentemente H ou C₁-C₁₀ alquila substituída ou não substituída.

[00252] Em determinadas modalidades, os ácidos nucleicos descritos aqui incluem um ou mais ácidos nucleicos bicíclicos. Em algumas dessas modalidades, o ácido nucleico bicíclico compreende uma ponte entre os átomos do anel ribosil 4' e 2'. Em certas modalidades, os ácidos nucleicos fornecidos aqui incluem um ou mais ácidos nucleicos bicíclicos, nos quais a ponte compreende um ácido nucleico bicíclico de 4' a 2'. Exemplos desses ácidos nucleicos bicíclicos de 4' a 2' incluem, mas não se limitam a, uma das fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' and 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', e seus análogos (ver, Patente US No. 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' e seus análogos, (ver WO2009/006478, WO2008/150729, US2004/0171570, Patente US No. 7,427,672, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 209, 74, 118-134, e WO2008/154401). Ver também, por exemplo: 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. Ther., 2001, 3, 239-243; Patent US Nos. 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; e 7.399.845; Publicações de patente US nº WO2004/106356, WO1994/14226, WO2005/021570, WO2007/090071 e WO2007/134181; Publicações de patente US nº US2004/0171570, US2007/0287831 e US2008/0039618; pedido provisório de patente Nos. 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 e 61/099,844; e pedidos internacionais Nos. PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922, e PCT/DK98/00393.

[00253] Em certas modalidades, os ácidos nucleicos compreendem ácidos nucleicos ligados. Os ácidos nucleicos podem ser ligados entre si usando qualquer ligação de ácido internucleico. As duas principais classes de grupos de ligação de ácido internucleico são definidas pela presença ou ausência de um átomo de fósforo. O fósforo representativo contendo ligações de ácido internucleico incluem, mas não se limitam a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamido e fosforotioatos (P=S). Os grupos de ligação de ácido internucleico representativos que não contenham fósforo incluem, mas não se limitam a, metilenometilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); e N,N-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)). Em certas modalidades, as ligações de ácidos internucleicos com um átomo quiral podem ser preparadas como uma mistura racêmica, como enantiômeros separados, por exemplo, alquilfosfonatos e fosforotioatos. Ácidos nucleicos não naturais podem conter uma única modificação. Ácidos nucleicos não naturais podem conter múltiplas modificações dentro de uma das porções ou entre porções diferentes.

[00254] As modificações da cadeia principal de fosfato ao ácido nucleico incluem, mas não se limitam a, fosfonato de metila, fosforotioato, fosforamidato (ponte ou não-ponte), fosfodiriester, fosforoditioato, fosfoditioato e boranofosfato, podendo ser usadas em qualquer combinação. Outras articulações não fosfatadas também podem ser usadas.

[00255] Em algumas modalidades, modificações da cadeia principal (por exemplo, ligações de internucleotídeo metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato e fosforoditioato) podem conferir atividade imunomodulatória ao ácido nucleico modificado e/ou aumentar sua estabilidade *in vivo*.

[00256] Em alguns casos, um derivado fosforoso (ou grupo fosfato modificado) é anexado ao açúcar ou à porção análoga do açúcar e pode ser um monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato ou similar. Polinucleotídeos exemplificadores contendo ligações fosfatadas modificadas ou ligações não fosfatadas podem ser encontrados em Peyrottes et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; e 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, pp. 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 US No. 5.453.496; e Micklefield, 2001, *Curr. Med. Chem.* 8: 1157-1179.

[00257] Em alguns casos, a modificação da cadeia principal compreende a substituição da ligação fosfodiéster por uma porção alternativa, como um grupo aniônico, neutro ou catiônico. Exemplos dessas modificações incluem: ligação internucleosídeo aniônica; modificação

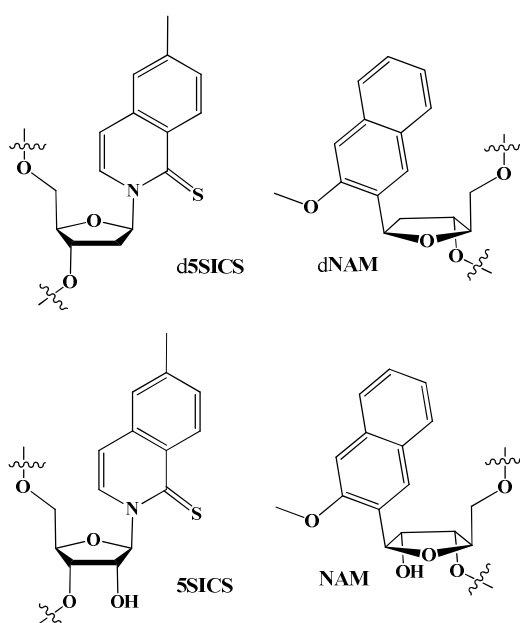
do fosforamidato de N3 a P5; DNA do boranofosfato; prooligonucleotídeos; ligações internucleosídeo neutras, como metilfosfonatos; DNA ligado à amida; ligações de metileno (metilimino); ligações de formacetal e tioformacetal; cadeias principais contendo grupos sulfonila; oligos morfolino; peptídeo de ácidos nucleicos (PNA); e oligos de guanidina desoxirribonucleica (DNG) carregada positivamente (Micklefield, 2001, Current Medicinal Chemistry 8: 1157-1179). Um ácido nucleico modificado pode incluir uma cadeia principal quimérica ou mista compreendendo uma ou mais modificações, por exemplo, uma combinação de ligações de fosfato, como uma combinação de ligações de fosfodiéster e fosforotioato.

[00258] Substituintes dos fosfatos incluem, por exemplo, acoplamentos internucleosídeos de alquila ou cicloalquila de cadeia curta ou acoplamentos internucleosídeos mistos de heteroátomo de alquila ou cicloalquila, ou um ou mais acoplamentos internucleosídeos heteroatômicos ou heterocíclicos de cadeia curta. Estes incluem os que têm acoplamentos morfolino (formado, em parte, da porção do açúcar de um nucleosídeo); cadeias principais de siloxano; cadeias principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; cadeias principais de formacetil e tioformacetil; cadeias principais de formacetil e tioformacetil de metileno; alce-no contendo cadeias principais; cadeias principais de sulfamato, cadeias principais de metilenoimino e metilenohidrazino; cadeias principais de sulfonato e sulfonamida; cadeias principais de amida; e outros tendo partes componentes misturados N, O, S e CH₂. Inúmeras patentes dos Estados Unidos revelam como fazer e usar esses tipos de substituições de fosfatos e incluem, sem limitação, as patentes US nºs 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; e 5.677.439. Compreende-se também em um substituto de nucleotídeo que tanto o açúcar como as porções fosfatadas do nucleotídeo podem ser substituídas, por exemplo, por uma ligação do tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). As Patentes dos Estados Unidos nºs. 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262 ensinam como fazer e usar moléculas de PNA, cada uma delas incorporada aqui por referência. Veja também Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500. Também é possível ligar outros tipos de moléculas (conjugados) a nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos para melhorar, por exemplo, a absorção celular. Os conjugados podem ser quimicamente ligados ao nucleotídeo ou análogos do nucleotídeo. Tais conjugados incluem, mas não se limitam a, porções lipídicas, como a porção do 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), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., *Ann. KY. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), um tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos dodecandiol ou undecil (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), um fosfolípídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou trietilamônio 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), uma cadeia de poliamina ou um polietilenoglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14,969-973), ou ácido acético adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), uma porção palmitila (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), ou uma porção octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,

1996, 277,923-937). Numerosas patentes US ensinam a preparação de tais conjugados e incluem, mas não estão limitados a, patentes US nºs 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; 6.239.265; 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 e 5,688,941.

[00259] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos não naturais formam ainda mais pares de base não naturais. Nucleotídeos exemplificadores não naturais capazes de formar um par de base de DNA ou RNA (UBP) não natural em condições in vivo incluem, mas não se limitam a, 5SICS, d5SICS, NAM, dNaM, TPT3TP, dTPT3TP, e combinações destes. Em algumas modalidades, os nucleotídeos não naturais incluem:



[00260] Em algumas modalidades, um par de base não natural gera

um aminoácido não natural descrito em Dumas *et al.*, “Designing logical codon reassignment – Expanding the chemistry in biology”, *Chemical Science*, **6**: 50-69 (2015).

[00261] A célula hospedeira na qual as construções ou vetores revelados aqui são introduzidos é cultivada ou mantida em um meio adequado, de tal forma que o tRNA, o tRNA sintetase e a proteína de interesse são produzidos. O meio também compreende o(s) aminoácido(s) não natural(is) de tal forma que a proteína de interesse incorpora o(s) aminoácido(s) não natural(is).

[00262] O par tRNA sintetase/tRNA ortogonal carrega um tRNA com um aminoácido não natural e incorpora o aminoácido não natural à cadeia polipeptídica em resposta ao códon. Os pares exemplares de aaRS-tRNA incluem, mas não se limitam a, pares aaRS/tRNA de *Methanococcus jannaschii* (Mj-Tyr), pares TyrRS (Ec-Tyr) de *E. coli*/tRNA_{CUA} de *B. stearothermophilus*, pares LeuRS (Ec-Leu) de *E. coli*/tRNA_{CUA} de *B. stearothermophilus* e pares de pirrolisil-tRNA.

[00263] Um polipeptídeo da IL-15 compreendendo aminoácido(s) não natural(is) é preparado pela introdução de construções de ácidos nucleicos descritos aqui que compreendem o tRNA e tRNA sintetase e que compreendem uma sequência de interesse de ácido nucleico com um ou mais códons ortogonais (parada) dentro da estrutura em uma célula hospedeira. A célula hospedeira é exposta a uma solução fisiológica que compreende o(s) aminoácido(s) não natural(is), e as células hospedeiras são então mantidas sob condições que permitem a expressão da sequência de codificação da proteína de interesse. O(s) aminoácido(s) não natural(is) é incorporado à cadeia de polipeptídeo em resposta ao códon. Por exemplo, um ou mais aminoácidos não naturais estão incorporados no polipeptídeo da IL-15. Alternativamente, dois ou mais aminoácidos não naturais podem ser incorporados no polipeptídeo da IL-15 em dois ou mais sítios na proteína.

[00264] Quando múltiplos aminoácidos não naturais são incorporados a um polipeptídeo da IL-15, será entendido que múltiplos códons precisarão ser incorporados na sequência de codificação do ácido nucleico nas posições desejadas, de modo que os pares tRNA sintetase/tRNA possam direcionar a incorporação dos aminoácidos não naturais em resposta ao(s) códon(s). Pelo menos 1, 2, 3, 4 ou mais códons codificando ácidos nucleicos talvez sejam incorporados na sequência de interesse do ácido nucleico.

[00265] Quando se pretende incorporar mais de um tipo de aminoácido não natural na proteína de interesse em uma única proteína, pode ser usado um segundo ou mais pares tRNA-tRNA sintetase ortogonal para incorporar o segundo ou mais aminoácidos não naturais; o segundo ou mais pares de tRNA-tRNA sintetase ortogonal, reconhece um códon diferente no ácido nucleico que codifica a proteína de interesse, de modo que os dois ou mais aminoácidos não naturais possam ser especificamente incorporados em diferentes sítios definidos na proteína em uma única etapa de fabricação. Em certas modalidades, dois ou mais pares de tRNA-tRNA sintetase ortogonais podem, portanto, ser usados.

[00266] Uma vez que o polipeptídeo da IL-15 incorporando o(s) aminoácido(s) não natural(is) foi(foram) produzido(s) na célula hospedeira, ele pode ser extraído por uma variedade de técnicas conhecidas no campo, incluindo lise enzimática, química e/ou osmótica e interrupção física. O polipeptídeo da IL-15 pode ser purificado por técnicas padrão conhecidas no campo, como cromatografia preparativa, purificação por afinidade ou qualquer outra técnica adequada.

[00267] As células hospedeiras adequadas podem incluir células bacterianas (por exemplo, *E. coli*), mas a maioria das células hospedeiras adequadas são células eucarióticas, por exemplo, células de insetos (por exemplo, *Drosophila*, como *Drosophila melanogaster*), cé-

lulas de levedura, nematoides (por exemplo, *Caenorhabditis elegans*), camundongos (por exemplo, *Mus musculus*), ou células de mamíferos (como células do ovário de hamster chinês (CHO) ou células COS, células humanas 293T, células HeLa, células NIH 3T3 e células de eritroleucemia de camundongos (MEL)) ou células humanas ou outras células eucarióticas. Outras células hospedeiras adequadas são bem conhecidas por um versado na técnica. Adequadamente, a célula hospedeira é uma célula de mamíferos - como uma célula humana ou uma célula de inseto.

[00268] Outras células hospedeiras adequadas que podem ser usadas geralmente nas modalidades da invenção são as mencionadas na seção exemplos. O DNA vetorial pode ser introduzido em células hospedeiras por meio de técnicas convencionais de transformação ou transfecção. Conforme usado aqui, os termos "transformação" e "transfecção" destinam-se a se referir a uma variedade de técnicas bem reconhecidas para a introdução de uma molécula de ácido nucleico estrangeiro (por exemplo, DNA) em uma célula hospedeira, incluindo fosfato de cálcio ou co-precipitação de cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção ou eletroporação. Métodos adequados para transformação ou transfecção de células hospedeiras são bem conhecidos na técnica.

[00269] Ao criar linhagens celulares, geralmente é preferível que linhagens celulares estáveis sejam preparadas. Para uma transfecção estável de células de mamíferos, por exemplo, sabe-se que, dependendo do vetor de expressão e da técnica de transfecção usada, apenas uma pequena fração das células pode integrar o DNA estrangeiro no seu genoma. Para identificar e selecionar esses integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, para resistência a antibióticos) é geralmente introduzido nas células hospedeiras juntamente com o gene de interesse. Os marcadores selecionáveis

preferenciais incluem aqueles que conferem resistência a medicamentos, como G418, higromicina ou metotrexato. Moléculas de ácido nucleico codificando um marcador selecionável podem ser introduzidas em uma célula hospedeira no mesmo vetor ou podem ser introduzidas em um vetor separado. As células transfectadas de forma estável com a molécula de ácido nucleico introduzida podem ser identificadas pela seleção de fármacos (por exemplo, as células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão, enquanto as outras células morrem).

[00270] Em uma modalidade, as construções descritas aqui são integradas ao genoma da célula hospedeira. Uma vantagem da integração estável é que a uniformidade entre células individuais ou clones é alcançada. Outra vantagem é que a seleção dos melhores produtores pode ser realizada. Assim, é desejável criar linhagens celulares estáveis. Em outra modalidade, as construções descritas aqui são transfectadas na célula hospedeira. Uma vantagem de transferir as construções para a célula hospedeira é que os rendimentos da proteína podem ser maximizados. Em um aspecto, é descrita uma célula que compreende a construção de ácido nucleico ou o vetor descrito aqui.

Composições e formulações farmacêuticas

[00271] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica e as formulações descritas aqui são administradas a um indivíduo por várias rotas de administração, incluindo, mas não se limitando a, rotas de administração parenteral, orais ou transdérmicas. Em alguns casos, a administração parenteral compreende administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, intracerebral, intranasal, intra-arterial, intra-articular, intradérmico, intravítreo, infusão intraóssea, intraperitoneal ou intratecal. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração local. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração sistêmica.

[00272] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas incluem, mas não se limitam a, dispersões líquidas aquosas, dispersões autoemulsificantes, dispersões lipossômicas, aerossóis, formulações de liberação imediata, formulações de liberação controlada, formulações de liberação tardia, formulações de liberação prolongada, formulações de liberação pulsátil e formulações de liberação mista imediata e controlada.

[00273] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas incluem um veículo ou materiais de veículo selecionados com base na compatibilidade com a composição revelada aqui, e as propriedades do perfil de liberação da forma farmacêutica desejada. Materiais de veículos exemplares incluem, por exemplo, aglutinantes, tensoativos, solubilizadores, estabilizadores, lubrificantes, agentes umectantes, diluentes e similares. Os materiais de veículo farmacêuticamente compatíveis incluem, mas não se limitam a acácia, gelatina, dióxido de silício coloidal, glicerofosfato de cálcio, lactato de cálcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnésio, polivinilpirrolidona (PVP), colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sódio, lecitina de soja, ácido taurocólico, fosfotidilcolina, cloreto de sódio, fosfato tricálcico, fosfato dipotássico, celulose e conjugados de celulose, açúcares estearoil lactilato de sódio, carragenina, monoglicerídeo, diglicerídeo, amido pré-gelatinizado e semelhantes. Ver, por exemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth 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*, sétima Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

[00274] Em alguns casos, a composição farmacêutica é formulada como um imunolissoma, que compreende uma pluralidade de conju-

gados da IL-15 ligados direta ou indiretamente à bicamada lipídica de lipossomas. Os lipídios exemplares incluem, mas não se limitam a, ácidos graxos; fosfolipídeos; esteróis como colesterolídeos; esfingolipídeos como esfingolomielina; glicosfingolipídeos como gangliosilaterais, globoides e cerebrosos; aminas tensoativas como estearil, oleil e linoleil aminas. Em alguns casos, o lipídio compreende um lipídio catiônico. Em alguns casos, o lipídio compreende um fosfolipídeo. Os fosfolipídeos exemplares incluem, mas não se limitam a, ácido fosfático ("PA"), fosfatidilcolina ("PC"), fosfatidilglicerol ("PG"), fosfatidiletanolamina ("PE"), fosfatidilinositol ("PI") e fosfatidilserina ("PS"), esfingomielina (incluindo esfingomielina cerebral), lecitina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, cerebrosídeos, diaraquidoilfosfatidilcolina ("DAPC"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilcolina ("DDPC"), dielaidoilfosfatidilcolina ("DEPC"), dilauroilfosfatidilcolina ("DLPC"), dilinoleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), distearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina ("POPC"), diaracidoilfosfatidilglicerol ("DAPG"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilglicerol ("DDPG"), dielaidoilfosfatidilglicerol ("DEPG"), dilauroilfosfatidilglicerol ("DLPG"), dilinoleoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG"), dipalmitoilfosfatidilglicerol ("DPPG"), distearoilfosfatidilglicerol ("DSPG"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol ("POPG"), diaraquidoilfosfatidiletanolamina ("DAPE"), didecanoil-L-alfa-fosfatidiletanolamina ("DDPE"), dielaidoilfosfatidiletanolamina ("DEPE"), dilauroilfosfatidiletanolamina ("DLPE"), dilinoleoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidiletanolamina ("DMPE"), dioleoilfosfatidiletanolamina ("DOPE"), dipalmitoilfosfatidiletanolamina ("DPPE"), distearoilfosfatidiletanolamina ("DSPE"), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina ("POPE"), diaracidoilfosfatidilinositol ("DAPI"), didecanoil-L-alfa-fosfatidilinositol ("DDPI"), dielaidoilfosfatidilinositol

(“DEPI”), dilauroilfosfatidilinositol (“DLPI”), dilinoleoilfosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilinositol (“DMPI”), dioleoilfosfatidilinositol (“DOPI”), dipalmitoilfosfatidilinositol (“DPPI”), distearoilfosfatidilinositol (“DSPI”), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinositol (“POPI”), diaracidoilfosfatidilserina (“DAPS”), didecanoil-L-alfa-fosfatidilserina (“DDPS”), dielaidoilfosfatidilserina (“DEPS”), dilauroilfosfatidilserina (“DLPS”), dilinoleoilfosfatidilserina, dimiristoilfosfatidilserina (“DMPS”), dioleoilfosfatidilserina (“DOPS”), dipalmitoilfosfatidilserina (“DPPS”), distearoilfosfatidilserina (“DSPS”), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilserina (“POPS”), diaracidoil esfingomielina, didecanoil esfingomielina, dielaidoil esfingomielina, dilauroil esfingomielina, dilinoleoil esfingomielina, dimiristoil esfingomielina, esfingomielina, dioleoil esfingomielina, dipalmitoil esfingomielina, distearoil esfingomielina, e 1-palmitoil-2-oleoil-esfingomielina.

[00275] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas incluem ainda agentes de regulação do pH ou agentes de tamponamento que incluem ácidos como ácido acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico e clorídrico, bases como hidróxido de sódio, fosfato de sódio, borato de sódio, citrato de sódio, acetato de sódio, lactato de sódio e tris-hidroximetilaminometano, e tampões como citrato/dextrose, bicarbonato de sódio e cloreto de amônio. Tais ácidos, bases e tampões são incluídos numa quantidade necessária para manter o pH da composição em uma faixa aceitável.

[00276] Em alguns casos, a formulação farmacêutica inclui um ou mais sais em uma quantidade necessária para levar a osmolalidade da composição a uma faixa aceitável. Tais sais incluem os que apresentam cátions de sódio, potássio ou amônio, e ânions de cloreto, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato ou bissulfito, sais adequados incluem cloreto de sódio, cloreto de potássio, tiosulfato de sódio, bissulfito de sódio e sulfato de amônio.

[00277] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas

incluem, mas não se limitam a, açúcares como trealose, sacarose, manitol, sorbitol, maltose, glicose ou sais como fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de amônio e/ou outros agentes como heparina para aumentar a solubilidade e a estabilidade *in vivo* dos polipeptídeos.

[00278] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas incluem ainda diluente que são usados para estabilizar compostos porque podem fornecer um ambiente mais estável. Os sais dissolvidos em soluções tampão (que também podem fornecer controle ou manutenção de pH) são usados como diluentes na técnica, incluindo, mas não se limitando a, uma solução salina tamponada com fosfato.

[00279] Os estabilizadores incluem compostos como quaisquer agentes antioxidação, tampões, ácidos, conservantes e semelhantes. Os estabilizadores exemplares incluem cloridrato de L-arginina, trome-tamina, albumina (humana), ácido cítrico, álcool benzílico, fenol, bifosfato dissódico desidratado, propilenoglicol, metacresol ou m-cresol, acetato de zinco, polissorbato-20 ou Tween® 20, ou trometamol.

[00280] Os tensoativos incluem compostos como lauril sulfato de sódio, docusato de sódio, Tween 60 ou 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato sorbitano, monooleato de polioxietileno sorbitano, polissorbatos, polaxômeros, sais biliares, monostato de glicerila, copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno, por exemplo, Plurônico® (BASF) e similares. Os tensoativo adicional incluem glicerídeos de ácidos graxos de polioxietileno e óleos vegetais, por exemplo, óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno (60), polioxietileno alquiléteres e alquilfenil eters, por exemplo, octoxol 10, octoxol 40. Às vezes, os tensoativos são incluídos para melhorar a estabilidade física ou para outros fins.

Regimes terapêuticos

[00281] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas

descritas aqui são administradas para aplicações terapêuticas. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada uma vez por dia, duas vezes por dia, três vezes por dia ou mais. A composição farmacêutica é administrada diariamente, todos os dias, dias alternados, cinco dias por semana, uma vez por semana, a cada duas semanas, duas semanas por mês, três semanas por mês, uma vez por mês, duas vezes por mês, três vezes por mês ou mais. A composição farmacêutica é administrada por pelo menos 1 mês, 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 anos, 3 anos ou mais.

[00282] No caso em que o estado do paciente melhora, a critério do médico, a administração da composição é dada continuamente, alternativamente, a dose da composição que está sendo administrada é temporariamente reduzida ou temporariamente suspensa por um determinado período de tempo (ou seja, um "férias de medicação"). Em algumas modalidades, a duração das férias de medicação varia entre 2 dias e 1 ano, incluindo, por exemplo, apenas 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 15 dias, 20 dias, 28 dias, 35 dias, 50 dias, 70 dias, dias, dias, dias, 100 dias, 120 dias, 150 dias, 180 dias, 200 dias, 250 dias, 280 dias, 300 dias, 320 dias, 350 dias ou 365 dias. A redução da dose durante as férias de uma medicação é de 10% a 100%, incluindo, apenas por exemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100%.

[00283] Uma vez que as condições do paciente tenham sido melhoradas, uma dose de manutenção é administrada, se necessário. Posteriormente, a dosagem ou a frequência de administração, ou ambas, pode ser reduzida, em função dos sintomas, a um nível em que a doença, o transtorno ou a condição melhorados sejam mantidos.

[00284] Em algumas modalidades, a quantidade de um determina-

do agente que corresponde a tal quantidade varia dependendo de fatores como o composto específico, a gravidade da doença, a identidade (por exemplo, peso) do indivíduo ou hospedeiro que precisa de tratamento, mas, no entanto, é rotineiramente determinado de uma maneira conhecida na técnica de acordo com as circunstâncias particulares que envolvem o caso, incluindo, por exemplo, o agente específico sendo administrado, a rota de administração e o indivíduo ou hospedeiro sendo tratado. Em algumas modalidades, a dose desejada é convenientemente apresentada em uma única dose ou como doses divididas administradas simultaneamente (ou em um curto período de tempo) ou em intervalos apropriados, por exemplo, como duas, três, quatro ou mais subdoses por dia.

[00285] As faixas mencionadas acima são meramente sugestivas, pois o número de variáveis em relação a um regime de tratamento individual é grande, e excursões consideráveis desses valores recomendados não são incomuns. Tais doses são alteradas em função de uma série de variáveis, não limitadas à atividade do composto usado, à doença ou à condição a ser tratada, ao modo de administração, às exigências individuais do indivíduo, à gravidade da doença ou da condição a ser tratada, e ao julgamento do profissional.

[00286] Em algumas modalidades, a toxicidade e a eficácia terapêutica de tais regimes terapêuticos são determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, incluindo, mas não se limitando a, determinação de LD50 (dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população). A razão da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e é expressado como a razão entre LD50 e ED50. Os compostos que apresentam altos índices terapêuticos são os preferidos. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e de estudos com animais podem ser

usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem de tais compostos reside preferencialmente dentro de uma gama de concentrações circulantes que incluem ao ED50 com toxicidade mínima. A dosagem varia dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada.

Kits/Artigo de fabricação

[00287] Divulgados aqui, em algumas modalidades, são kits e artigos de fabricação para uso com um ou mais métodos e composições descritos aqui. Esses kits incluem um veículo, uma embalagem ou um recipiente que é compartimentado para receber um ou mais recipientes, como frascos, tubos e semelhantes, cada um dos recipientes compreendendo um dos elementos separados a serem usados em um método descrito aqui. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Em uma modalidade, os recipientes são formados a partir de uma variedade de materiais, como o vidro ou o plástico.

[00288] Os artigos de fabricação fornecidos aqui contêm materiais de embalagem. Exemplos de materiais de embalagem farmacêutica incluem, mas não se limitam a, embalagens blister, frascos, tubos, sacos, recipientes, garrafas e qualquer material de embalagem adequado para uma formulação selecionada e modo de administração e tratamento pretendido.

[00289] Por exemplo, o(s) recipiente(s) inclui(em) um ou mais dos polipeptídeos da IL-15 ou conjugados da IL-15 divulgados aqui e, opcionalmente, um ou mais excipientes farmacêuticos descritos aqui para facilitar a entrega de polipeptídeos da IL-15 ou conjugados da IL-15. Esses kits incluem, opcionalmente, uma descrição ou rótulo de identificação ou instruções relacionadas ao seu uso nos métodos descritos aqui.

[00290] Um kit normalmente inclui rótulos que listam o conteúdo e/ou as instruções de uso e inserções de embalagem com instruções de uso. Normalmente, um conjunto de instruções também será incluído.

[00291] Em uma modalidade, um rótulo está no ou associado ao contêiner. Em uma modalidade, um rótulo está em um contêiner quando letras, números ou outros caracteres que formam o rótulo são anexados, moldados ou gravados no próprio contêiner, um rótulo é associado a um contêiner quando ele está presente em um receptáculo ou veículo que também contém o contêiner, por exemplo, como um encarte da embalagem. Em uma modalidade, um rótulo é usado para indicar que o conteúdo deve ser usado para uma aplicação terapêutica específica. O rótulo também indica as instruções de uso do conteúdo, como nos métodos descritos aqui.

[00292] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas são apresentadas em uma embalagem ou dispositivo dispensador que contém uma ou mais formas farmacêuticas contendo um composto fornecido aqui. A embalagem, por exemplo, contém folha de metal ou de plástico, como uma embalagem blister. Em uma modalidade, a embalagem ou dispositivo dispensador é acompanhado de instruções de administração. Em uma modalidade, a embalagem ou o dispensador também é acompanhado de um aviso associado ao recipiente na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, o uso ou a venda de produtos farmacêuticos, no qual o aviso reflete a aprovação pela agência da forma do fármaco destinado à administração humana ou veterinária. Esse aviso, por exemplo, é o rótulo aprovado pela U.S. Food and Drug Administration for Drugs (Administração de alimentos e medicamentos dos EUA) ou as instruções do produto aprovado. Em uma modalidade, as composições contendo um composto formulado aqui em um veículo farmacêutico compatível também

são preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

Certa terminologia

[00293] A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado que normalmente entendido pelo versado na técnica a qual o assunto reivindicado pertence. É para ser entendido que a descrição detalhada é exemplificadora e explicativa apenas e não restritiva de qualquer assunto reivindicado. Neste pedido, o uso do singular inclui o plural a menos que seja especificamente indicado em contrário. Precisa ser observado que como usado no relatório descritivo, as formas singulares “um”, “uma”, “o” e “a” incluem referências no plural, a menos que o contexto determine claramente o contrário. Neste pedido, o uso de “ou” significa “e/ou” salvo se indicado em contrário. Além disso, o uso do termo “incluindo”, bem como outras formas, como “inclui”, “incluindo” e “incluído”, não são limitantes.

[00294] Embora várias características da invenção podem também ser descritas no contexto de uma única modalidade, as características também podem ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada. Por outro lado, embora a invenção possa ser descrita aqui no contexto de modalidades separadas para fins de clareza, a invenção também pode ser implementada em uma única modalidade.

[00295] Referência no relatório descritivo para "algumas modalidades", "uma modalidade" ou "outras modalidades" significa que um determinado recurso, estrutura ou característica descrito em conjunto com as modalidades está incluído em pelo menos algumas modalidades, mas não necessariamente todas as modalidades, da presente invenção.

[00296] Conforme usado aqui, os intervalos e valores podem ser

expressados como "sobre" um determinado valor ou intervalo. "Cerca de" também inclui o valor exato. Por isso, "cerca de 5 μ L" significa "cerca de 5 μ L" e também "5 μ L". Geralmente, o termo "cerca de" inclui uma quantidade que seria esperada dentro de um erro experimental.

[00297] Os cabeçalhos de seção usados aqui são para fins organizacionais apenas e não são para ser interpretados como limitando o assunto descrito.

[00298] Conforme usado aqui, os termos "indivíduo(s)", "sujeito(s)" e "paciente(s)" significam qualquer mamífero. Em algumas modalidades, o mamífero é um ser humano. Em algumas modalidades, o mamífero é um ser não humano. Nenhum dos termos requer ou está limitado a situações caracterizadas pela supervisão (por exemplo, constante ou intermitente) de um profissional de saúde (por exemplo, um médico, um enfermeiro registrado, um enfermeiro assistente, um assistente médico, um assistente ordenado ou um assistente de cuidados de saúde).

[00299] Conforme usado aqui, os termos "significante" e "significativo" em referência à ligação do receptor significam uma alteração suficiente para afetar a ligação do polipeptídeo da IL-15 a um receptor alvo. Em algumas modalidades, o termo refere-se a uma mudança de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 90%, ou mais. Em algumas modalidades, o termo significa uma mudança de pelo menos 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 50 vezes, 100 vezes, 500 vezes, 1.000 vezes ou mais.

[00300] Em alguns casos, o termo "significativamente" em referência à ativação de uma ou mais populações celulares através de um complexo de sinalização de citocinas significa uma mudança suficiente para ativar a população celular. Em alguns casos, a mudança para ativar a população celular é medida como uma potência de sinalização

do receptor. Nesses casos, um valor EC50 pode ser fornecido. Em outros casos, um valor ED50 pode ser fornecido. Em casos adicionais, uma concentração ou dosagem da citocina pode ser fornecida.

[00301] Conforme usado aqui, o termo "potência" refere-se à quantidade de uma citocina (por exemplo, polipeptídeo da IL-15) necessária para produzir um efeito alvo. Em alguns casos, o termo "potência" refere-se à quantidade de citocinas (por exemplo, polipeptídeo da IL-15) necessária para ativar um receptor de citocinas alvo (por exemplo, receptor da IL-15). Em outros casos, o termo "potência" refere-se à quantidade de citocinas (por exemplo, polipeptídeo da IL-15) necessária para ativar uma população de células alvo. Em alguns casos, a potência é medida como ED50 (dose eficaz 50), ou a dose necessária para produzir 50% de um efeito máximo. Em outros casos, a potência é medida como EC50 (concentração efetiva 50), ou a dose necessária para produzir o efeito alvo em 50% da população.

[00302] Conforme usado aqui, o termo "célula(s) imune(s) infiltrada(s) tumoral(s)" refere-se a células imunes que se infiltraram em uma região que compreende células tumorais (por exemplo, em um microambiente tumoral). Em alguns casos, as células imunes infiltrantes do tumor estão associadas à destruição de células tumorais, à diminuição da proliferação de células tumorais, à redução da carga tumoral ou a combinações dessas células. Em alguns casos, as células imunes infiltrantes do tumor compreendem linfócitos de infiltração tumoral (TILs). Em alguns casos, as células imunes infiltrantes do tumor compreendem células T, células B, células naturais assassinas, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos ou basófilos. Em alguns casos, as células imunes infiltrantes do tumor compreendem células T CD4+ ou CD8+.

EXEMPLOS

[00303] Esses exemplos são fornecidos apenas para fins ilustrati-

vos e não são destinados a limitar o escopo das reivindicações fornecidas aqui.

EXEMPLO 1.

Expressão de polipeptídeos da IL-15 modificados

[00304] O polipeptídeo da IL-16 modificado foi cultivado a 37 °C, 250 rpm e 5 horas de indução. O componente do meio foi conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2.

Nome	Composição:
Meio de crescimento	2xYT 30,8 mM fosfato de potássio dibásico
Para 1 L: 2x 2xYT péletes, fosfato de potássio monofásico, fosfato de potássio dibásico	19,2 mM fosfato de potássio monobásico 100 ug/ml ampicilina 5 ug/ml cloranfenicol
Autoclave no ciclo líquido para esterilização	50 ug/ml de zeocina 37,5 uM dTPT3TP 150 uM dNAMTP

[00305] Quando a cultura de expressão atingiu OD₆₀₀ 0,85 a 0,9, a cultura foi pré-carregada com NaMTP (na concentração final de 250 uM), TPT3TP (na concentração final de 25 uM) e azido-lisina (na concentração final de 15 mM). Cerca de 15-20 minutos após a pré-carga com ribonucleotídeos e aminoácidos, IPTG foi adicionado e a proteína foi expressada por cerca de 5 horas.

Corpo de inclusão

[00306] Após a coleta de pélete celular, os péletes foram processados posteriormente para os corpos de inclusão. Em resumo, um pélete celular de 1 L foi ressuspensado em 10 ml de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; e inibidor de protease (1 pélete/50 ml)). Após a ressuspensão, o volume de 1 L de pélete foi aumentado para 45 ml com tampão de lise e corrido através do micro-

fluidizador por 2x. A amostra foi então transferida para um tubo de centrífuga de 50 ml e centrifugada a 16k rpm durante 20 minutos a 4°C. Em seguida, o pélete foi ressuspenso em 5 ml de tampão de lise e o volume total foi aumentado para 30 ml com tampão de lise. Cerca de 10% Triton X-100 foi adicionado a uma concentração final de 0,5%. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16k rpm por 20 minutos a 4°C, e o pélete foi então coletado e lavado 3x com tampão de lise de 30 ml. Uma seringa de 5 ml com agulhas foi usada para ressusensão completa com cada lavagem. Após uma rotação final, o descartado do sobrenadante e o pélete foi congelado rapidamente para armazenar a -80 °C.

Solubilização e redobramento

[00307] Foi adicionado cerca de 5 ml de tampão de solubilização ao pélete corporal de inclusão. Após a ressusensão, o volume foi aumentado para 30 ml no tampão de solubilização. Em seguida, a amostra foi incubada a 4 °C por 30-60 minutos. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo de centrífuga de 2 x 50 ml (15 ml/tubo) e um tampão de diluição de 15 ml foi adicionado a cada tubo. A amostra foi então dialisada posteriormente no tampão A1 durante a noite a 4°C, seguida pelo tampão de diálise A2, tampão de diálise A3, tampão de diálise A4 e tampão de diálise A5. Após a diálise, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C e concentrada em cerca de 5 ml.

[00308] A Tabela 3 ilustra os tampões de solubilização.

Nome	Composição:
Tampão de solubilização	6 M guanidina-HCL 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM DTT 20 mM Imidazole

Nome	Composição:
Tampão de diluição	3 M guanidina-HCL 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM DTT 20 mM Imidazole
Tampão de diálise A1	2 M guanidina-HCl 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 150 mM NaCl 1 mM GSH (glutathiona reduzida) 0,1 mM GSSG (glutathiona oxidada) 0,4 M L-Arginina
Tampão de diálise A2	0,75 M guanidina-HCl 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 150 mM NaCl 1 mM GSH (glutathiona reduzida) 0,1 mM GSSG (glutathiona reduzida) 0,4 M L-Arginina
Tampão de diálise A3	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 150 mM NaCl 1 mM GSH (glutathiona reduzida) 0,1 mM GSSG (glutathiona reduzida) 0,1 M L-Arginina
Tampão de diálise A4	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 150 mM NaCl
Tampão de diálise A5	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 12,5 mM NaCl

Purificação

[00309] A amostra foi purificada primeiro em uma coluna de filtração de gel GE HiLoad 16/600 Superdex 200 pg com 1x tampão de eluição PBS, seguida por uma coluna de troca aniônica GE HiTrapQ para remover PEG livre, e, em seguida, uma cromatografia de fase inversa com uma eluição gradiente de 30% a 70% de tampão de eluição em 20 volumes de coluna.

[00310] A Tabela 4 ilustra os tampões usados para a cromatografia de troca aniônica. A Tabela 5 ilustra os tampões usados para a cromatografia de fase reversa.

Tabela 4

Nome	Composição:
Tampão de corrida	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
Tampão de eluição	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl

Tabela 5

Nome	Composição:
Tampão de corrida	4,5% acetonitrila 0,043% TFA
Tampão de eluição	90% acetonitrila 0,028% TFA

[00311] A Fig. 4 mostra uma corrida exemplar da cromatografia de troca aniônica.

[00312] A Fig. 5 mostra uma corrida exemplar de cromatografia de fase reversa.

EXEMPLO 2

Triagem baseada em célula para identificação de compostos IL-15 peguilados com qualquer um dos engajamentos nativos ou sem IL-15R α

[00313] Dados estruturais do complexo de sinalização do receptor heterotérico/ IL-15 (PDB: 4GS7) foram utilizados para orientar o desenho de sítios de peguilação nAA para manter a interação nativa com o receptor heterotrimérico ou especificamente para substituir a interação da IL-15 e da subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α). Os conjugados da IL-15 exemplificadores foram submetidos à análise funcional: S18, A23, T24, L25, Y26, E46, V49, L52, E53, N77, S83, E89, E90. Os conjugados da IL-15 foram expressados como corpos de inclusão em E. coli, purificados e redobrados usando procedimentos padrão antes

da peguilação específica do sítio do produto da IL-15 usando química de clique sem cobre mediada por DBCO para fixar porções mPEG estáveis e covalentes ao AzK. Os conjugados da IL-15 foram triados para atividade funcional usando um ensaio colorimétrico de proliferação CTLL2. CTLL2 é um subclone de células T do camundongo que expressa todas as três subunidades do receptor da IL-15 e requer IL-2/IL-15 para crescimento. Experimentos preliminares foram realizados para determinar a densidade celular ideal, faixa de IL-15 padrão ou conjugados da IL-15 para uma curva dose-resposta adequada, bem como o tempo de incubação. Uma IL-15 humana recombinante interna (rHuIL-15) foi comparada a uma IL-15 padrão comercial (R&D, catálogo # 247-IL). Nas condições definidas, o EC50 para a IL-15 padrão comercial foi de aproximadamente 10,7 pM e 9,7 pM para a rHuIL-15 interna.

[00314] A Tabela 6 mostra os dados de EC50 para os conjugados da IL-15 peguilada linear de 30 kDa, projetados para manter a interação nativa com o receptor da IL-15 heterotrimérico. O número de valores incluídos na média é indicado entre colchetes. Os resultados mostram que a bioconjugação com um PEG de 30 kDa não interfere com a potência no receptor trimérico com EC50 reduzido por menos de 5 vezes em comparação com IL-15 natural.

Tabela 6

Sítio	EC50 médio (pg/mL)	EC50 médio (pM)	Razão EC50 IL-15 PEG30/rHuIL-15
R&D IL-15	136,80±36,84 (6)	10,7	
rHuIL-15	124,62±73,75 (6)	9,7	
PEG30 de S18	414,10 (2)	32,1	3,3
PEG30 de S83	199,80 (2)	15,5	1,6
PEG30 de N77	236,05 (2)	18,3	1,9

[00315] A Tabela 7 mostra os dados de EC50 para conjugados da IL-15 peguilada ramificados de 40 kDa e lineares de 30 kDa projetados

especificamente para substituir a interação da IL-15 e subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α). O número de valores incluídos na média é indicado entre colchetes. Os resultados mostram que a bioconjugação com um PEG de 30 kDa reduz a potência no receptor trimérico em comparação com IL-15 natural. A bioconjugação de um PEG 30 kDa linear ou de um PEG 40 kDa ramificado para V49 reduz moderadamente a potência para o receptor trimérico em comparação com rHuIL-15 (~6-8 vezes, 814,4 pg/mL para 1,029 pg/mL vs 124,62 pg/mL, respectivamente). Além disso, a potência de L25 PEG39 foi mais fortemente reduzida em relação a rHuIL-15 (~54 vezes, 6,827 pg/mL vs 124,62 pg/mL, respectivamente).

Tabela 7

Sítio	EC50 médio (pg/mL)	EC50 médio (pM)	Razão 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
PEG30 de L25	6.827 (2)	529,0	54
PEG30 de V49	814,45 (2)	63,1	6
V49 PEG(40b)	1.019	79,0	8
PEG30 de E46	65.893	5.106	526
PEG30 de E53	22.766	1.764	182

[00316] A Fig. 6 ilustra os valores de EC50 para conjugados exemplares de IL-15 com potência nativa no ensaio de proliferação CTLL2. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

[00317] A Fig. 7 ilustra os valores de EC50 para conjugados da IL-15 exemplificadores. Como mostrado aqui, a peguilação sítio-específica contribui para a farmacologia in vitro. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

[00318] A Fig. 8 ilustra os valores de EC50 para a IL-15 conjugada exemplificadora a diferentes tamanhos de PEG. Os resultados são plotados como porcentagem da resposta.

EXEMPLO 3**Interações bioquímicas da IL-15 peguilada com subunidades do receptor da IL-15 humana**

[00319] A cinética das interações do composto da IL-15 peguilada com subunidades do receptor da IL-15 humana foi medida por ressonância de plásmon de superfície (SPR) em Biofizik (San Diego, CA). Para esses estudos, os domínios extracelulares do IL-15 R α fundido com Fc da IgG1 humana (Sino Biological #18366-H02H, R&D # 7194-IR) e IL-2 R β (Sino Biological #10696-H02H) foram capturados na superfície de um chip de sensor CM3 ou CM4 revestido com proteína A da Biacore. A proteína A foi acoplada pelo acoplamento de amina a uma densidade de aproximadamente 1500 RU em um chip CM3 a 25 °C. Aproximadamente 400 UR da fusão IL15R α -Fc foram capturados usando um tempo de contato de 4 minutos seguido por um tempo de espera de 20 minutos antes da injeção do analito. A regeneração da superfície entre as injeções foi realizada com o uso de 100 mM ácido fosfórico. O receptor fresco foi capturado a cada ciclo após a regeneração. Essas superfícies foram sondadas em triplicados a 25 °C. Em um experimento típico, foram injetadas 10 doses de analito com maior concentração de 500 nM. Em alguns casos, foi necessária uma alta faixa de concentração e, em outros, as doses mais altas foram omitidas da análise.

[00320] Devido à ligação mais fraca dos compostos ao IL2R β , a regeneração não foi necessária e foram realizados estudos de ligação ortogonal sem a etapa de regeneração. Aproximadamente 600-700 UR de fusão IL2R β Fc foram capturados usando um tempo de contato de 1-2 min de uma diluição de 1/100 de estoque em tampão de corrida. Para os compostos de teste, foram injetadas 10 doses de analito com maior concentração de 1000 nM. Os dados brutos foram analisados com o programa Scrubber2 usando um procedimento de referência

dupla, onde o sinal composto é corrigido para uma superfície em branco e uma injeção de tampão sobre a superfície da proteína. Ver Tabelas 8 a 10.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos para compostos peguilados rHull-15 e IL-15 para superfícies da subunidade IL-15R α .

Composto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHull-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
N77PEG30 de IL15	2.249E+05	4.146E-04	1,845
	2.404E+05	3.613E-04	1,502
	2.206E+05	2.926E-04	1,328
S83PEG30 de IL15	3.669E+05	2.137E-04	0,5833
	3.543E+05	2.560E-04	0,7227
	3.215E+05	1.905E-04	0,5909

Tabela 9. Parâmetros cinéticos para compostos peguilados rHull-15 e IL-15 com ligação reduzida às superfícies da subunidade IL-15R α .

Composto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHull-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
L25PEG30 de IL15	5.07E+03	1.19E-03	233,6
	3990	1.04E-03	260,9
	4930	1.22E-03	248,1
E46PEG30 de IL15	3.83E+03	4.01E-04	104,6
	2805	3.01E-04	107,3
	3,17	3.25E-04	102,4
V49PEG30 de IL15	1.73E+05	5.30E-04	3,066
	1.54E+05	5.76E-04	3,75
	1.50E+05	4.22E-04	2,823

Composto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
V49PEG40b de IL15	1.51E+05	6.11E-04	4,059
	1.26E+05	5.70E-04	4,522
	1.32E+05	4.60E-04	3,483
E53PEG30 de IL15	8.76E+04	0,01484	169,4
	8.39E+04	0,01614	192,4
	1.42E+05	0,02439	171

Tabela 10. Parâmetros cinéticos para compostos peguilados rHull-15 e IL-15 com superfícies da subunidade IL-2R β .

Composto	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
rHull-15	4.161E+05	3.095E-02	74,4
	4.223E+05	3.251E-02	77
	3.632E+05	2.863E-02	78,8
N77PEG30 de IL15	1.101E+05	2.220E-02	201,6
	1.158E+05	2.361E-02	204
	1.099E+05	2.309E-02	210,2
S83PEG30 de IL15	1.214E+05	2.517E-02	207
	1.153E+05	2.458E-02	213
	1.386E+05	2.962E-02	213,8
V49PEG30 de IL15	1.061E+05	3.212E-02	302,7
	9.810E+04	3.045E-02	310,5
	9.700E+04	2.710E-02	279,5
V49PEG40b de IL15	1.187E+05	3.091E-02	260,5
	1.071E+05	2.690E-02	251,2
	1.061E+05	2.552E-02	240,5
E53PEG30 de IL15	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

[00321] Em superfícies de sensor contendo IL-15R α imobilizado, IL-15 nativa (rHull-15 e IL-15 comercial da R&D) mostrou associação

rápida e cinética de dissociação muito lenta, demonstrando ligação de afinidade muito alta (Fig. 9 A). As variantes peguiladas da IL-15 projetadas para estender a meia-vida sem bloquear a interação com receptores da IL-15 mostram cinética de ligação semelhante à IL-15 nativa. A modesta diferença em KD (~10 e ~3 vezes diminuiu a KD para IL-15 N77PEG30 e IL-15 S83PEG30, respectivamente) observada entre os compostos para a subunidade deve-se à diminuição da taxa de ativação dos compostos conjugados da IL-15 em relação a rHull-15, esperado do coeficiente de difusão inferior do composto peguilado e efeitos de blindagem não específicos da porção PEG grande em superfícies de ligação distantes (Fig. 9B). Em contraste, a IL-15 E46PEG30 interage com o IL-15 R α com associação lenta e dissociação lenta, enquanto IL-15 E53PEG30 mostra associação rápida e dissociação rápida (Fig. 9C) devido à localização específica da porção PEG na superfície de ligação do IL-15R α .

[00322] As superfícies contendo IL-2 R β imobilizado apresentaram associação e respostas de dissociação comparáveis com IL-15 nativa e compostos projetados para extensão de meia-vida com engajamento do receptor nativo. Compostos nos quais a porção PEG está localizada na superfície de ligação da IL-15R α mostra diferentes cinética de ligação para as superfícies da IL-2R β . Embora IL-15 E46PEG30 e IL-15 L25PEG mostrem ~10 e ~30 vezes menos ligação a essas superfícies, a IL-15 E53PEG30 mantém a ligação "nativa" à IL-2R β . Estes resultados sugerem que a localização específica da porção PEG pode conferir diferentes modalidades para a interação da IL-15 com o seu receptor.

[00323] A Fig. 9A-Fig. 9C mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHull-15, um composto conjugado da IL-15 que se liga à IL-15R α . A análise de cinética de ligação confirma que a peguilação sítio específica modula a interação com a IL-15R α .

[00324] A Fig. 10 mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHuIL-15, uma IL-15 N77PEG30 que se liga à IL-15R α e IL-2R β . A análise de cinética de ligação confirma que a peguilação sítio específica na posição N77 mantém a interação nativa com IL-15R α e IL-2R β .

[00325] A Fig. 11 mostra unidades de resposta (UR, eixo Y) versus tempo (s, eixo X) para rHuIL-15, uma IL-15 E53PEG30 que se liga à IL-15R α e IL-2R β . A análise de cinética de ligação confirma que a peguilação sítio específica na posição E53 reduz a ligação à IL-15R α , mantendo a interação nativa com a IL-2R β .

EXEMPLO 4

Perfil de resposta imune ex vivo dos conjugados da IL-15 PEG em amostras primárias de PBMC derivadas do sistema de redução de leucócitos humanos (LRS)

[00326] Para determinar como a especificidade diferencial do receptor dos conjugados da IL-15 PEG afeta a ativação das subpopulações de células imunes primárias, o perfil da concentração-resposta da ativação de linfócitos em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) derivadas de LRS humanos usando citometria de fluxo multicolorido. Esses estudos foram realizados na PrimityBio LLC (Fremont, CA). Amostras frescas derivadas de LRS foram tratadas com rHuIL-15 ou compostos peguilados da IL-15 diferentes em série de diluição de 5 vezes, começando com uma concentração superior de 30 μ g/mL. As populações celulares tratadas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos antes da adição de BD Lyse/Fix Buffer e manchando com o painel de anticorpos fluorescentes mostrado na Tabela 11. A citometria de fluxo multicolorido foi usada para detectar e quantificar a ativação do pSTAT5 em diferentes subgrupos de células T e NK. Os dados da citometria de fluxo foram analisados para ativação de diferentes subgrupos de células T e NK no modo concentração-resposta,

lendo o acúmulo de pSTAT5 após tratamento com compostos peguila-dos rHuIL-15 ou IL-15.

Tabela 11. Painel de coloração para estudo de citometria de fluxo de amostras PBMC derivadas de LRS

Painéis	Humana
Pan-T	CD3
CD4	CD4
CD8	CD8
Marcador de NK	CD7
Treg	FoxP3
Treg	CD25 (ou CD127)
CD45RA	CD45RA
C62L	C62L
CD14/CD19	CD14/CD19
Fosfo	STAT5 (pY694)

[00327] Em populações de células NK e de células T efectoras (CD3+ ou CD8+), IL-15 N77PEG30 e IL-15 S83PEG30 mantiveram a potência relativa a rHuIL-15, com valores de EC50 para a produção de pSTAT5 dentro de 2 vezes da citocina nativa. Em contraste, os valores de EC50 para indução de pSTAT5 para IL-15 L25PEG30 em populações de células T CD8+ e NK foram reduzidos em ~14 e ~18 vezes, respectivamente, em comparação com rHuIL-15. O aumento substancial da EC50 para a IL-15 L25PEG30 indica que a peguilação da IL-15 nesta posição reduz o agonismo dos receptores da IL-15. Os valores de EC50 para indução de pSTAT5 para IL-15 E53PEG30 em populações de células T CD8+ e NK foram reduzidos em apenas ~2-vezes em comparação com rHuIL-15. Considerando esse composto, observa-se associação rápida e cinética de ligação rápida de dissociação à IL-15R α .

[00328] A Tabela 12 mostra a resposta da dose para sinalização de STAT5 (EC50) em amostras humanas de LRS tratadas com conjuga-

dos rHuIL-15 ou IL-15.

Compostos	Células T CD8+ EC50 (ng/ml)	Célula NK EC50 (ng/ml)	Células T CD4+ EC50 (ng/ml)	Treg EC50 (ng/ml)
rHuIL-15	63,6	88,3	73,7	34,7
S83PEG30 de IL-15	59,4	137,8	83,3	19,2
N77PEG30 de IL-15	74,0	156,2	95,6	18,2
V49PEG30 de IL-15	100,9	180,2	135,1	32,6
V49PEG40b de IL-15	205,8	261,8	264,0	57,4
E53PEG30 de IL-15	117,3	82,4	186,8	37,1
L25PEG30 de IL-15	896,1	1.654	1.232,1	267,3

[00329] A Fig.12A-Fig.12D ilustram a fosforilação STAT5 nas células T NK e CD8+ mediante estimulação com conjugados exemplificadores IL-15 PEG.

EXEMPLO 5

Estudo de farmacologia in vivo dos conjugados da IL-15 exemplificadores

Estudos PK em camundongos virgens de tratamento (E3826-U1821) C57BL/6

[00330] Os camundongos foram administrados com rHuIL-15, conjugados da IL-15 S83-PEG 30kDa, V49-PEG 30kDa, L25-PEG 30kDa ou N77-PEG 30kDa a 0,3 mg/kg. O sangue foi coletado nos seguintes pontos de tempo: 0,25, 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 192 horas.

[00331] A Tabela 13 mostra a configuração experimental. Cada camundongo recebeu uma única dose IV de veículo, rHuIL-15, ou um dos três conjugados da IL-15.

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)
1	Veículo	0
2	rHuIL-15	0,3
3	PEG30 de L25	0,3
4	PEG30 de N77	0,3

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)
5	PEG30 de V49	0,3
6	PEG30 de S83	0,3

[00332] As concentrações de rHuIL-15, compostos peguilados da IL-15 e o padrão interno em amostras derivadas de plasma foram determinados por meio de um ensaio ELISA. A análise de dados PK foi realizada na NW Solutions (Seattle, WA). Os dados PK foram importados para Phoenix WinNonlin v6.4 (Certara/Pharsight, Princeton, NJ) para análise. A concentração plasmática média do grupo versus os dados de tempo foi analisada com um método 3-compartimental, usando um modelo de administração de bolus IV.

[00333] A Tabela 14 mostra a meia-vida prolongada dos conjugados da IL-15 em camundongos em relação a rHuIL-15.

Dose (mg/kg)	Parâmetro	Unidades	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
			rHuIL-15	L25PEG	N77PEG	V49PEG	S83PEG
			Estimativa				
0,3	T1/2 _{1/2} alfa	hr	0,305	2,89	0,0349	0,242	0,381
	T1/2 _{1/2} beta	hr	1,08	15,8	13,1	7,77	11,4
	T1/2 _{1/2} gama	hr	32,1	167	58,4	19,8	71,6
	MRT	hr	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	mg/kg	397	40,7	89,8	44,9	70,1
	V ₃	mg/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	

[00334] A Fig.13 mostra os perfis de concentração plasmática de rHuIL-15, IL-15 S83PEG30, IL-15 V49PEG30, IL-15 N77PEG30 e IL-15 L25 PEG30 a 0,3 mg/kg.

[00335] Como esperado, os compostos peguilados apresentam um

perfil PK superior em relação ao rHull-15, conforme resumido na Tabela 14. O MRT (tempo médio de residência) representa o tempo médio que uma molécula de artigo de teste permanece no corpo e leva em conta todo o perfil PK. Os compostos peguilados mostram um aumento de ~5 vezes no MRT em comparação a rHull-15. IL-15 S18PEG30 demonstrou ~15 vezes $T_{1/2}$ beta estendido (15,8 h vs. 1,08 h) e cerca de 59 vezes CL2 reduzido (5,68 vs 333 mL/h/kg) em comparação a rHull-15. O volume de distribuição dos compostos peguilados foi reduzido em relação a rHull_15, sugerindo que os compostos peguilados são distribuídos principalmente dentro da circulação sistêmica.

EXEMPLO 6

Observações farmacodinâmicas no compartimento sanguíneo periférico

Estudos PD em camundongos virgens de tratamento (E3826-U1821) C57BL/6

[00336] Os camundongos foram administrados com rHull-15, conjugado da IL-15 S18-PEG 30kDa, conjugado da V49-PEG 30kDa, ou conjugado da IL-15 S83-PEG 30kDa a 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg (Tabela 10). O sangue foi coletado nos seguintes pontos de tempo: 0,25, 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 192 horas. Um ponto de tempo adicional de 0,13 foi incluído para rHull-15 dada a conhecida meia-vida curta. As leituras de PD incluíram monitoramento intracelular do pSTAT5 e fenotipagem de células T CD8+ para todos os pontos de tempo.

[00337] A Tabela 15 mostra a configuração experimental. Cada camundongo recebeu uma única dose IV de veículo, rHull-15, ou um dos três conjugados da IL-15.

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)
1	Veículo	0
2	rHull-15	0,3

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)
3	PEG30 de S18	0,1
4	PEG30 de S18	0,3
5	PEG30 de V49	0,1
6	PEG30 de V49	0,3
7	PEG30 de L25	0,3
8	PEG30 de L25	1,0

[00338] A fosforilação STAT5 e a indução da proliferação celular (o marcador molecular inicial Ki-67 e a contagem celular) foram usadas como leituras farmacodinâmicas para avaliar o perfil farmacológico da IL-15 S18PEG30, IL-15 V49PEG30 e IL-15 L25 PEG30. Embora tenha sido observada elevação menor ou semelhante do pSTAT5 em camundongos administrados com compostos peguilados, a fosforilação STAT5 traduziu-se em maior proliferação e sustentada (dias 1 a 7 pós-dose) de células NK e T CD8+ efetoras e de memória, mas não de células Treg. (Figuras 14 a 17)

[00339] A Fig. 14A-Fig. 14D mostram % pSTAT5 em diferentes populações de células sanguíneas periféricas.

[00340] A Fig. 15A-Fig. 15D mostram maior expressão do marcador molecular de proliferação precoce Ki67 nas células T CD8+, CD8+ Tmem e NK, mas não nas células Treg em animais administrados com compostos peguilados.

[00341] A Fig. 16A-Fig. 16C apresentam células robustas periféricas T CD8+, CD8+ Tmem e NK, mas não células Treg em animais administrados com compostos peguilados.

[00342] A Fig. 17A-Fig. 17B mostram aumento da expressão de Ki67 em células CD8+ T e NK com aumento da dose de composto da IL-15 L25PEG30 em camundongos.

[00343] Embora modalidades preferenciais da presente revelação tenham sido mostradas e descritas aqui, ficará óbvio para os versados na técnica que essas modalidades são fornecidas apenas como

exemplos. Numerosas variações, alterações e substituições ocorrerão agora para os versados na técnica, sem desviar-se da revelação. Deve-se compreender que várias alternativas às modalidades da revelação aqui descritas podem ser empregadas na prática da revelação. Pretende-se que as reivindicações a seguir definam o escopo da revelação, e que os métodos e estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes sejam assim abrangidos.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo da interleucina 15 (IL-15) isolado e modificado, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um aminoácido não natural em uma posição sobre o polipeptídeo que reduz a ligação entre o polipeptídeo da IL-15 modificado e o receptor α de interleucina 15 (IL-15R α), mas mantém uma ligação significativa com o complexo de sinalização de receptor $\beta\gamma$ da interleucina 15 (IL-15R $\beta\gamma$) para formar um complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$, em que a ligação reduzida a IL-15R α é comparada à ligação entre um polipeptídeo da IL-15 de tipo selvagem e IL-15R α .

2. Polipeptídeo da interleucina 15 (IL-15) isolado e modificado caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um aminoácido não natural em uma posição no polipeptídeo que melhora a meia-vida, em que a meia-vida melhorada é comparada a uma meia-vida de uma proteína IL-15 do tipo selvagem.

3. Polipeptídeo da interleucina 15 (IL-15) isolado e modificado, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um aminoácido não natural em uma posição sobre o polipeptídeo que reduz a ligação entre o polipeptídeo da IL-15 modificado e o receptor α de interleucina 15 (IL-15R α), mas mantém uma potência de sinalização significativa com o complexo de sinalização do receptor $\beta\gamma$ da interleucina 15 (IL-15R $\beta\gamma$), em que a ligação reduzida a IL-15R α é comparada à ligação entre um polipeptídeo da IL-15 de tipo selvagem e IL-15R α .

4. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a potência de sinalização é comparada a uma potência de sinalização entre um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem e IL-15R $\beta\gamma$.

5. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma diferença na potência de sinalização do receptor entre o complexo IL-15/IL-

15R β γ modificado e o complexo IL-15/IL-15R β γ do tipo selvagem é menor que 1000 vezes, menor que 500 vezes, menor que 200 vezes, menor que 100 vezes, menor que 50 vezes, menor que 10 vezes, menor que 5 vezes, menor que 4 vezes, menor que 3 vezes, menor que 2 vezes ou menor que 1 vez.

6. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma diferença na potência de sinalização do receptor entre o complexo IL-15/IL-15R β γ modificado e o complexo IL-15/IL-15R β γ do tipo selvagem é maior que 10 vezes, maior que 20 vezes, maior que 30 vezes, maior que 40 vezes, maior que 50 vezes, maior que 100 vezes, maior que 200 vezes, maior que 300 vezes, maior que 400 vezes, ou maior que 500 vezes.

7. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada de 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 e S1144, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

8. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre

D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89,

E90 e E93, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1;

Y26, E46, V49, E53 e L25, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1;

A23, T24, E89 e E93, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1;

D22, L44, Q48 e E90, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1;

L25, E53, N77 e S83, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1; ou

L25 e E53, em que as posições dos resíduos correspondem às posições definidas na SEQ ID NO: 1.

9. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre:

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 e F110, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1;

D14, Q17, S18, K41, S51, L52, G55, D56, A57, S58, S75, S76, N77, N79, V80, T81, S83, G84, E92, K94, N95, K97 e E98, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1;

E13, L15, M19, H20, K36, V37, T38, S54, H60, I67, N71, G78, K86, E87 e Q101, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1; ou

I21, S34, C35, L44, V63, S73, L74, E82, C85, C88, L91, I96, L100 e F110, em que as posições dos resíduos correspondem às

posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

10. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos um aminoácido não natural:

- é um análogo de lisina;
- compreende uma cadeia lateral aromática;
- compreende um grupo azido;
- compreende um grupo alcino; ou
- compreende um grupo de aldeído ou cetona.

11. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos um aminoácido não natural não compreende uma cadeia lateral aromática.

12. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o pelo menos um aminoácido não natural compreende N6-azidoetóxi-L-lisina (AzK), N6-propargiletoxi-L-lisina (PraK), BCN-L-lisina, norborneno lisina, TCO-lisina, metiltetrazina lisina, aliloxicarbonil lisina, ácido 2-amino-8-oxononanoico, ácido 2-amino-8-oxooctanoico, p-acetil-L-fenilalanina, p-azidometil-L-fenilalanina (pAMF), p-iodo-L-fenilalanina, m-acetilfenilalanina, ácido 2-amino-8-oxononanoico, p-propargiloxifenilalanina, p-propargil-fenilalanina, 3-metil-fenilalanina, L-Dopa, fenilalanina fluorada, isopropil-L-fenilalanina, p-azido-L-fenilalanina, p-acil-L-fenilalanina, p-benzoil-L-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina, O-aliltirosina, O-metil-L-tirosina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, fosfonotirosina, tri-O-acetil-GlcNAcp-serina, L-fosfoserina, fosfonoserina, L-3-(2-naftil) alanina, ácido 2-amino-3-(((2-((3-(benzilóxi) -3-oxopropil) amino) etil) selanil) propanoico, ácido 2-amino-3-(fenilselanil) propanoico ou selenocisteína.

13. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos um aminoácido não natural é incorporado no polipeptídeo da IL-15 modificado por um par tRNA sintetase/tRNA ortogonal.

14. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o tRNA ortogonal do par tRNA /sintetase ortogonal compreende pelo menos uma nucleobase não natural.

15. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o tRNA ortogonal do par tRNA/sintetase ortogonal compreende um par de base não natural.

16. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer umas das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado é covalentemente anexado a uma porção conjugante através de pelo menos um aminoácido não natural.

17. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante compreende um polímero solúvel em água, um lipídio, uma proteína ou um peptídeo.

18. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o polímero solúvel em água compreende polietilenoglicol (PEG), poli(propilenoglicol) (PPG), copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, poli(poliol oxetilado), poli(álcool olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmetacrilamida), poli (hidroxiálquilmetacrilato), poli(sacarídeos), poli(α -hidroxiácido), poli (álcool vinílico), polifosfazeno, polioxazolinás (POZ), poli (N-acriloilmorfolina) ou uma combinação dos mesmos; ou uma combinações dos mesmos..

19. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o polímero solúvel em água compreende uma molécula PEG.

20. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a molécula PEG é um PEG linear.

21. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a molécula PEG é um PEG ramificado.

22. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o polímero solúvel em água compreende um polissacarídeo.

23. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo compreende dextrano, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico (HA), amilose, heparina, sulfato de heparano (HS), dextrina ou hidroxietil-amido (HES).

24. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o lipídio compreende um ácido graxo.

25. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o ácido graxo compreende de cerca de 6 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 20 átomos de carbono, de cerca de 6 a cerca de 18 átomos de carbono, de cerca de 20 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 26 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 24 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 22 átomos de carbono, de cerca de 12 a cerca de 20 átomos de carbono, ou de cerca de 12 a cerca de 18 átomos de car-

bono.

26. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o ácido graxo é um ácido graxo saturado.

27. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a proteína compreende uma albumina, uma transferrina ou uma transtirretina.

28. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante compreende um agonista TLR.

29. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a proteína compreende um anticorpo ou seus fragmentos de ligação.

30. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou seus fragmentos de ligação compreendem uma porção Fc de um anticorpo.

31. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende um peptídeo XTEN, um polímero de ácido homocínico em glicina (HAP), um polipeptídeo PAS, um polipeptídeo semelhante a elastina (ELP), um peptídeo CTP ou um polímero de proteína semelhante a gelatina (GLK).

32. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante está indiretamente ligada a ao pelo menos um aminoácido não natural da IL-15 modificada por meio de um ligante.

33. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o ligante compreende um ligante homobifuncional, um ligante hetero-bifuncional, um

ligante de comprimento zero, um ligante dipeptídeo clivável ou não clivável, um grupo maleimida, um espaçador ou uma combinação destes.

34. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda uma modificação na posição de resíduo N71, N72 ou N77, em que as posições de resíduo correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

35. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a modificação melhora uma condição CMC e/ou potência.

36. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 é modificado compreende ainda uma modificação no resíduo 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 ou F110, em que a modificação é para melhorar a extensão da meia-vida.

37. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o polímero da IL-15 modificado compreende ainda uma modificação em:

resíduo D22, A23, T24, L25, Y26, L44, E46, Q48, V49, E53, E89, E90 ou E93, em que a modificação prejudica a interação com IL-15R α ;

resíduo N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 ou N72, em que a modificação prejudica a interação com IL-15R β ;

resíduo V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 ou S114, em que a modi-

ficação prejudica a interação com IL-15R γ ; ou

uma combinação desses.

38. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que a modificação é para um aminoácido natural ou um aminoácido não natural.

39. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a diminuição na afinidade de ligação é de cerca de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou 100% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 de tipo selvagem.

40. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a diminuição na afinidade de ligação é de cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes para IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem.

41. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado é:

um fragmento funcionalmente ativo de um polipeptídeo da IL-15 de comprimento total;

um polipeptídeo da IL-15 recombinante; ou

polipeptídeo da IL-15 humana recombinante.

42. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma deleção N-terminal, uma deleção C-terminal ou uma combinação desses.

43. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a deleção N-terminal compreende a deleção dos primeiros 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 ou 30 resíduos do N-terminal, em que as posições dos resíduos se referem às posições na SEQ ID NO: 1.

44. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a deleção C-terminal compreende a deleção dos últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ou mais resíduos do C-terminal, em que as posições dos resíduos se referem às posições na SEQ ID NO: 1.

45. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado com a diminuição da afinidade de ligação à IL-15R α é capaz de expandir a célula CD8 + efetora virgem de tratamento e de memória, célula Natural Assassina (NK), as populações de células T Natural Assassina (NKT) ou uma combinação dessas.

46. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a porção conjugada ou o aminoácido não natural prejudica ou bloqueia a ligação da IL-15 com o IL-15R α .

47. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante ou o aminoácido não natural estende a meia-vida, mas não prejudica ou bloqueia a ligação da IL-15 com receptores IL-15.

48. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante ou o aminoácido não natural aumenta a ligação da IL-15 ao IL-15R β e/ou IL-15R γ .

49. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de

que a meia-vida aumentada da IL-15 é de pelo 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 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais do que a meia-vida do plasma da IL-15 do tipo selvagem.

50. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a meia-vida aumentada da IL-15 é de cerca de 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 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

51. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1a 3, caracterizado pelo fato de que a ativação da célula CD8+ efetora virgem de tratamento e a célula de memória, célula Natural Assassina (NK), ou a população de células T Naturais Assassinas (NKT) através do complexo IL-15R $\beta\gamma$ pelo polipeptídeo IL-15 modificado mantém uma potência significativa de ativação da referida população celular em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem.

52. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a potência de sinalização do receptor do polipeptídeo da IL-15 modificado para o complexo IL-15R $\beta\gamma$ é maior que uma potência de sinalização do receptor do polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem para o complexo IL-15R $\beta\gamma$.

53. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a potência de sinalização do receptor do polipeptídeo da IL-15 modificado para o complexo IL-15R $\beta\gamma$ é menor que uma potência de sinalização do receptor do polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem para o complexo IL-

15R β γ .

54. Polipeptídeo da interleucina 15 (IL-15) isolado e modificado, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um aminoácido não natural está em uma posição de resíduo que diminui seletivamente a afinidade de ligação do polipeptídeo da IL-15 modificado com receptor β da interleucina 2/interleucina 15 (IL-2/IL-15R β), receptor γ da interleucina 15 (IL-15R γ), ou uma combinação desses, mas não afeta a interação com o receptor α da interleucina 15 (IL-15R α).

55. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado tem uma afinidade de ligação diminuída para IL-15R β .

56. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre N1, N4, S7, D8, K11, D61, T62, E64, N65, I68, L69 e N72, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

57. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre:

N4, S7, K11 e D61;
D8, E64, N65, I68 e N72; ou
N1, T62 e L69.

58. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado tem uma afinidade de ligação diminuída para IL-15R γ .

59. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo

com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre V3, I6, K10, E28, S29, D30, V31, H32, P33, S102, V104, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114 em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

60. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a posição do resíduo de pelo menos um aminoácido não natural é selecionada dentre:

V3, K10, S29, D30, H32, H105, Q108, M109, I111, N112, T113 e S114;

E28, P33, S102 e V104; ou

I6 e V31.

61. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 60, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende uma modificação para melhorar a extensão da meia-vida.

62. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a modificação é na posição do resíduo 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 ou F110, em que as posições dos resíduos correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID NO: 1.

63. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 62, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado compreende ainda uma modificação na posição de resíduo N71, N72 ou N77, em que as posições de resíduo correspondem às posições estabelecidas na SEQ ID

NO: 1.

64. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado pelo fato de que a modificação é para um aminoácido não natural.

65. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado pelo fato de que a modificação é para um aminoácido natural.

66. Polipeptídeo da IL-15 isolado e modificado, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a modificação melhora uma condição CMC e/ou potência.

67. Conjugado da interleucina 15 (IL-15) caracterizado pelo fato de que compreende:

um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado; e

uma porção conjugante que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em uma posição de aminoácidos selecionada de N4, E46, D61, E64, N65, I68 e L69, em que a numeração de resíduos de aminoácidos corresponde à SEQ ID NO: 1.

68. Conjugado da IL-15, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o resíduo de aminoácidos é modificado para cisteína ou lisina.

69. Conjugado da IL-15, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o resíduo de aminoácido selecionado de N4, E46, N65 e L69 é ainda modificado para um aminoácido não natural.

70. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende:

um polipeptídeo da IL-15 modificado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66 ou um conjugado da IL-15 como definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 69; e

um excipiente farmacêuticamente aceitável.

71. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 70, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é formulada para administração parenteral.

72. Método para tratar uma doença ou uma condição proliferativa em um indivíduo que precisa do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo da IL-15 modificado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, ou um conjugado da IL-15, como definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 69.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que a doença ou a condição é um câncer.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer de tumor sólido.

75. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que o câncer de tumor sólido é câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de cérebro, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer de olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer de rim, câncer de pulmão, melanoma, câncer de ovário, câncer pancreático ou câncer de próstata.

76. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o câncer é uma malignidade hematológica.

77. Método, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a malignidade hematológica é a leucemia linfocítica crônica (CLL), o linfoma linfocítico pequeno (SLL), o linfoma folicular (FL), o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), o linfoma de células do manto (MCL), a macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiplo, linfoma de células B da zona marginal extranodal, linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grau não Burkitt, linfoma mediastinal de células B

primário (PMBL), linfoma imunoblástico de grandes células, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitário, linfoma esplênico da zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma de derrame primário ou granulomatose linfomatoide.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 77, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a administração de um agente terapêutico adicional.

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 e o agente terapêutico adicional são administrados simultaneamente.

80. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 e o agente terapêutico adicional são administrados sequencialmente.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 é administrado antes do agente terapêutico adicional.

82. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo da IL-15 modificado ou o conjugado da IL-15 é administrado após a administração do agente terapêutico adicional.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 82, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

84. Método de expansão da célula T efetora (Teff), da célula T de memória (Tmem) e das populações de célula Natural Assassina (NK), caracterizado pelo fato de que compreende:

a) colocar uma célula em contato com um polipeptídeo da

IL-15 modificado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66 ou um conjugado da IL-15 como nas reivindicações 67 a 69; e

b) interagir a IL-15 com as subunidades IL-15R β e IL-15R $\beta\gamma$ para formar um complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$;

em que o conjugado da IL-15 tem uma menor afinidade com a subunidade IL-15R α , e em que o complexo IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ estimula a expansão das células Teff, Tmem e NK.

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula eucariótica.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 85, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de mamífero.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 86, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula humana.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 87, caracterizado pelo fato de que o conjugado da IL-15 compreende um polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado e uma porção conjugada que se liga ao polipeptídeo da IL-15 isolado e purificado em um resíduo de aminoácidos selecionado de N4, E46, N65 e L69, em que a numeração de resíduos de aminoácidos corresponde à SEQ ID NO: 1.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 88, caracterizado pelo fato de que a diminuição na afinidade é de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de diminuição na afinidade de ligação com a IL-15R α em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 88, caracterizado pelo fato de que a diminuição na afinidade à IL-15R α é de que cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 ve-

zes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes ou mais em relação a um polipeptídeo da IL-15 do tipo selvagem.

91. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 84 a 90, caracterizado pelo fato de que a porção conjugante prejudica ou bloqueia a ligação da IL-15 com a IL-15R α .

92. Kit caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo da IL-15 modificado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66, um conjugado da IL-15 como definido em qualquer uma das reivindicações 67 a 69 ou uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 70 a 71.

93. Kit caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido polinucleico que codifica um polipeptídeo da IL-15 modificado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 66.

FIG. 1

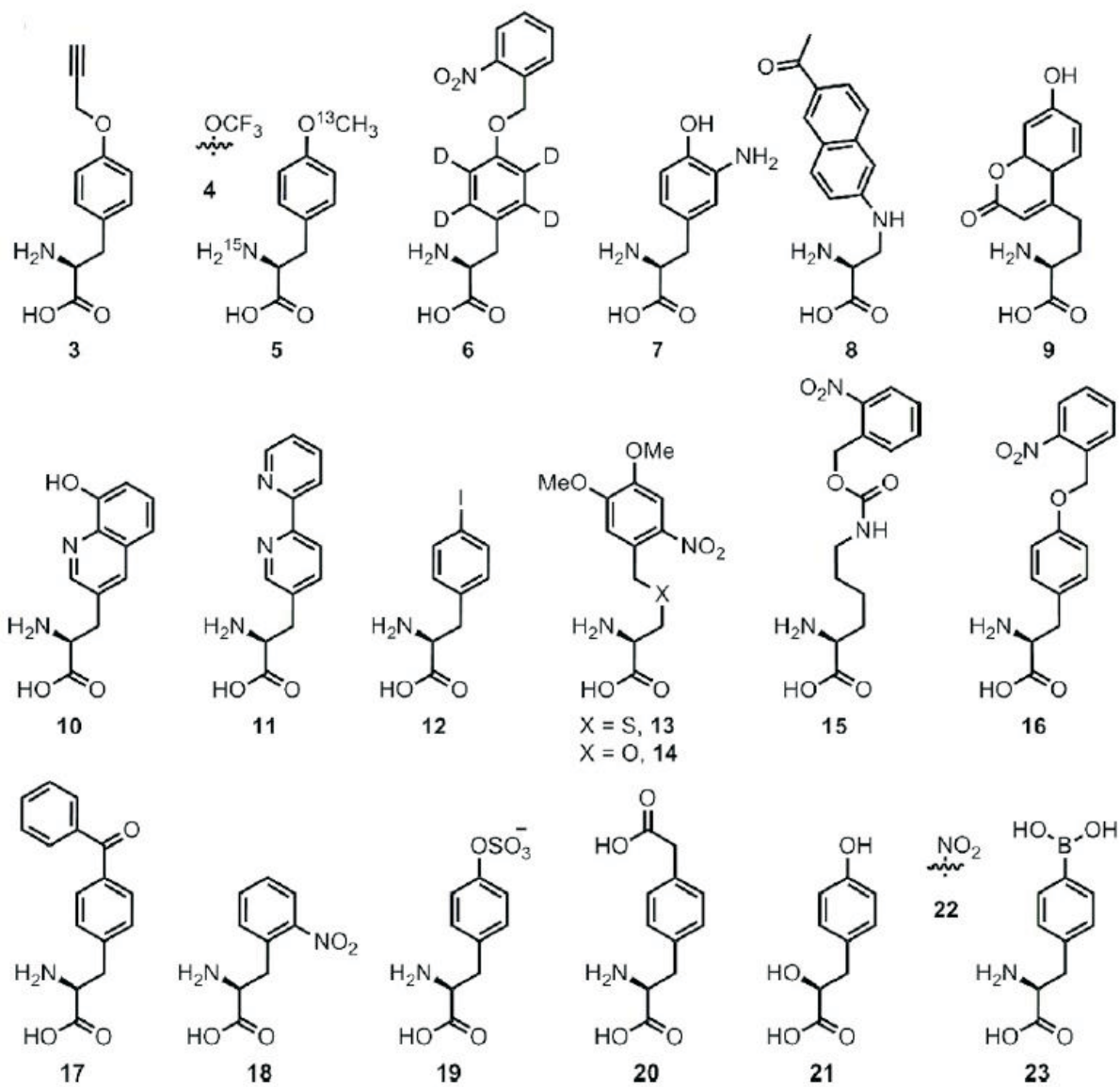


FIG. 2A

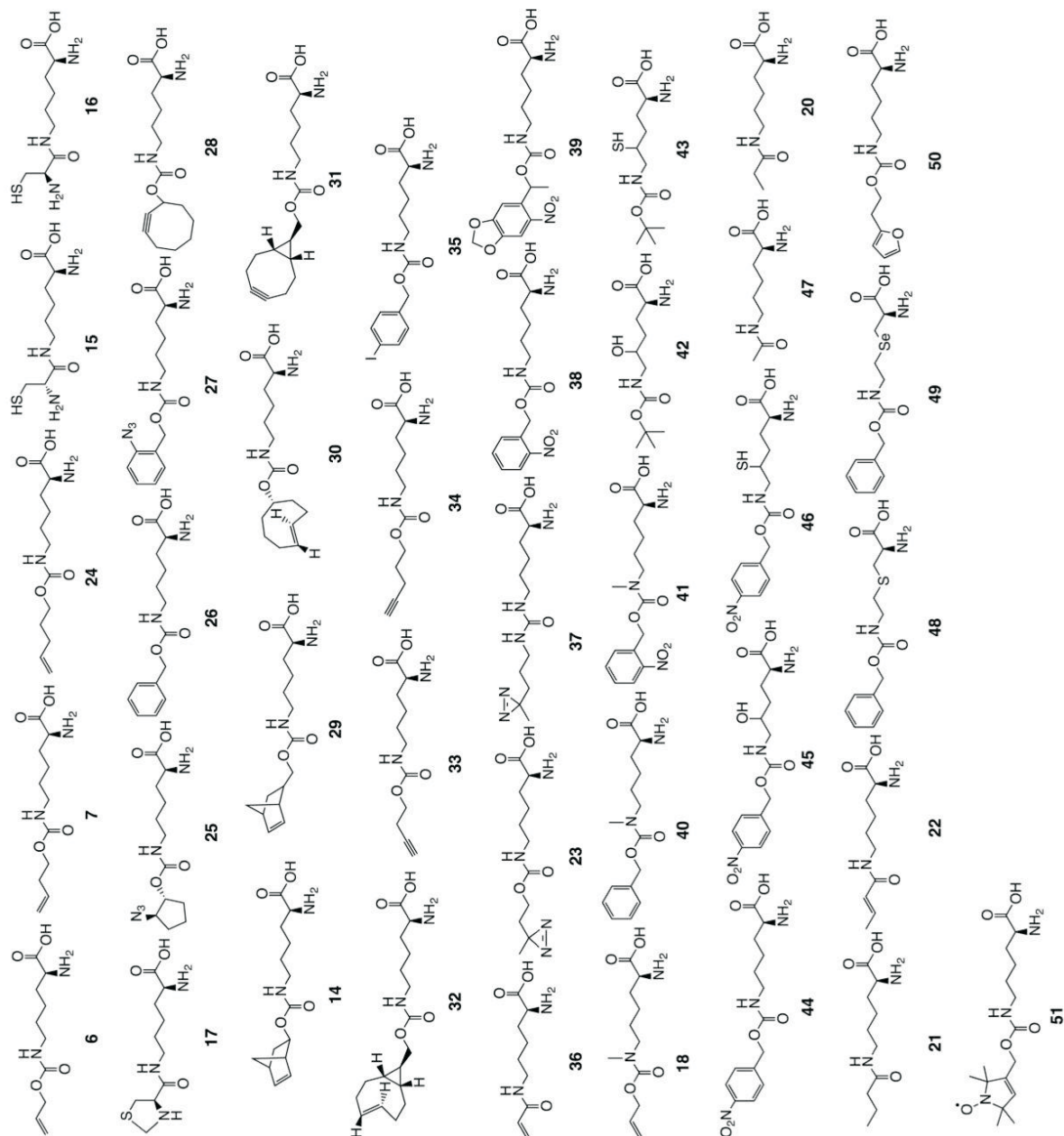


FIG. 2B

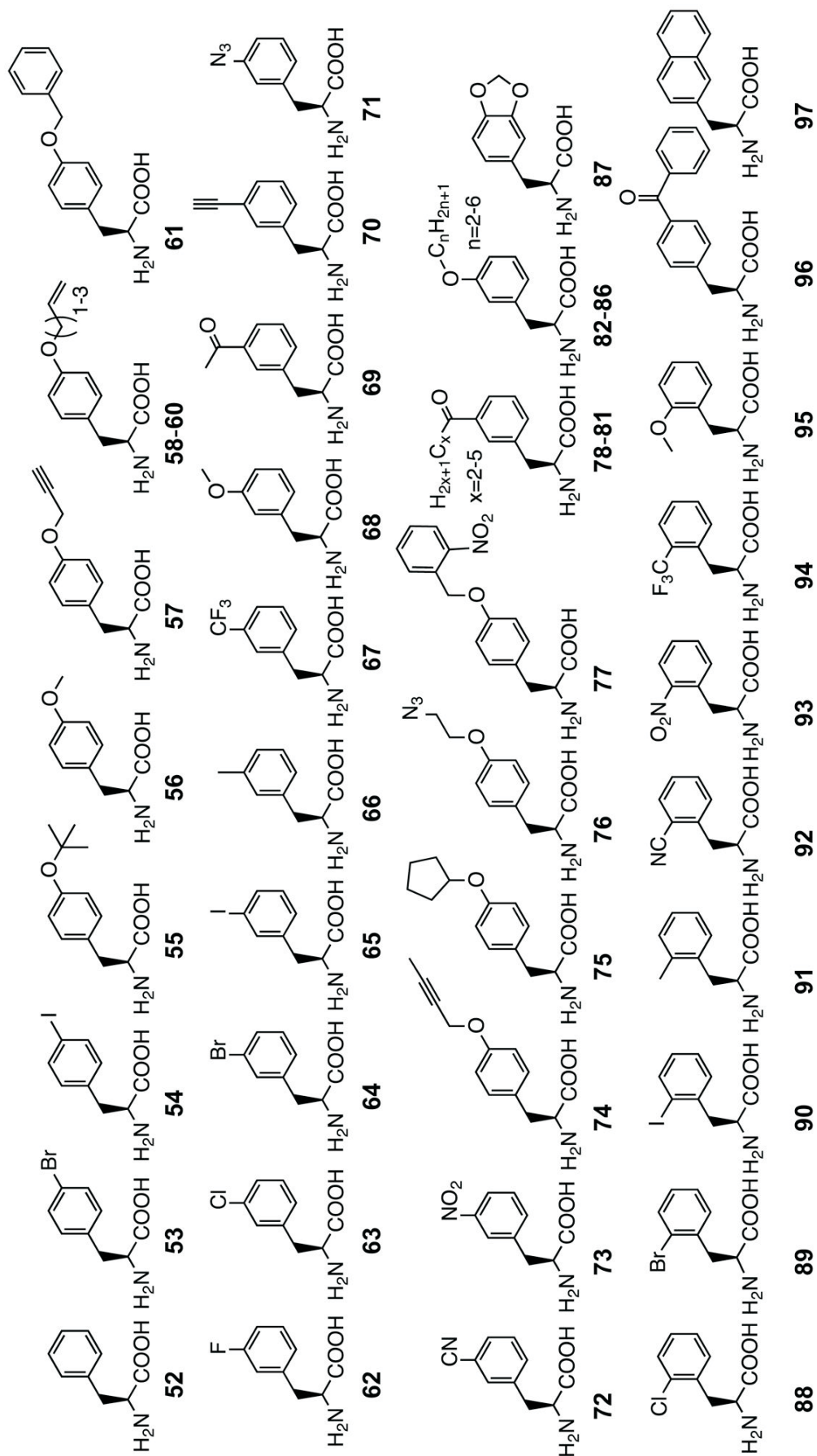


FIG. 3B

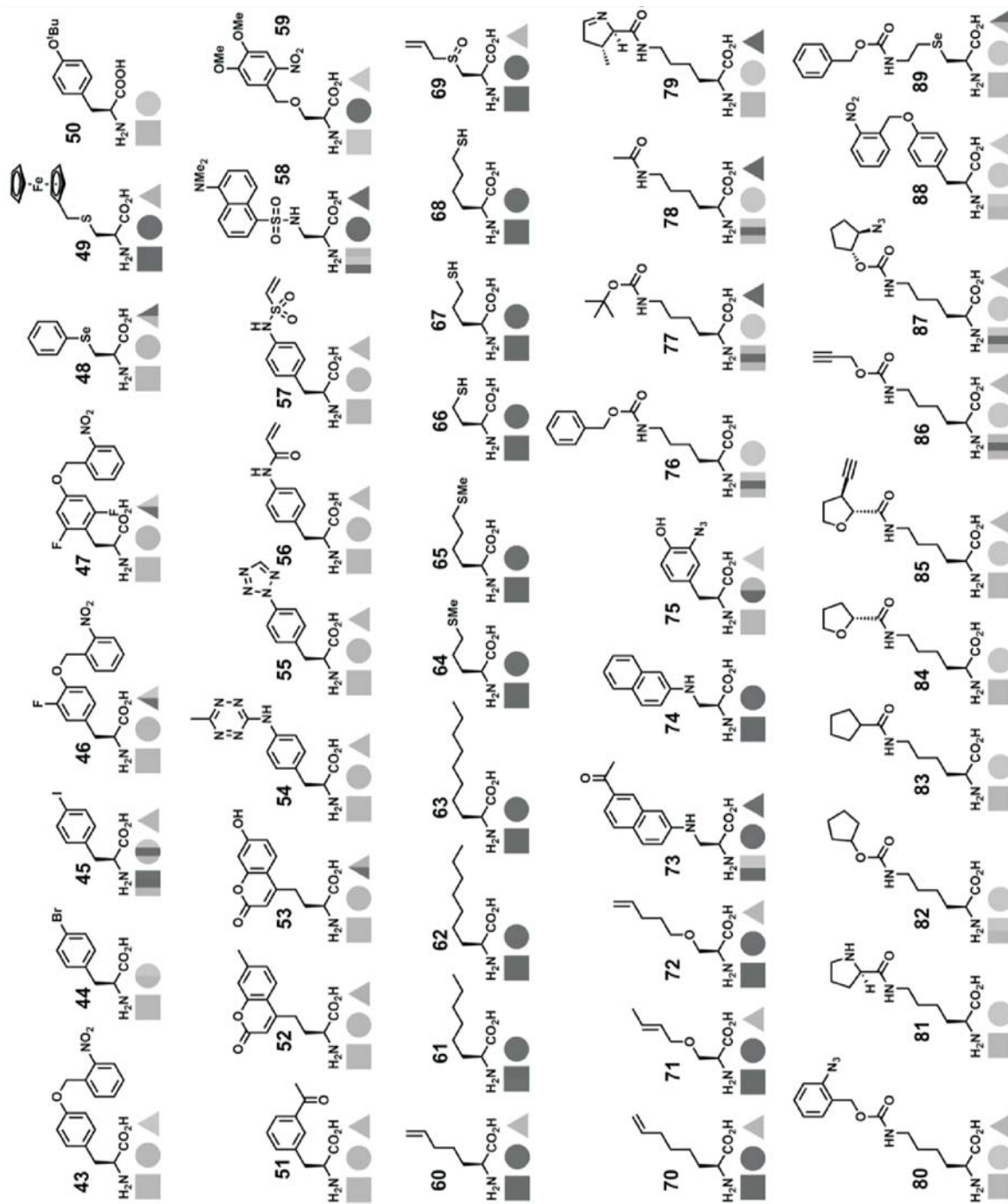


FIG. 3D

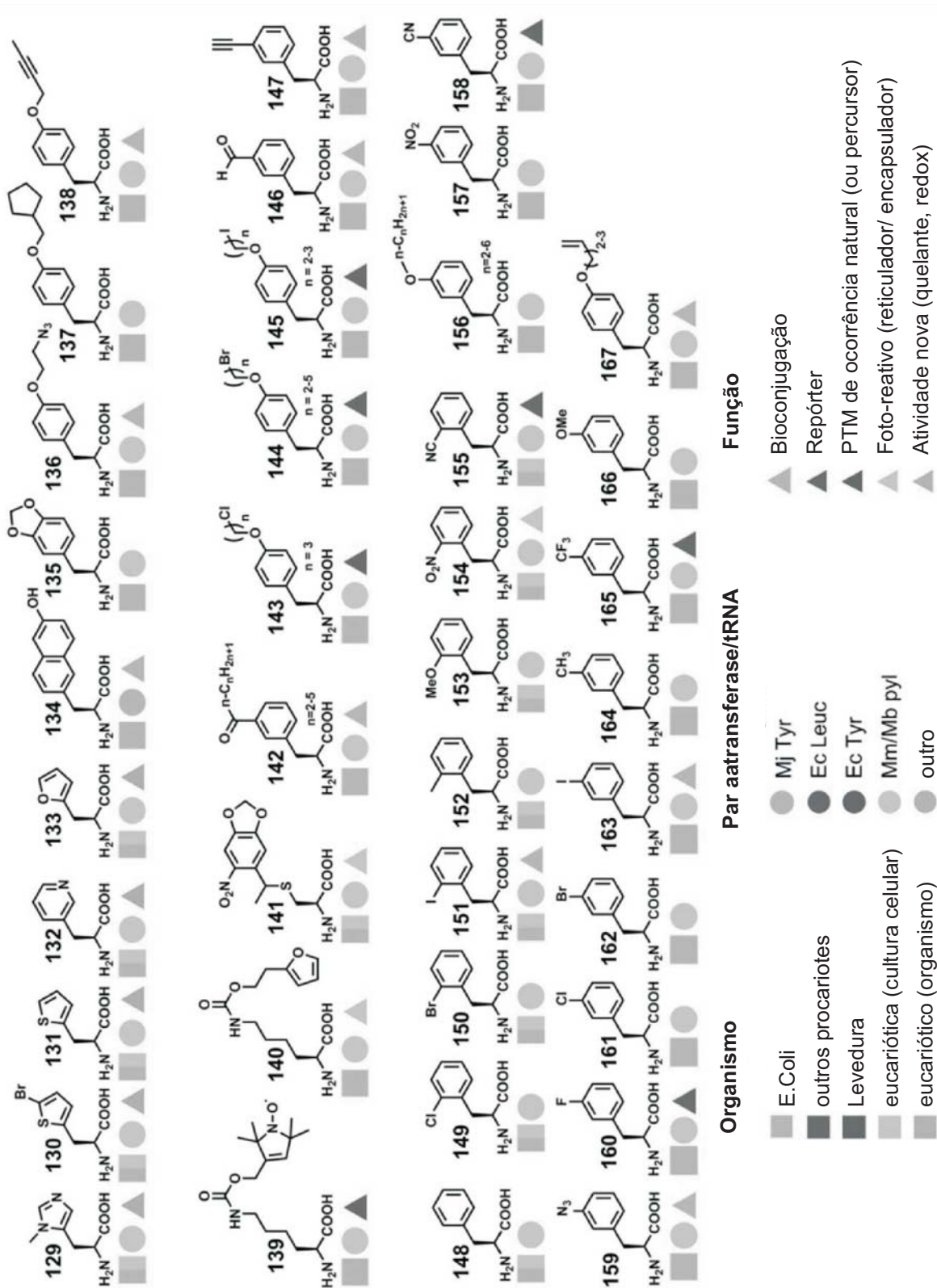


FIG. 4

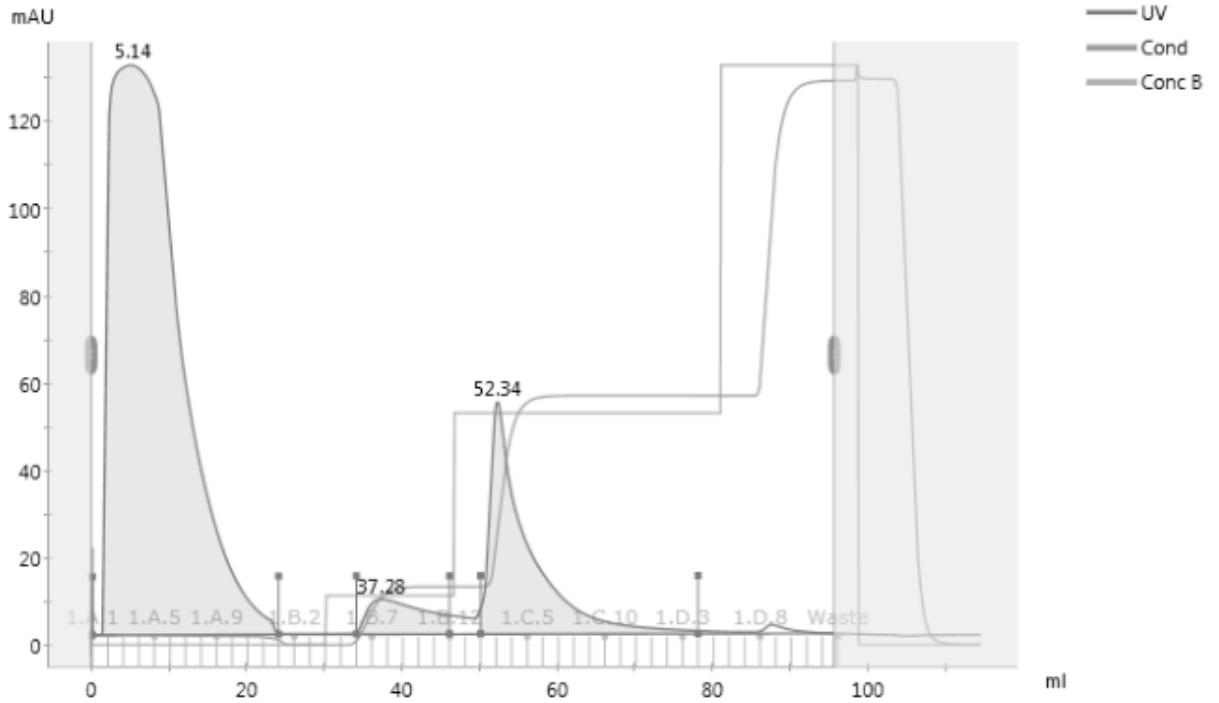


FIG. 5

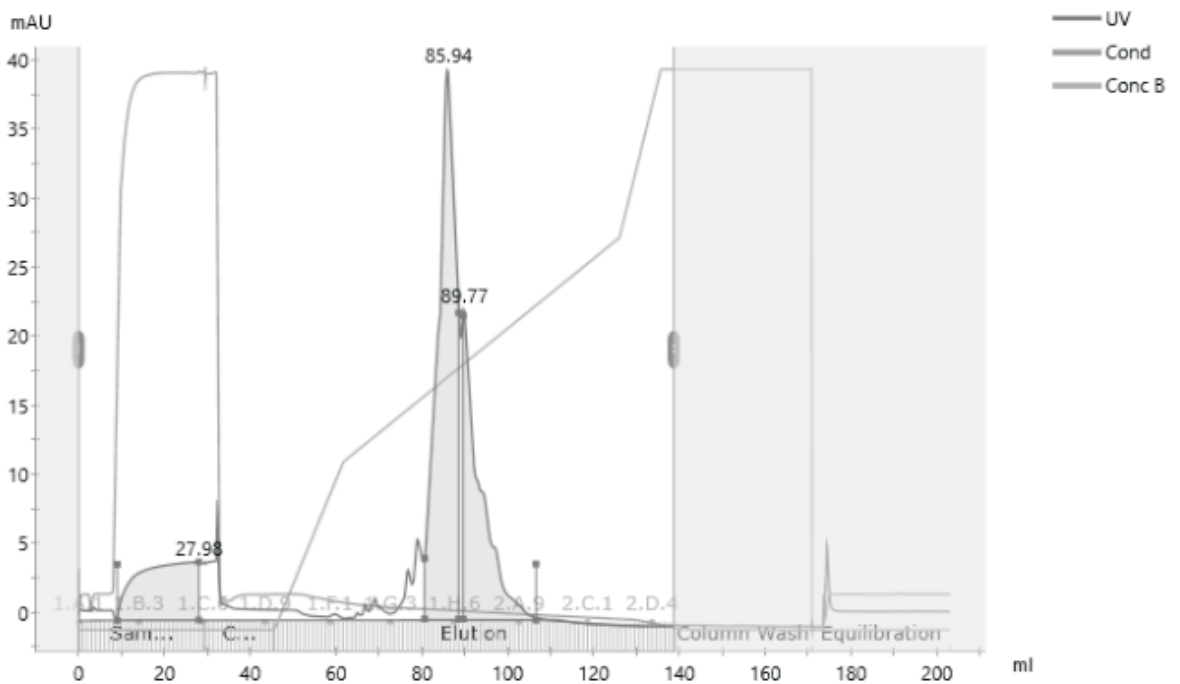


FIG. 6

Ocorrências estendidas de meia-vida

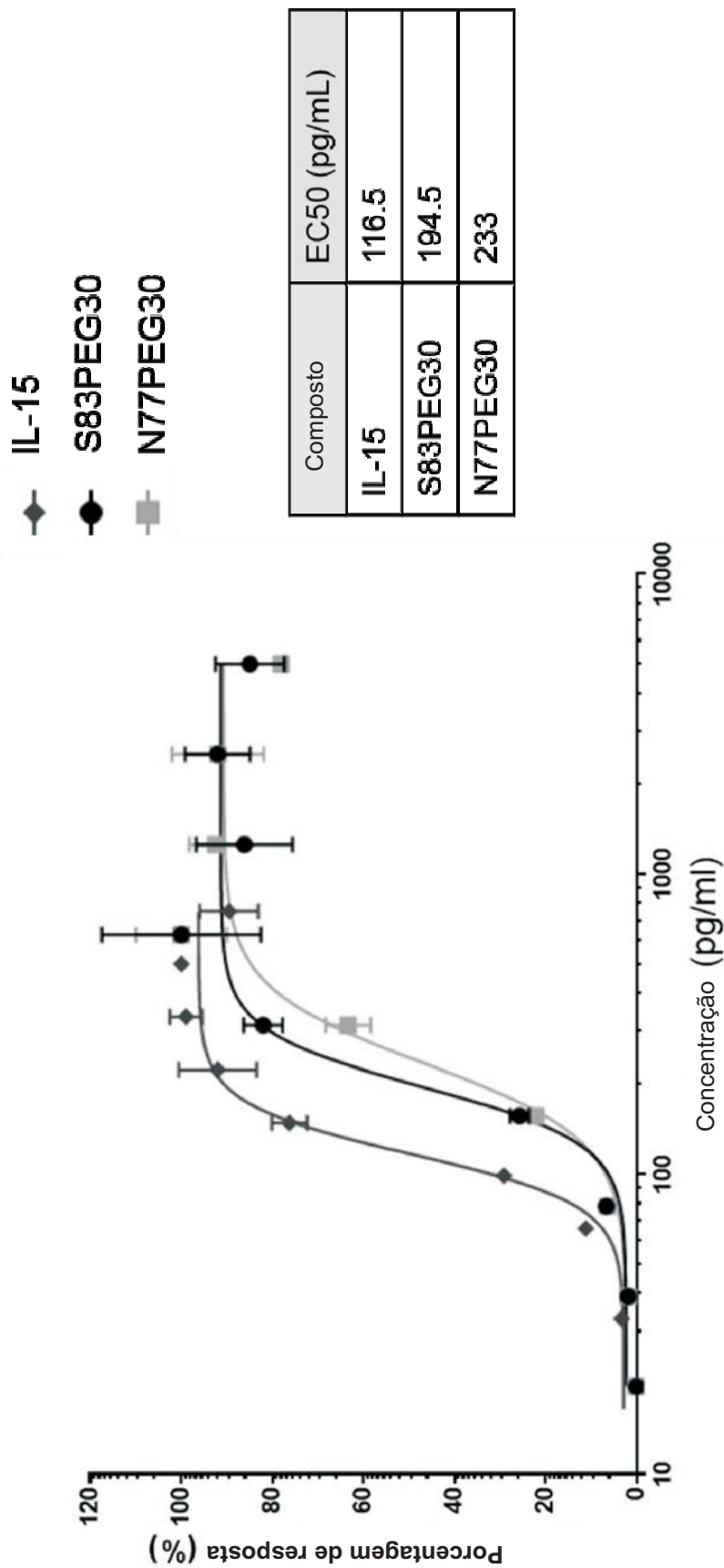


FIG. 7

Ocorrências "não alfa"

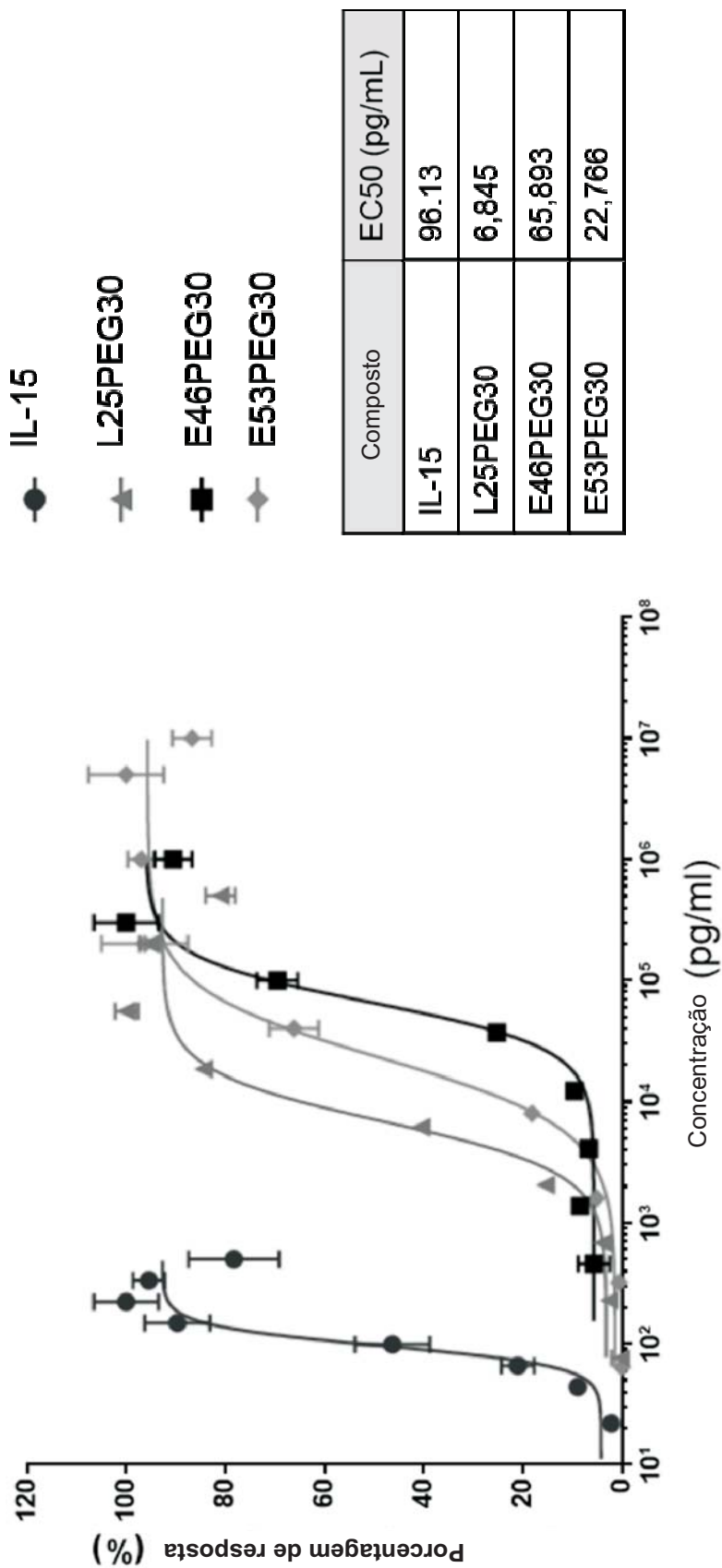
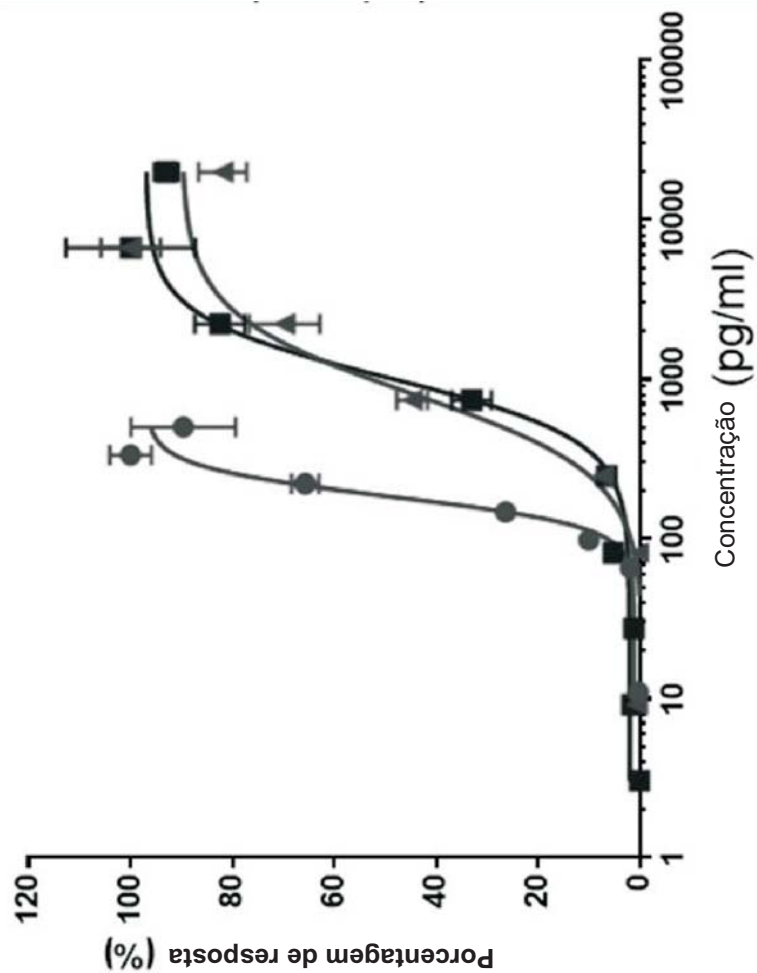


FIG. 8

Bioconjugação usando PEG diferente de tamanhos diferentes



Composto	EC50 (pg/mL)
IL-15	184.5
V49 PEG30	807.4
V49 PEG40b	1,019

FIG. 9A

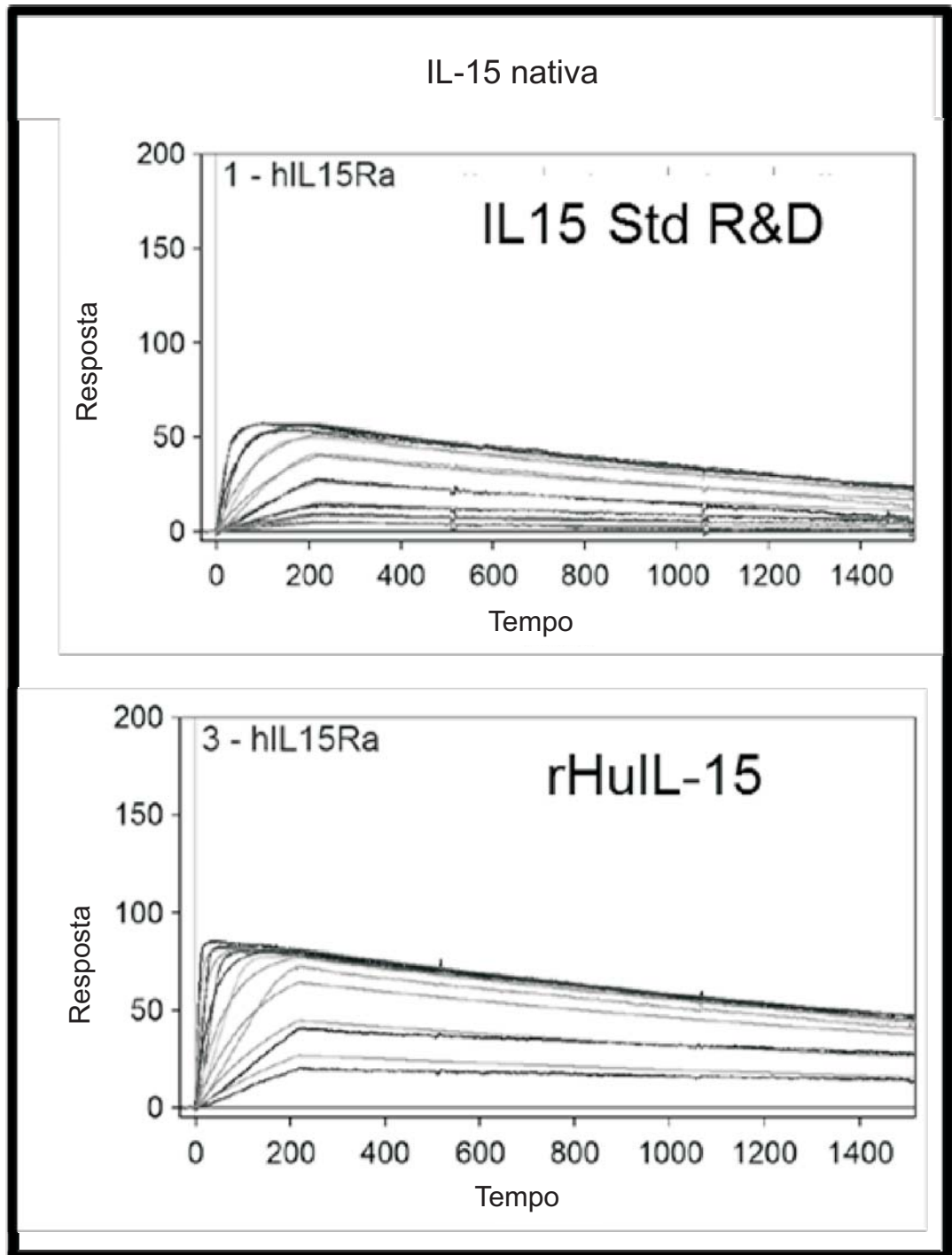


FIG. 9B

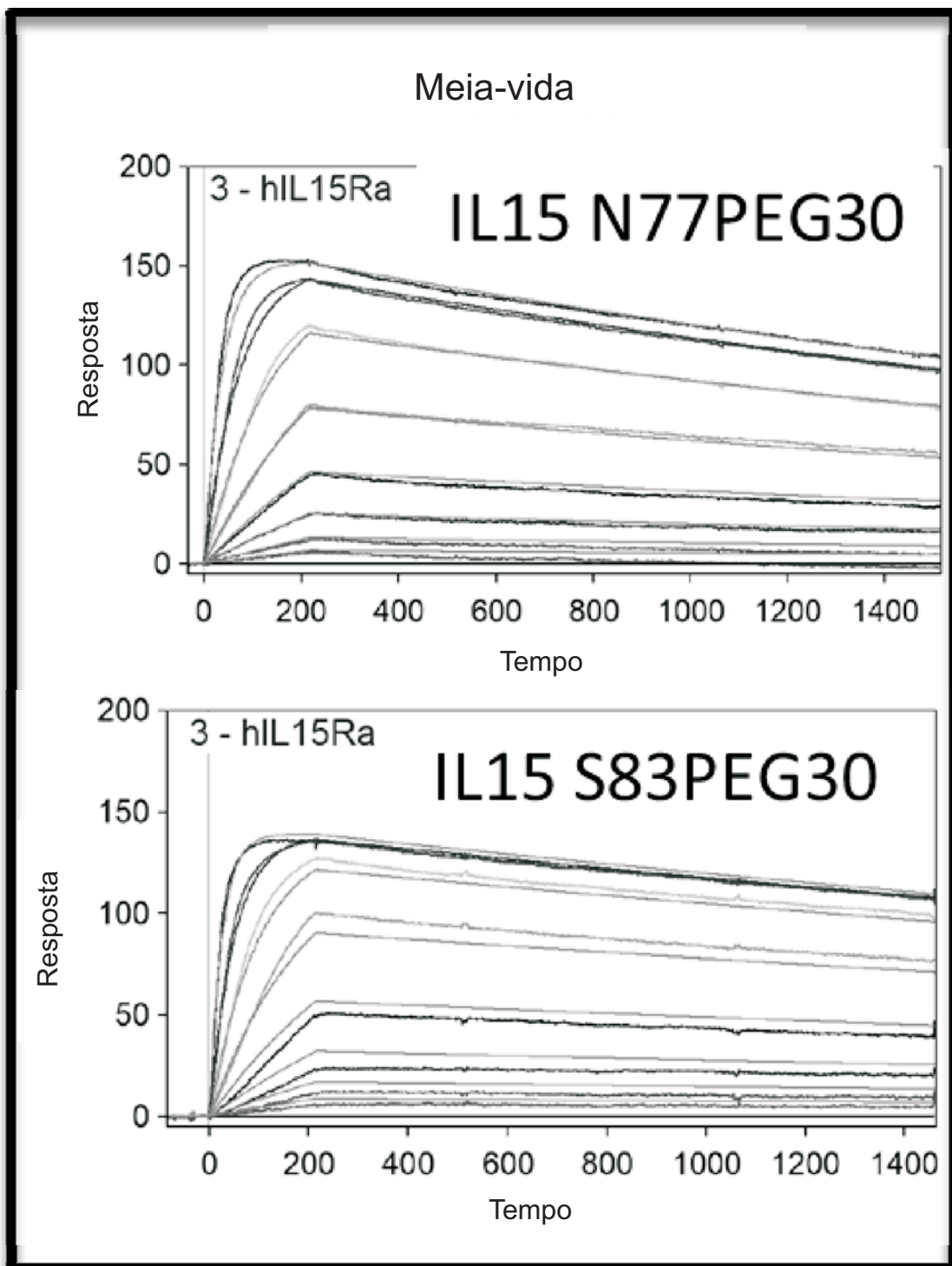


FIG. 9C

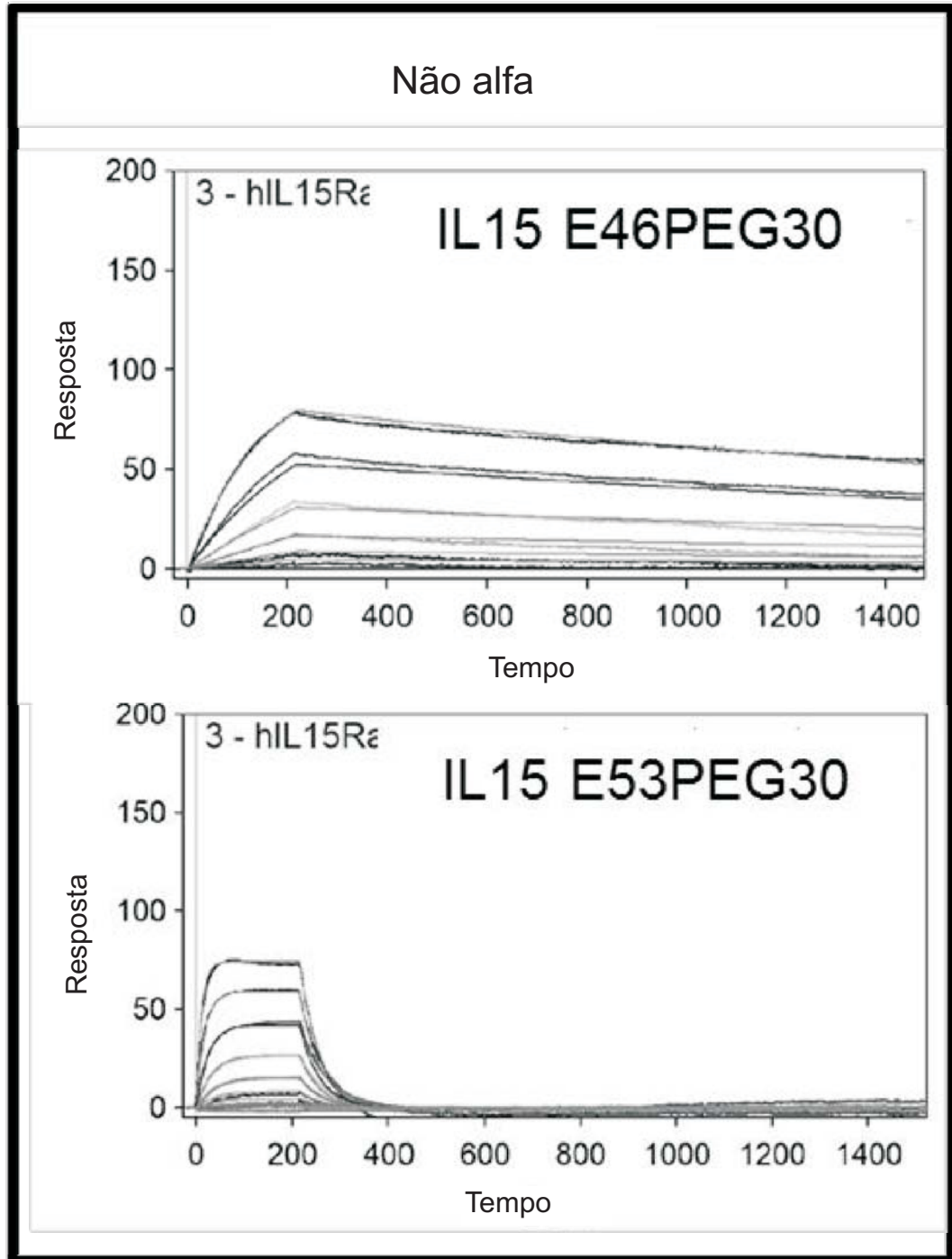


FIG. 10

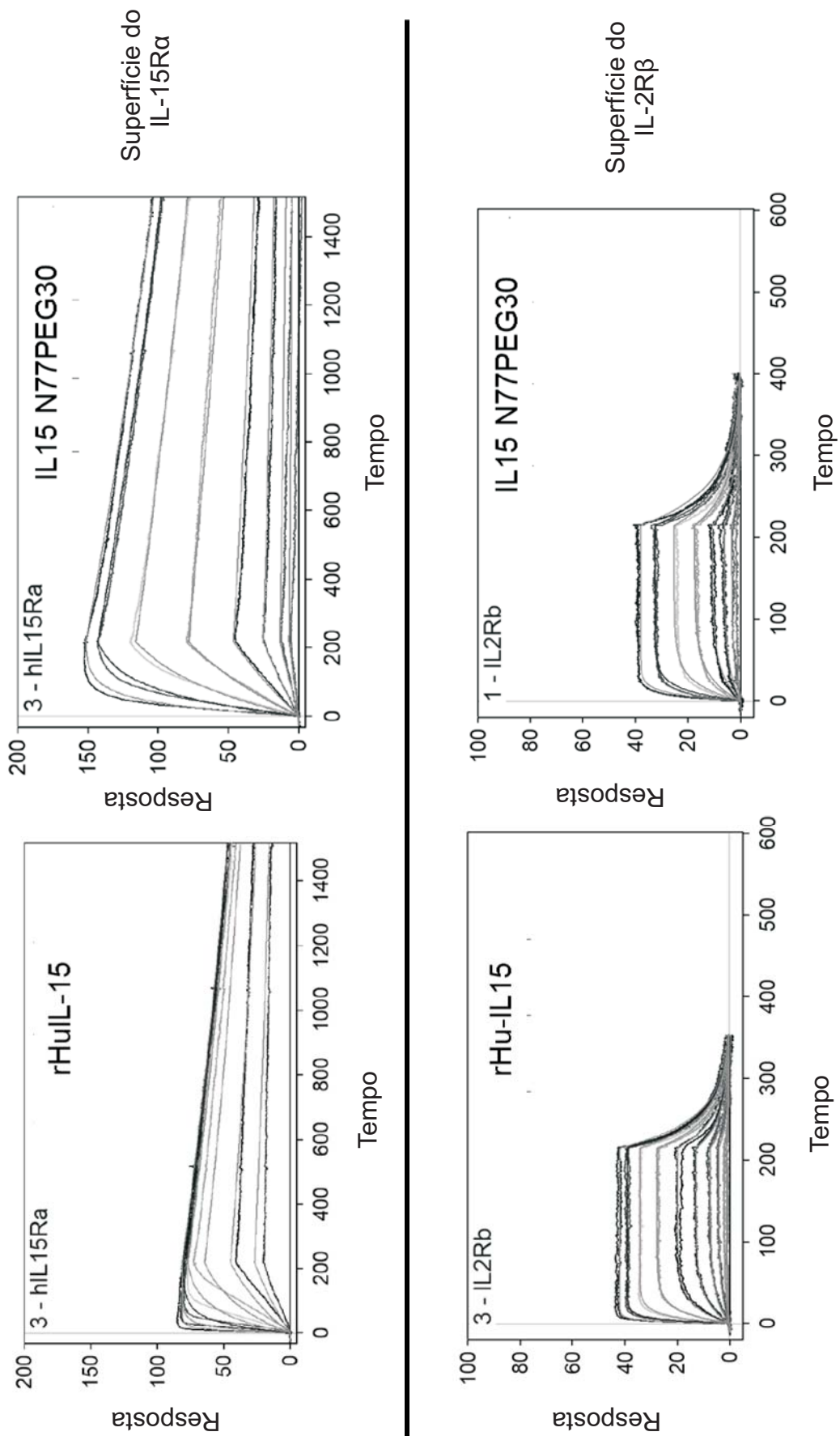


FIG. 11

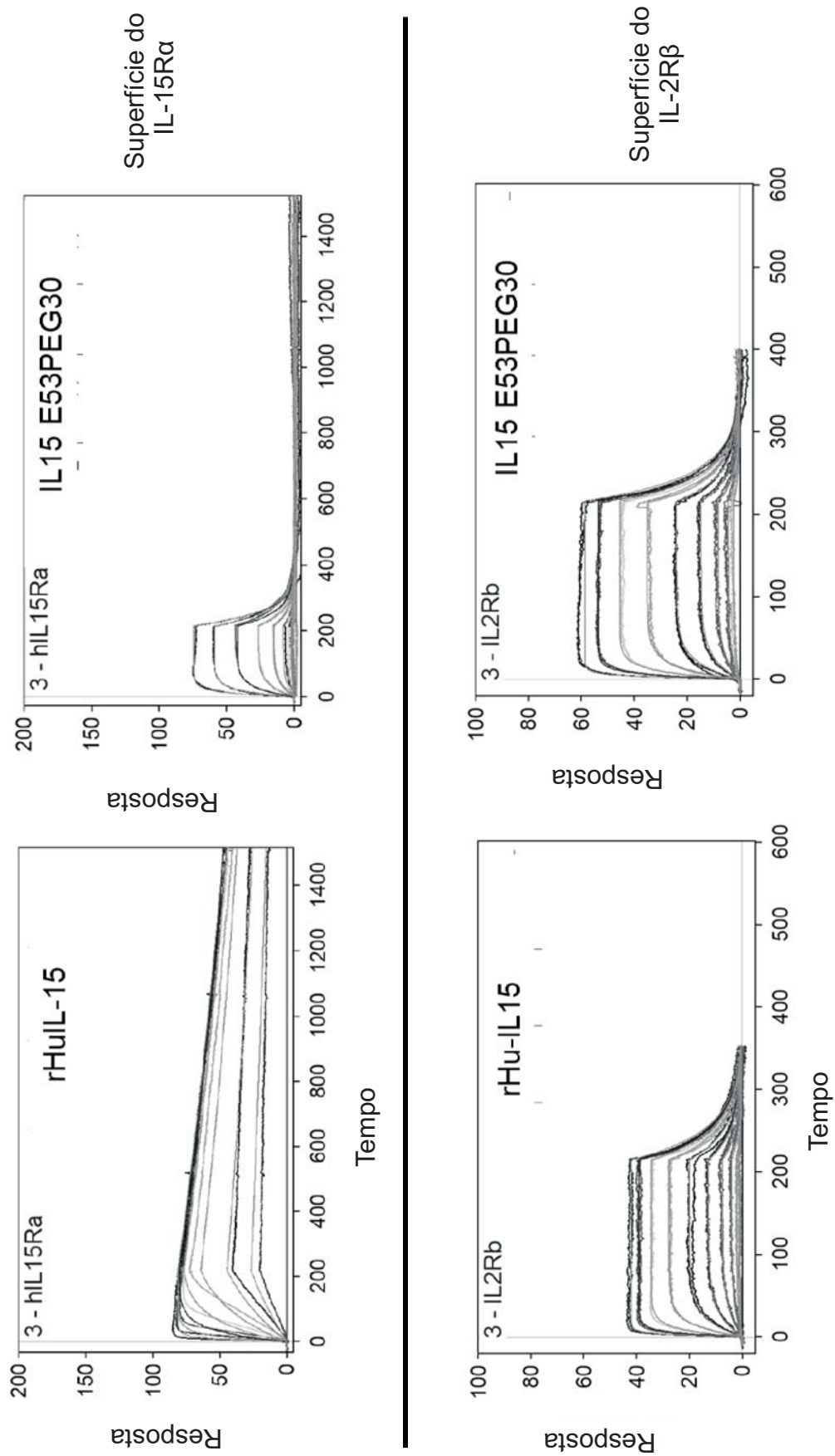


FIG. 12B

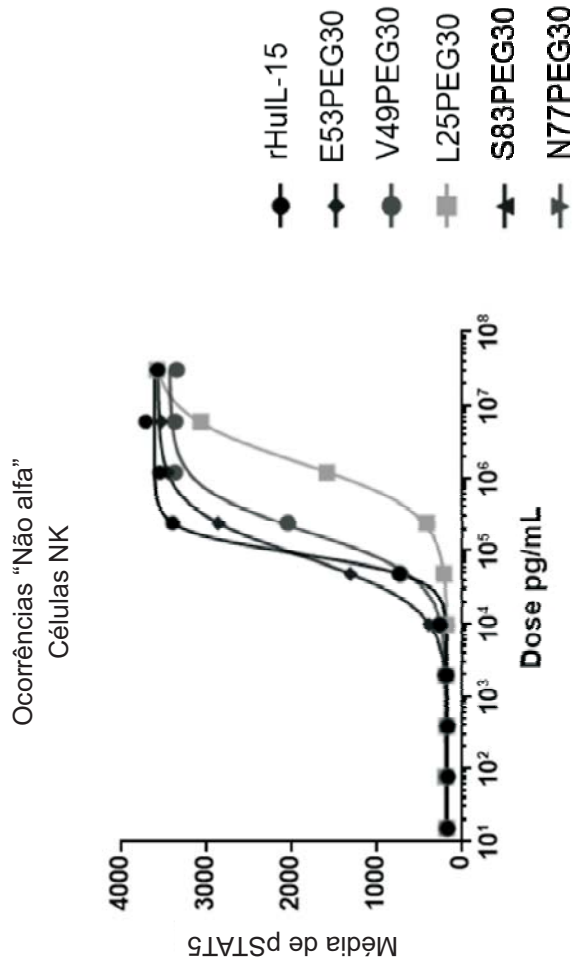
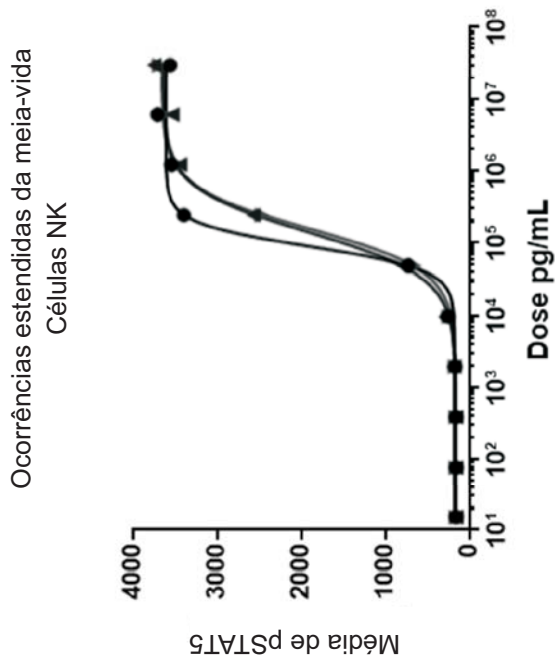


FIG. 12A



Células T CD8+

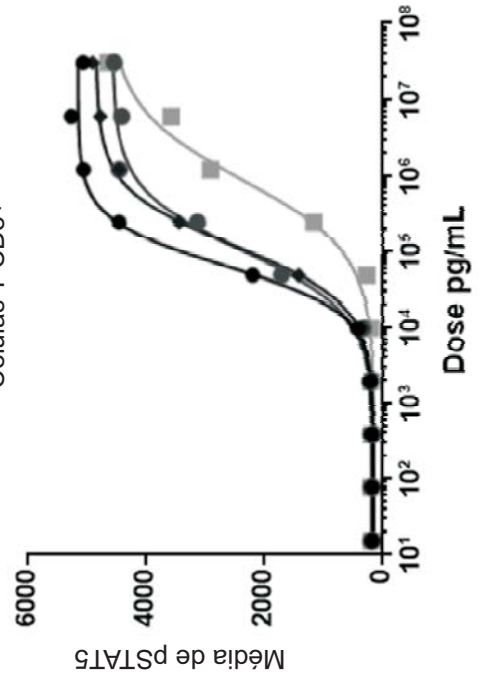


FIG. 12D

Células T CD8+

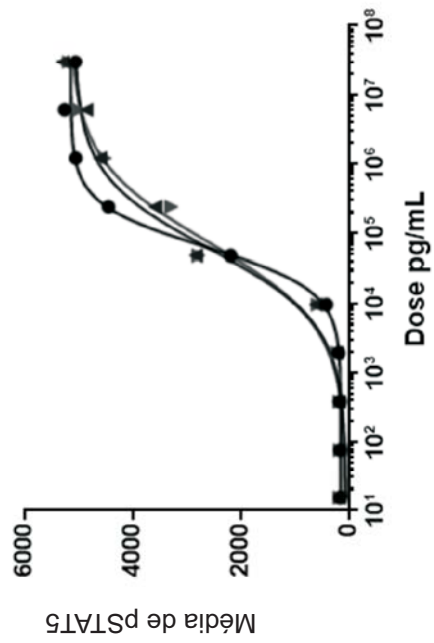


FIG. 12C

FIG. 13

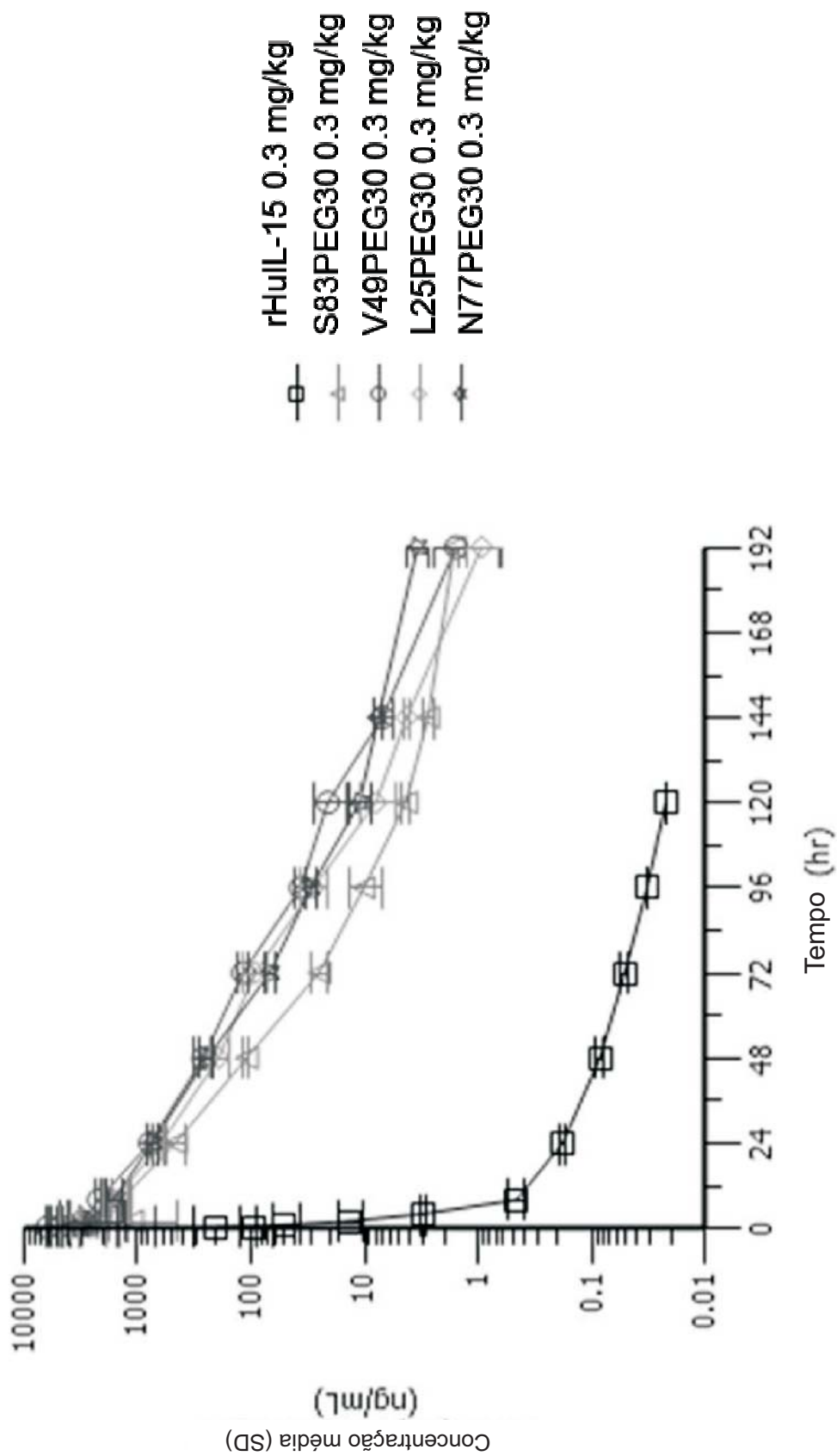


FIG. 14A

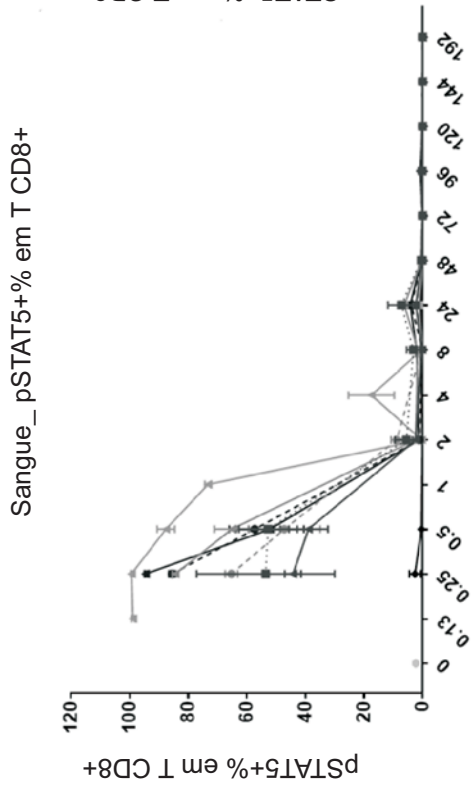
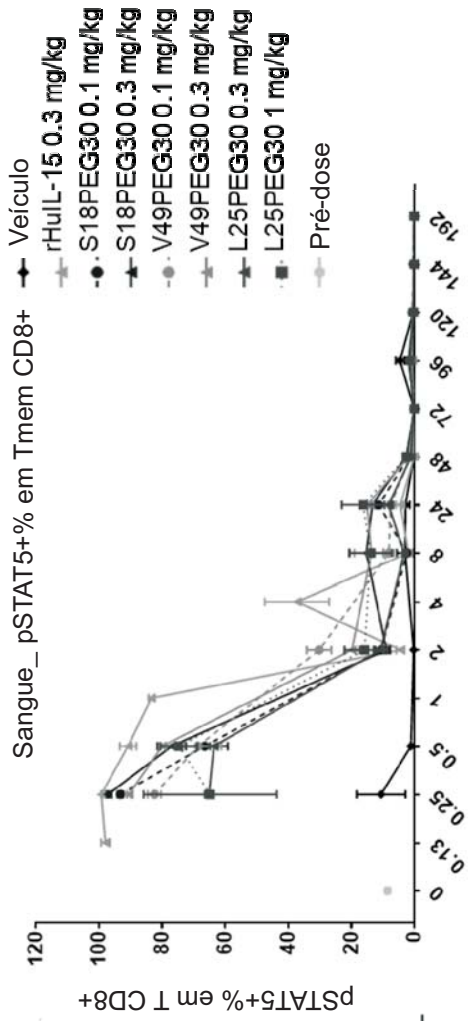


FIG. 14B



● Veículo
 ▲ rHuIL-15 0.3 mg/kg
 ● S18PEG30 0.1 mg/kg
 ▲ S18PEG30 0.3 mg/kg
 ● V49PEG30 0.1 mg/kg
 ▲ V49PEG30 0.3 mg/kg
 ● L25PEG30 0.3 mg/kg
 ▲ L25PEG30 1 mg/kg
 ○ Pré-dose

FIG. 14C

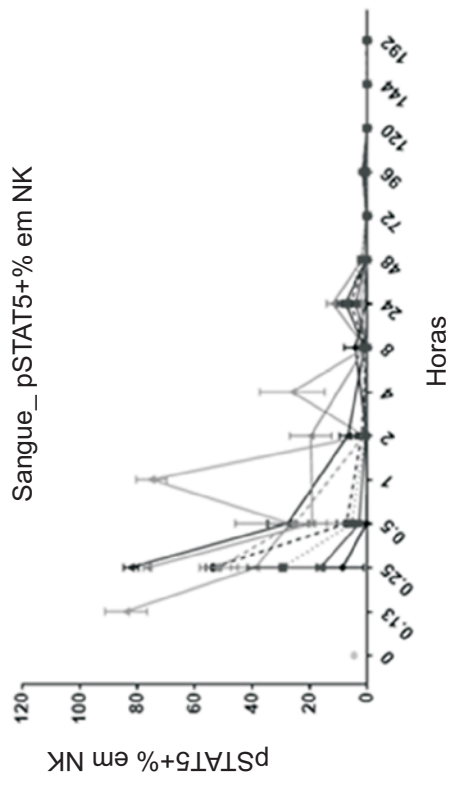


FIG. 14D

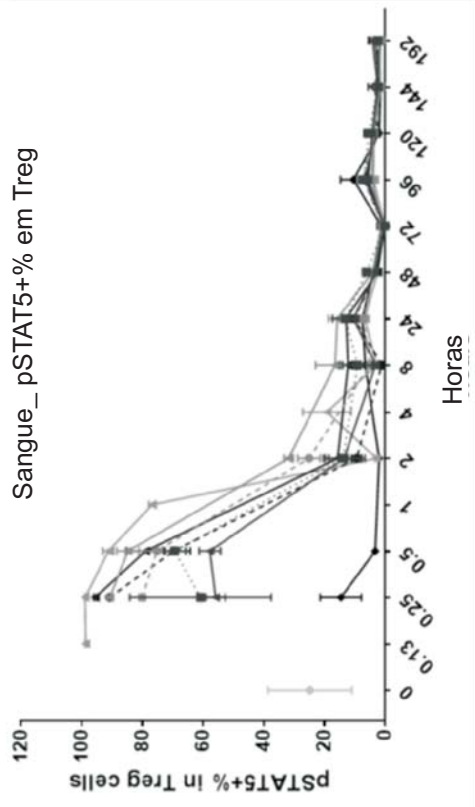


FIG. 15A

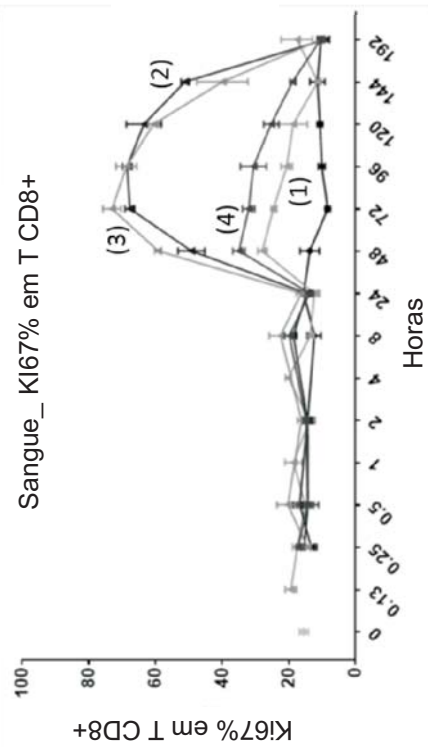


FIG. 15B

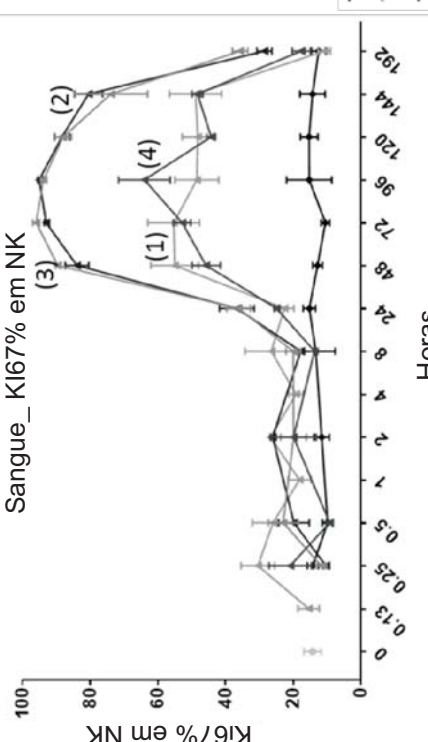


FIG. 15C

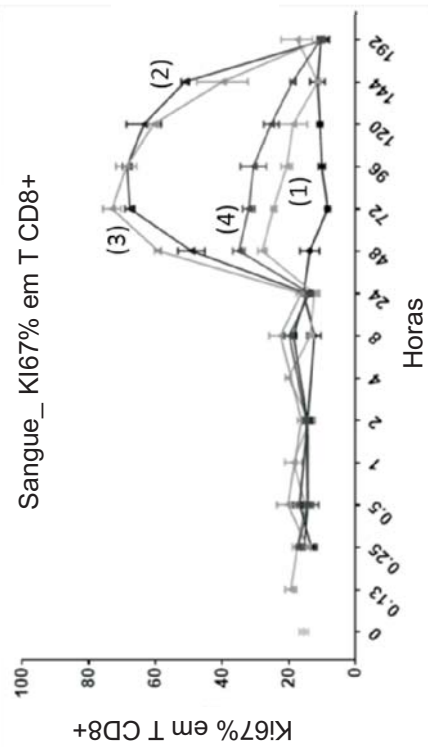
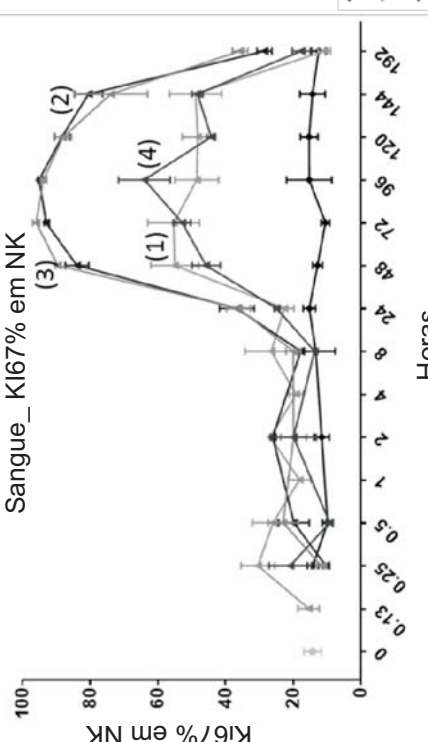


FIG. 15D



- ◆ Veículo (1)
- ▲ rHuIL-15 0.3 mg/kg (2)
- S18PEG30 0.3 mg/kg (3)
- ▼ V49PEG30 0.3 mg/kg (4)
- ◇ L25PEG30 0.3 mg/kg (5)
- Pré-dose

FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

FIG. 15D

FIG. 16B

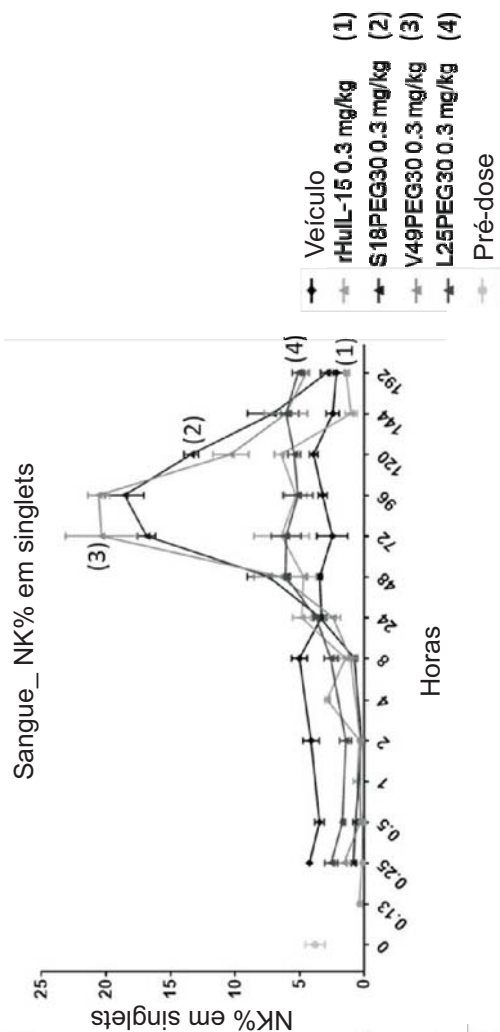


FIG. 16A

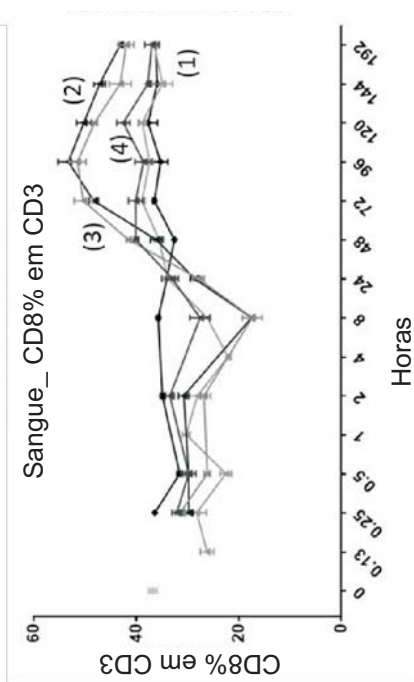
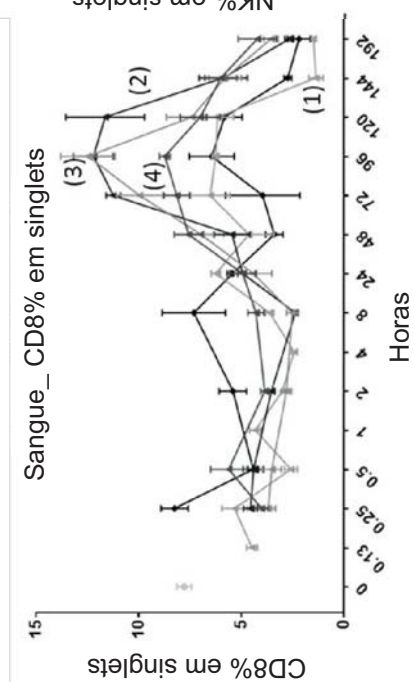


FIG. 16C

FIG. 17B

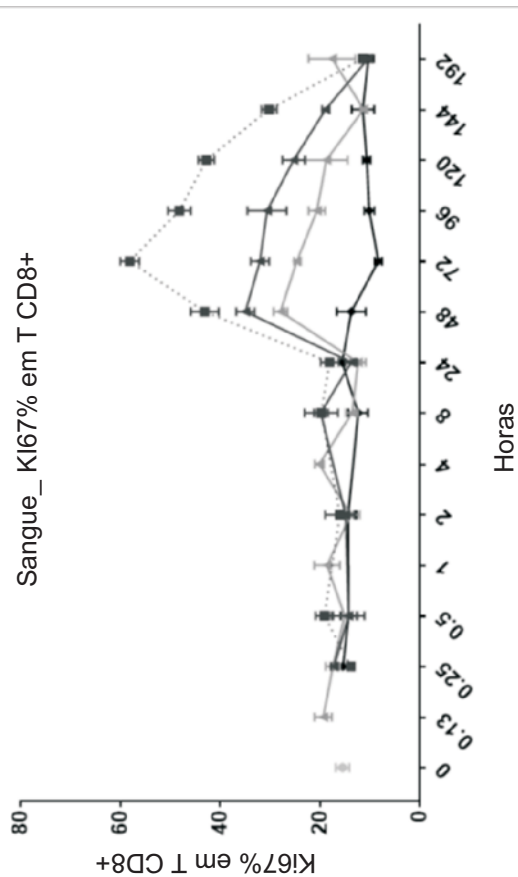
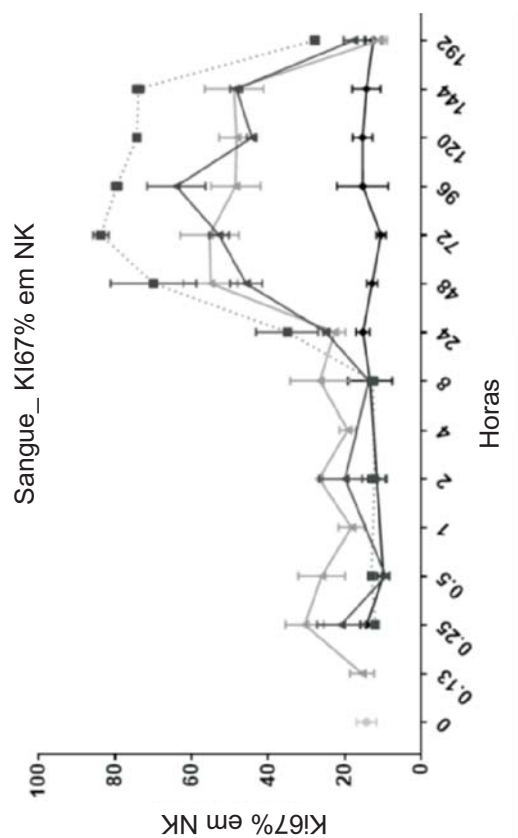


FIG. 17A



- Veículo
- rHuIL-15 0.3 mg/kg
- L25PEG30 0.3 mg/kg
- L25PEG30 1 mg/kg
- Pré-dose

RESUMO

Patente de Invenção: "**CONJUGADOS DA IL-15 E USOS DOS MESMOS**".

A presente invenção refere-se a conjugados da interleucina (IL) 15 e uso no tratamento de uma ou mais indicações. Também são descritas aqui composições farmacêuticas e kits compreendendo um ou mais conjugados da IL-15.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P248624 ListSeq.txt
- Data de Geração do Código: 20/08/2020
- Hora de Geração do Código: 15:43:26
- Código de Controle:
 - Campo 1: 2F07515EF289B4A3
 - Campo 2: 48D6C8A2431758CC