



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101743249 B

(45)授权公告日 2017.08.08

(21)申请号 200880024119.5

(22)申请日 2008.05.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101743249 A

(43)申请公布日 2010.06.16

(30)优先权数据
60/928,900 2007.05.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.01.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/005918 2008.05.09

(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/143794 EN 2008.11.27

(73)专利权人 阿尔托生物科学有限公司
地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 H·C·王 P·罗德 X·朱
K·韩

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.
C07K 14/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/0263857 A1, 2006.11.23,
US 2003/0180888 A1, 2003.09.25,
US 2004/0156826 A1, 2004.08.12,

审查员 张颖

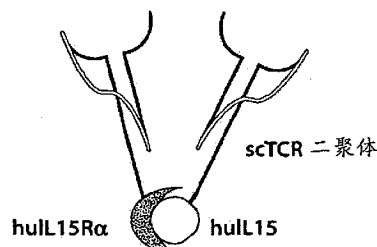
权利要求书2页 说明书42页
序列表26页 附图36页

(54)发明名称

融合分子与IL-15变体

(57)摘要

本发明提供具有治疗与诊断用途的可溶性融合蛋白复合物与IL-15变体,以及制造该等蛋白的方法。本发明另外提供使用本发明之融合蛋白复合物与IL-15变体刺激或抑制免疫应答的方法。



1. 一种可溶性融合蛋白复合物,包括:至少两种可溶性融合蛋白,其中,
第一融合蛋白包括(a)第一单链T细胞受体(scTCR),所述第一scTCR共价连结至(b)介白素-15(IL-15)多肽;以及
第二融合蛋白包括(c)第二scTCR,所述第二scTCR共价连结至(d)可溶性介白素-15受体 α (IL-15Ra)多肽;
其中所述第一融合蛋白的所述IL-15多肽结合至所述第二融合蛋白的所述可溶性IL-15Ra多肽以形成可溶性融合蛋白复合物,以及其中所述第一scTCR与所述第二scTCR包括通过肽接头序列共价连结至TCR V- β 链的TCR V- α 链。
2. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR与所述第二scTCR是相同的,因而创造具有增加的结合活性的多价TCR融合蛋白复合物。
3. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR对于特定抗原的识别有特异性。
4. 根据权利要求3的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR结构域的抗原包括呈递于MHC或HLA分子的肽抗原。
5. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR或所述第二scTCR进一步包括共价连结至TCR V- β 链的可溶性TCR C β 链片段。
6. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR或所述第二scTCR进一步包括共价连结至TCR V- α 链的可溶性TCR C α 链片段。
7. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述IL-15多肽为IL-15变异体,其中所述IL-15变异体相较于天然人类IL-15多肽是SEQ ID NO:1所列的成熟人类IL-15序列的氨基酸改变,以及其中所述氨基酸改变是选自位置8的D取代为N或A、位置61的D取代为A、位置65的N取代为D或A、位置72的N取代为D或R、位置108的Q取代为A、位置8的D取代为N与位置65的N取代为A、位置8的D取代为A与位置108的Q取代为A、和位置8的D取代为S与位置65的N取代为R所组成的群组中。
8. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第一scTCR为通过多肽接头序列共价连结至IL-15多肽。
9. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述第二scTCR为通过多肽接头序列共价连结至IL-15Ra多肽。
10. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述IL-15Ra多肽包括能结合IL-15多肽的IL-15受体 α 的细胞外结构域。
11. 根据权利要求1的可溶性融合蛋白复合物,其中所述IL-15Ra多肽包括IL-15a sushi结构域或IL-15a Δ E3结构域。
12. 一种核酸序列,其编码权利要求1的第一融合蛋白。
13. 一种核酸序列,其编码权利要求1的第二融合蛋白。
14. 一种DNA载体,包括权利要求12的核酸序列。
15. 一种DNA载体,包括权利要求13的核酸序列。
16. 一种DNA载体,包括权利要求12与13的核酸序列。
17. 一种制造权利要求1的可溶性融合蛋白复合物的方法,所述方法包括:

- a) 将编码第一融合蛋白的权利要求14的DNA载体导入第一宿主细胞；
- b) 在足以表达细胞或培养基中的所述第一融合蛋白的条件下，在培养基中培养所述第一宿主细胞；
- c) 由所述宿主细胞或培养基中纯化所述第一融合蛋白；
- d) 将编码第二融合蛋白的权利要求15的DNA载体导入第二宿主细胞；
- e) 在足以表达细胞或培养基中的所述第二融合蛋白的条件下，在培养基中培养所述第二宿主细胞；和
- f) 由所述宿主细胞或培养基纯化所述第二融合蛋白；以及
- g) 在足以使所述第一融合蛋白的IL-15结构域与所述第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域之间结合的条件下，混合所述第一与第二融合蛋白以形成所述可溶性融合蛋白复合物。

融合分子与IL-15变异体

[0001] 相关申请案的参考文献

[0002] 本申请案主张申请于2007年5月11日序列编号60/928,900的美国临时申请案的优先权,该申请案的全部内容藉此并入本文作为参考。

[0003] 政府支援

[0004] 支持本案之研究由美国以卫生与公众服务部为代表进行。

背景技术

[0005] T细胞受体(TCR)为免疫系统最主要的效应物(effector),其作为研发治疗方法的平台具有独特的优点。抗体疗法局限于辨识血液及胞外空间的病原体或者细胞表面上的蛋白标靶,而T细胞受体可辨识通过MHC分子在细胞表面上展现的抗原(包含衍生自胞内蛋白的抗原)。依据辨识所展现的抗原而变得活化之T细胞的亚型,T细胞受体以及具有T细胞受体的T细胞可参与调节各种免疫应答。举例而言,T细胞经由诱导B细胞分化成抗体产生细胞而涉及体液性免疫应答。此外,活化的T细胞发挥作用而起始细胞媒介的免疫应答。因此,T细胞受体可辨识无法使用抗体辨识的其他标靶。

[0006] T细胞为细胞的次族群,其与其他免疫细胞类型(多形核嗜中性白细胞、嗜酸性白细胞、嗜碱性白细胞、肥胖细胞、B细胞、NK细胞)共同构成免疫系统的细胞组分。在生理条件下,T细胞在免疫监控及消灭外来抗原方面发挥作用。然而,在病理条件下,有强烈的证据显示T细胞在疾病的引发及扩散中扮演着重要的角色。于此等疾患中,破坏T细胞免疫耐受性(中枢性或周边性)为引发自体免疫疾病的主要基本过程。

[0007] 一般相信TCR在免疫系统的发展及功能上扮演着重要的角色。举例而言,已有报导指出TCR媒介细胞毒杀作用(cell killing)、增进B细胞增生、以及影响各种疾患(包含癌症、过敏、病毒感染及自体免疫疾患)的发展及严重度。

[0008] 因此,期望能提供以T细胞受体为主的新颖靶向药剂(targeting agent),以及制造及使用该等用于治疗及诊断设定之药剂的方法。据此,特别期望能提供相较于先前技术中以抗体靶向为主的复合物而言,具有某些特定优点的分子。

[0009] 再者,期望使用TCR将各种效应物分子标靶至其可提供治疗效益而没有与非靶向系统活性相关的副作用的疾病位置。此等之一者为IL-15(淋巴球激素(lymphokine)的四 α 螺旋束家族的成员)。IL-15在免疫系统的发展及调控上扮演多方面的角色。更详言之,IL-15影响CD8⁺T细胞、NK细胞、毒杀性T细胞、B细胞、小肠壁表皮间隙淋巴球(IEL)及抗原呈递细胞(APC)的功能、发展、存活与增生。已证实IL-15^{-/-}基因转殖小鼠与IL-15Ra^{-/-}基因转殖小鼠两者皆缺乏周边NK细胞与毒杀性T细胞族群、某些IEL亚群、以及大部分记忆表型CD8⁺T细胞,暗示IL-15在此等细胞类型的发展、增生及/或存活上发挥功能。IL-15受体(R)由三种多肽所组成:型别特异性IL-15R α (IL-15R α)(“IL-15R α ”或“IL-15Ra”)、IL-2/IL-15R β 贝他(IL-2/IL-15R β)(“IL-2R β ”或“IL-15R β ”)及共同的伽玛链(gammachain)(“ γ C”或“ γ C”,其为多种细胞激素受体所共有者)。

[0010] IL-15讯息传递可经由IL-15R α 、IL-2R β 及 γ C的异三聚体复合物;经由IL-2R β 及 γ

C的异三聚体复合物产生。新的IL-15作用机制为转呈递作用(transpresentation)机制,其中,IL-15及IL-15R α 由抗原呈递细胞(单核球及树突细胞)协同地表达,结合至IL-15R α 的IL-15转呈递至邻近的仅表达IL-15R β γ C受体之NK细胞或CD8 T细胞。就发生于免疫突触的协同刺激事件(co-stimulatory event)而言,IL-15转呈递作用目前显示为活体内IL-15作用的主要机制,且其显示出在肿瘤免疫监控上扮演主要的角色(Waldmann,TA,2006,Nature Rev.Immunol.6:595-601)。可溶性IL-2R α 次单元(其导致含有外显子3(exon3)缺失及在N端的所谓"sushi"结构域(domain)的同型异构物(isoform))已显示承载有负责细胞激素结合作用的大部分结构要素。单独的IL-2R α 为IL-2的低亲和性受体(Kd 10nM),而IL-15R α 则以高亲和性与IL-15结合(Kd 100pM)。因此,可溶性IL-2R α 与IL-15能够在溶液中形成安定的异二聚体复合物,且此等复合物能够经由该中间型或高亲和性IL-15R复合物调控(亦即,刺激或阻断)免疫应答(Mortier et al.2006.J Biol Chem 281:1612-1619;Stoklasek et al.2006.J Immunol 177:6072-6080;Rubinstein et al.2006.Proc Natl Acad Sci U SA 103:9166-9171)。

[0011] 以IL-15对免疫系统的已知功效为前提,为了宿主效益已探讨有多种以IL-15为主的方法来操控免疫系统。IL-15的给予已被用来支援免疫应答或加强免疫系统重建,而阻断IL-15的活性则可抑制自体免疫应答或其他不适的免疫应答(Waldmann,TA,2006,Nature Rev.Immunol.6:595-601)。事实上,全身性IL-15治疗的限制之一为可能引发自体免疫疾病。其他限制包含在标准哺乳动物细胞表达系统中此种细胞激素的制造困难,以及其在活体内的半衰期非常短。因此,有需要生产具适当免疫刺激性治疗形式的IL-15,其显现较长的活体内半衰期、增加的免疫细胞结合活性、或增强的生物活性。此外,亦需要有效的IL-15拮抗剂。理想地,此等分子宜为选择性地靶至疾病位置,以避免不必要的全身性中毒并且提供更有效的治疗效益。

发明内容

[0012] 本发明提供具有治疗用途的多种IL-15变异体与可溶性融合复合物,以及制造该等蛋白的方法。本发明提供使用本发明的可溶性融合复合物杀死靶细胞的方法。此处所述的IL-15变异体与可溶性复合物具有潜在的治疗效用。

[0013] 因此,于一态样中,本发明提供一种可溶性融合蛋白复合物,其包括至少两种可溶性融合蛋白,其中,第一融合蛋白包含第一生物活性多肽,其共价连结至介白素-15(interleukin-15,IL-15)或其功能性片段,第二融合蛋白包括第二生物活性多肽,其共价连结至可溶性介白素-15受体 α (IL-15R α)多肽或其功能性片段,其中第一融合蛋白的IL-15结构域结合至第二融合蛋白的可溶性IL-15R α 结构域以形成可溶性融合蛋白复合物。

[0014] 于一具体例中,第一与第二生物活性多肽中的一个包括第一可溶性T细胞受体(TCR)或其功能性片段。于另一具体例中,该生物活性多肽的另一个包括该第一可溶性TCR或其功能性片段,因而创造具有增加的结合活性的多价TCR融合蛋白复合物。于再一具体例中,该另一个生物活性多肽包括不同于该第一可溶性TCR的第二可溶性TCR或其功能性片段。

[0015] 于此态样的另一具体例中,该TCR对于特定抗原的识别有特异性。

[0016] 于此态样的再一具体例中,该TCR为包括 α 与 β 链TCR的异二聚体。

[0017] 于此态样的又一具体例中,该TCR包括单链TCR多肽。于再一具体例中,该单链TCR多肽包括TCR V- α 链,其通过肽接头序列(peptide linker sequence)共价连结至TCR V- β 链。于再另一具体例中,该单链TCR进一步包括共价连结至TCR V- β 链的可溶性TCR C β 链片段。

[0018] 于另一具体例中,该单链TCR进一步包括共价连结至TCR V- α 链的可溶性TCR C α 链片段。

[0019] 于再一具体例中,该第一与第二生物活性多肽的一个或两个包括抗体或其功能性片段。

[0020] 于又另一具体例中,该抗体对于特定抗原的识别有特异性。于再一具体例中,该抗体为单链抗体或单链Fv。于另一特定具体例中,该单链抗体包括免疫球蛋白轻链可变结构域(immunoglobulin lightchain variable domain),其通过多肽接头序列共价连结至免疫球蛋白重链可变结构域。

[0021] 于上述态样之一具体例中,该第一生物活性多肽通过多肽接头序列共价连结至IL-15(或其功能性片段)。

[0022] 于上述态样之另一具体例中,该第二生物活性多肽通过多肽接头序列共价连结至IL-15Ra多肽(或其功能性片段)。

[0023] 于另一具体例中,该TCR结构域的抗原包括呈递于MHC或HLA分子的肽抗原。于再一具体例中,该肽抗原来自于肿瘤相关多肽或病毒编码多肽。

[0024] 于另一具体例中,该抗体结构域的抗原包括细胞表面受体或配体。

[0025] 于再一具体例中,该抗原包括CD抗原、细胞激素或趋化激素受体或配体、生长因子受体或配体、组织因子、细胞粘合分子、MHC/MHC样分子、FC受体、Toll样受体、NK受体、TCR、BCR、正向/负向协同刺激受体或配体、死亡受体或配体、肿瘤相关抗原、或病毒编码抗原。

[0026] 于上述态样之另一具体例中,该IL-15Ra多肽包括能结合IL-15的IL-15受体 α 的细胞外结构域。

[0027] 于上述态样之另一具体例中,该IL-15Ra多肽包括IL-15a sushi结构域(Wei et al. Journal of Immunology, 2001, 167: 277-282)或IL-15a Δ E3结构域(Anderson et al. 1995. J. Biol. Chem. 270: 29862-29869, Dubois et al. 1999. J. Biol. Chem. 274: 26978-26984)。

[0028] 于另一态样中,本发明提供一种IL-15变异体(此处亦称为IL-15突变体),其具有不同于天然(或野生型)IL-15蛋白以及结合至IL-15Ra多肽的氨基酸序列,且其作用为IL-15激动剂或拮抗剂。本发明的具体例提供一种作为非融合蛋白或作为可溶性融合蛋白的IL-15变异体,其包括上述生物活性多肽。其中,使用该IL-15变异体来代替该IL-15结构域。

[0029] 于上述态样之一具体例中,本发明的特征在于编码此处所述任一态样或具体例中的第一融合蛋白之核酸序列。

[0030] 于上述态样之一具体例中,本发明的特征在于编码此处所述任一态样或具体例中的第二融合蛋白之核酸序列。

[0031] 于上述态样之一具体例中,本发明的特征在于编码此处所述任一态样或具体例中的IL-15变异体之核酸序列。

[0032] 于一具体例中,该核酸序列进一步包括可操作性地连结至编码该融合蛋白或IL-15变异体的序列的启动子、翻译起始信号与前导序列。于另一具体例中,上述核酸序列的一个包括在DNA载体中。

[0033] 于另一态样中,本发明的特征在于一种制造上述态样中的可溶性融合蛋白复合物的方法,该方法包括:将上述态样及具体例中编码第一融合蛋白的DNA载体导入第一宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该第一融合蛋白的条件下,在培养基中培养该第一宿主细胞,由该宿主细胞或培养基纯化该第一融合蛋白,将上述态样及具体例中编码该第二融合蛋白的DNA载体导入第二宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该第二融合蛋白的条件下,在培养基中培养该第二宿主细胞,由该宿主细胞或培养基纯化该第二融合蛋白,以及在足以使第一融合蛋白的IL-15结构域与第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域之间发生结合的条件下,混合该第一与第二融合蛋白以形成该可溶性融合蛋白复合物。

[0034] 于另一态样中,本发明的特征在于一种制造上述态样中的可溶性融合蛋白复合物的方法,该方法包括:将上述态样及具体例中编码该第一融合蛋白的DNA载体与上述态样及具体例中编码该第二融合蛋白的DNA载体导入宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该融合蛋白的条件下,在培养基中培养该宿主细胞,且使第一融合蛋白的IL-15结构域与第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域之间发生联合,以形成该可溶性融合蛋白复合物,由该宿主细胞或培养基纯化该可溶性融合蛋白复合物。

[0035] 于又一态样中,本发明的特征在于一种制造上述态样中的可溶性融合蛋白复合物的方法,该方法包括:将编码该第一与第二融合蛋白的权利要求28的DNA载体导入宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该融合蛋白的条件下,在培养基中培养该宿主细胞,且使第一融合蛋白的IL-15结构域与第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域之间发生联合,以形成该可溶性融合蛋白复合物,由该宿主细胞或培养基纯化该可溶性融合蛋白复合物。

[0036] 于上述方法的其他态样中,使用编码该IL-15变异体的DNA载体代替编码该第一融合蛋白的DNA载体,以产生能表达该IL-15变异体的宿主细胞且使该IL-15变异体与第二融合蛋白的IL-15Ra结构域发生联合,以形成可溶性融合蛋白复合物。

[0037] 于另一态样中,本发明的特征在于一种制造上述态样中的IL-15变异体的方法,该方法包括:将上述态样及具体例中编码IL-15变异体的DNA载体导入宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该IL-15变异体的条件下,在培养基中培养该宿主细胞,由该宿主细胞或培养基纯化该IL-15变异体。

[0038] 于另一态样中,本发明的特征在于一种杀死靶细胞的方法,该方法包括:使多种细胞与上述任一态样或具体例中的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体接触,其中,该多种细胞进一步包括承载有为上述态样中的IL-15结构域所识别的IL-15R链的免疫细胞,以及承载有为上述态样中的生物活性多肽的至少一个所识别的抗原的靶细胞;在该靶细胞的抗原与该免疫细胞的IL-15R链之间形成特异性结合复合物(桥联),其足以结合与活化该免疫细胞;以及通过所结合的经活化免疫细胞杀死该靶细胞。

[0039] 于该方法的一具体例中,该靶细胞为肿瘤细胞或病毒感染细胞。

[0040] 于该方法的另一具体例中,该生物活性多肽包括TCR。

[0041] 于该方法的又一具体例中,该靶细胞的抗原包括呈递于MHC或HLA分子且可为TCR所识别的肿瘤或病毒编码肽抗原。

[0042] 于该方法的再一具体例中,该免疫细胞为T细胞、LAK细胞或NK细胞。

[0043] 于另一态样中,本发明的特征在于一种预防或治疗患者的疾病的方法,其中,该疾病细胞表达疾病相关抗原,该方法包括:对该患者给予包括识别疾病相关抗原的生物活性多肽的上述任一态样或具体例中的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体,在抗原表达的疾病细胞与IL-15R表达的免疫细胞之间形成特异性结合复合物(桥联),其足以定位该免疫细胞,以及伤害或杀死该疾病细胞,其足以预防或治疗患者的疾病。

[0044] 于一态样中,本发明的特征在于一种预防或治疗患者的疾病的方法,其中,该疾病细胞表达疾病相关抗原,该方法包括:将承载该IL-15R链的免疫细胞与包括识别疾病相关抗原的生物活性多肽的权利要求1至22中的可溶性融合蛋白复合物混合,对患者给予免疫细胞-融合蛋白复合物,在抗原表达的疾病细胞与IL-15R表达的免疫细胞之间形成特异性结合复合物(桥联),其足以定位该免疫细胞,以及伤害或杀死该疾病细胞,其足以预防或治疗患者的疾病。

[0045] 于另一态样中,本发明的特征在于一种预防或治疗患者的疾病的方法,其中,该患者细胞表达疾病相关抗原,该方法包括:对该患者给予包括识别疾病相关抗原的生物活性多肽的上述任一态样或具体例中的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体,将可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体定位至该疾病细胞,其中,该可溶性融合蛋白复合物的IL-15结构域或IL-15变异体与承载该IL-15R链的免疫细胞结合,以及抑制该免疫细胞的免疫应答。

[0046] 于该方法的一具体例中,该疾病为癌症或病毒感染。

[0047] 于该方法的另一具体例中,该疾病为免疫疾患、自体免疫疾病或炎性疾患。

[0048] 于该方法的另一具体例中,该疾病相关抗原为肽/MHC复合物。

[0049] 于另一具体例中,本发明的特征在于一种刺激哺乳动物的免疫应答的方法,包括对该哺乳动物给予有效量的上述任一态样或具体例中的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体。

[0050] 于另一具体例中,本发明的特征在于一种抑制哺乳动物的免疫应答的方法,包括对该哺乳动物给予有效量的上述任一态样或具体例中的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体。

附图说明

[0051] 图1(A与B)为概要图。(A)为描述含有单链TCR多肽的融合蛋白复合物实例的概要图。(B)为描述包括融合蛋白复合物的代表性融合蛋白构筑体的概要图。

[0052] 图2(A至C)由三个图所组成。(A)描述pNEF38-c264scTCR/huIL15表达载体的图谱。(B)显示c264scTCR/huIL15融合基因的序列。(C)显示c264scTCR/huIL15融合蛋白的序列,其包含前导序列。

[0053] 图3(A至C)由三个图所组成。(A)描述pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15表达载体的图谱。(B)显示c264scTCR-hinge-huIL15融合基因的序列。(C)显示c264scTCR-hinge-huIL15融合蛋白的序列,其包含前导序列。

[0054] 图4(A至C)由三个图所组成。(A)描述pNEF38-c264scTCR/huIL15RaDE3表达载体的图谱。(B)显示c264scTCR/huIL15Ra Δ E3融合基因的序列。(C)显示c264scTCR/huIL15Ra Δ

E3融合蛋白的序列,其包含前导序列。

[0055] 图5(A至C)由三个图所组成。(A)描述pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi表达载体的图谱。(B)显示c264scTCR/huIL15RaSushi融合基因的序列。(C)显示c264scTCR/huIL15RaSushi融合蛋白的序列,其包含前导序列。

[0056] 图6(A至C)由三个图所组成。(A)描述pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi表达载体。(B)显示c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi融合基因的序列。(C)显示c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi融合蛋白的序列,其包含前导序列。

[0057] 图7为pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi表达载体的图谱。

[0058] 图8为pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaDE3表达载体的图谱。

[0059] 图9(A与B)阐述表达TCR/IL15Ra融合蛋白的转染细胞的特性。(A)为两个显示融合蛋白表达细胞的流式细胞仪分析的图。(B)为显示融合蛋白产生的以TCR为主的ELISA结果的图。

[0060] 图10(A与B)显示TCR/IL15及TCR/IL15Ra融合蛋白通过还原SDS PAGE的分析。(A)显示含有c264scTCR/huIL15或c264scTCR/huIL15RaSushi的细胞培养物悬浮液。(B)显示含有c264scTCR/huIL15或c264scTCR/huIL15Ra Δ E3的细胞培养物悬浮液。

[0061] 图11(A至C)显示TCR/IL15、TCR/IL15Ra及融合蛋白复合物通过尺寸排阻层析(size exclusion chromatography)的分析。(A)为显示c264scTCR/huIL15之SEC层析图谱的图。(B)为显示c264scTCR/huIL15RaSushi之SEC层析图谱的图。(C)为显示c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RaSushi融合蛋白复合物之SEC层析图谱的图。

[0062] 图12(A与B)为TCR/IL15Ra及融合蛋白复合物通过尺寸排阻层析的分析。(A)为说明c264scTCR/huIL15Ra Δ E3之SEC层析图谱的图。(B)为说明c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15Ra Δ E3融合蛋白复合物之SEC层析图谱的图。

[0063] 图13为显示通过流式细胞仪所测得的TCR/IL15、TCR/IL15Ra及融合蛋白复合物对细胞呈递的肽/MHC复合物的结合性的图。

[0064] 图14(A至D)由四个图所组成。(A)显示成熟人类IL15蛋白(SEQID NO:1)的序列,蓝色底线的残基为表1所示的IL-15变异体中经取代者。(B)描述pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A及pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N表达载体。(C)显示pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A及pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N基因的序列。(D)显示pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A及pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N融合蛋白的序列,其包含前导序列。改变蓝色底线的核苷酸以产生指定的IL-15变异体。

[0065] 图15为显示以融合蛋白及复合物染色,接着经TCR特异性肽/MHC试剂的承载有IL-15R的CTLL2细胞的流式细胞仪分析图。

[0066] 图16(A至C)为显示通过流式细胞仪所测得的TCR/IL15RaSushi及TCR/IL15(包括天然与变异型IL15)的二聚体融合蛋白复合物对于呈递于载入肽的细胞的同源性肽/MHC复合物之结合性的图。亦显示于未载入肽的细胞的二聚体融合蛋白复合物之背景结合率。(A)为显示TCR/IL15RaSushi及TCR/IL15wt(天然型)、或TCR/IL15D8N或TCR/IL15D8A变异体的二聚体复合物对于呈递于细胞的同源性肽/MHC复合物之结合性的图。(B)为显示TCR/IL15RaSushi及TCR/IL15wt(天然型)的二聚体复合物对于未载入肽的细胞的微量背景结合率的图。TCR/IL15RaSushi及TCR/IL15D8N或TCR/IL15D8A变异体的二聚体复合物对未载入肽的

细胞未见到背景结合率。(C)为显示以TCR/IL15R α Sushi及TCR/IL15wt(天然型)、或TCR/IL15N72D、TCR/IL15D8N或TCR/IL15D8A变异体的二聚体复合物染色的承载有IL-15R β γ C的32D β 细胞之流式细胞仪分析图。观察到含有TCR/IL15N72D的复合物的IL-15R β γ C结合性增强,以及含有TCR/IL15D8N或TCR/IL15D8A的复合物的IL-15R β γ C结合性降低。

[0067] 图17(A与B)为显示通过ELISA所测得的野生型、拮抗剂及激动剂TCR/IL15融合蛋白对于同源性肽/MHC复合物与IL15R α 之结合活性的图。(A)为显示融合蛋白对于同源性肽/MHC复合物之结合活性的分析。(B)为显示融合蛋白对于IL15R α 之结合活性的分析。

[0068] 图18为显示通过细胞增生试验所测得的融合蛋白及融合蛋白复合物维持承载有IL15R的细胞生长的图。

[0069] 图19(A至C)为显示通过细胞增生试验所测得的包括IL-15变异体的TCR/IL-15融合蛋白抑制或增进承载有IL15R的细胞生长的能力的图。(A)为显示包括IL-15变异体的融合蛋白抑制承载有高亲和性IL15R($\alpha\beta$ γ 受体复合物)的CTLL-2细胞增生的活性的图。(B)为显示包括IL-15变异体的融合蛋白抑制或增进承载有低亲和性IL15R(β γ 受体复合物)的32D β 细胞增生的活性的图。(C)为显示包括IL-15变异体的融合蛋白阻断承载有高亲和性IL15R($\alpha\beta$ γ 受体复合物)的CTLL-2细胞之TCR/IL15wt刺激性增生的活性的图。

[0070] 图20描述活体外培养NK细胞与TCR/IL15R α Sushi及TCR/IL15的二聚体融合蛋白复合物对异体移植荷肿瘤裸小鼠存活率的影响。对无胸腺裸小鼠注射人类NSCLC A549-A2细胞,以建立肺脏转移。将单离自异源供体小鼠脾脏的经纯化NK细胞与rhIL-2、MART1scTCR-IL2、c264scTCR-IL2或c264scTCR-IL15/c264scTCR-IL15R α 于活体外培养并授受性转移(adoptive transfer)至经环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)预先处理之荷肿瘤小鼠,如图中说明所示。描绘出处理之后的存活率百分比。

[0071] 图21阐述表1,其显示IL-15变异体中的氨基酸置换以及此等变异对IL-15活性的影响。

[0072] 图22A至B分别阐述IL-15的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)及IL-15的核酸序列(SEQ ID NO:2)。

具体实施方式

[0073] 已确立IL-15稳定地结合至IL-15R α 的细胞外结构域,且所得复合物能够经由该中间型或高亲和性IL-15R复合物调控(亦即,刺激或阻断)免疫应答(1至4)。此外,已证实单链TCR或抗体多肽可融合至细胞激素及其他免疫效应物结构域,且此等双特异性融合分子保有两种融合结构域的功能活性(5至8)。再者,已显示多价型TCR对其配体提供增强的结合性(9)。

[0074] 定义

[0075] 以下定义是为用于下列文字说明中的特定术语而提供。

[0076] 说明书及权利要求书中所使用的单数形式“a”、“an”及“the”包含复数指称,除非内容中另行清楚规定。举例而言,术语“细胞”包含多个细胞,包含其混合物。术语“核酸分子”包括多个核酸分子。

[0077] 此处所使用的术语“包括”意指组成物及方法包含所记载的元素,但不排除其他元素。当用于界定组成物及方法时,“实质上由...所组成”应指排除对组合具任何实质重要性

的其他元素。因此,此处所定义的实质上由元素所组成的组成物将不排除得自单离及纯化方法的微量污染物以及医药上可接受的载剂,例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。”由…所组成”应指排除超过微量的其他成分及用于给予本发明组成物的实质方法步骤的元素。由此等转折语各自界定的具体例皆于本发明的范畴中。

[0078] “抗体”为结合至特定抗原决定基(epitope)的任何免疫球蛋白,包含抗体及其片段。该术语涵括多株抗体、单株抗体、嵌合抗体及单链抗体,以及双特异性抗体。

[0079] 此处所使用的术语“抗原”意指会引发免疫系统制造抗体或特定细胞媒介的免疫应答与其对抗的任何物质。疾病相关抗原为与任何疾病相关的任何物质。

[0080] 此处所使用的术语“生物活性多肽”意指氨基酸序列,例如蛋白质、多肽或肽;糖或多糖;脂质或酯脂、酯蛋白、或脂蛋白,其可产生此处讨论的所欲效果,包含TCR或抗体融合蛋白复合物与抗原的结合活性。

[0081] 此处所使用的术语“细胞”意图包含任何原核细胞、真核细胞、初级细胞或永生化细胞系(imortalized cell line)、组织或器官中的此等细胞的任何群集。优选地,细胞得自哺乳动物(尤其是人类)的来源,且可经一种或多种病原体感染。依据本发明的“宿主细胞”可为任何来源的经转染(transfected)、经转形(transformed)、经转导(transduced)或经感染(infected)的细胞,包含原核细胞、真核细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞、昆虫细胞、植物细胞或细菌细胞,或者其可为可用于增殖此处所述核酸的任何来源的细胞。

[0082] 此处所使用的术语“共轭分子”意指通过化学方法或其他适当方法共价连结(亦即,融合)的TCR或抗体分子与效应物分子(通常为化学分子或合成分子)。若有需要,共轭分子可经由肽接头序列或载体分子于一个或数个位置融合。或者,肽接头或载体可用于协助构筑共轭分子。特别优选的共轭分子为共轭毒素或可检测性标记。

[0083] 此处所使用的术语“效应物分子”意指氨基酸序列,例如蛋白质、多肽或肽;糖或多糖;脂质或酯脂、酯蛋白、或脂蛋白,其可产生此处讨论的所欲效果,包含IL-15结构域、IL-15变异体或IL-15受体(例如IL-15R α 、IL-2R β 或 γ C)、或其功能性片段。

[0084] 术语“融合分子”及“融合蛋白”可交互地使用且意指通过重组方法、化学方法或其他适当方法共价连结(亦即,融合)的生物活性多肽(通常为TCR或抗体)与效应物分子(通常为蛋白质或肽序列)。若有需要,融合分子可经由肽接头序列于一个或数个位置融合。或者,肽接头可用于协助构筑融合分子。特别优选的融合分子为融合蛋白。一般而言,融合分子亦可包括共轭分子。

[0085] 术语“宿主细胞”意指含有选殖载体或表达载体的任何原核细胞或真核细胞。此术语亦包含彼等经基因工程而在宿主细胞的染色体或基因体中含有经选殖基因的原核细胞或真核细胞。

[0086] 此处所使用的术语“免疫应答”意指经由涉及不同的粘合及活化步骤的多因子过程刺激免疫细胞并从血液将免疫细胞召集至淋巴组织以及非淋巴组织的过程。活化条件引发细胞激素、生长因子、趋化激素及其他因子的释放,向上调节免疫细胞上的黏合分子及其他活化分子的表达,促进黏合、形态变化及/或与趋化作用同时的外渗作用(extravasation)通过组织,增加细胞增生及细胞毒杀活性,刺激抗原呈递以及提供其他表型变化(包括产生记忆细胞类型)。免疫应答亦意指免疫细胞抑制或调节其他免疫细胞的发炎或细胞毒杀活性的活性。

[0087] 此处所使用的术语“多核苷酸”及“核酸分子”可交互地使用,其意指任何长度的核苷酸的聚合型。多核苷酸可含有去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸及/或其类似物。核苷酸可具有任何三维立体结构,且可执行任何已知或未知的功能。术语“多核苷酸”包含例如:单股、双股及三螺旋分子、基因或基因片段、外显子(exon)、内含子(intron)、mRNA、tRNA、rRNA、核糖酶(ribozyme)、反义分子(antisense molecule)、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、适体(aptamer)、质体、载体、经分离的任何序列DNA、经分离的任何序列RNA、核酸探针、及引子。核酸分子亦可包括经修饰的核酸分子(例如,包括经修饰的碱基、糖类及/或核苷酸间接头)。

[0088] 术语“多肽”意指无论其大小,优选地实质上由任意的20个天然氨基酸所组成的任何聚合物。尽管术语“蛋白质”常用来指相对较大的蛋白质,“肽”常用来指小的多肽,在此领域中此等术语常部分重叠使用。除非另行注明,否则术语“多肽”一般是指蛋白质、多肽、及肽。通过标准分子分级技术(例如离心或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)进行判定时,依据本发明普遍适用的肽一般介于约0.1至100KD之间或更大而高达约1000KD,优选地介于约0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30及50KD之间。

[0089] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等意指降低个体发展疾患或病症的可能性,该个体不具有疾患或病症,但有发展疾患或病症的风险或容易发展疾患或病症。

[0090] 术语“单链抗体”意指以单链形式为主的抗体。单链抗体可由抗体的最小结合单元所组成。单链抗体可在单一安定折叠的多肽链上仅组合抗体的彼等抗原结合区域。依此,相较于典型的免疫球蛋白,单链抗体具有相当小的尺寸,但其仍保有抗体的抗原特异性结合性质。单链抗体可连结至广范围的配体,例如效应物分子或药物共轭体。

[0091] 此处所使用的术语“可溶性”意指在低G力离心(例如,于标准离心机中每分钟低于约30,000转)的情形下不容易从水性缓冲液(例如,细胞培养基)沉降的融合分子(尤其是融合蛋白)。再者,于低浓度或无阴离子性或非离子性界面活性剂存在下,若融合分子在高于约5至37℃的温度及在中性pH值或接近中性pH值仍维持于水溶液中,则该融合分子为可溶性的。于此等条件下,可溶性蛋白通常具有低沉降值,例如,低于约10至50沉降单位(svedberg unit)。

[0092] 此处所述及的水溶液典型地具有缓冲化合物以确立pH值,典型地,其介于约5至9的pH范围内,且离子强度范围介于约2mM及500mM之间。有时,添加蛋白酶抑制剂或温和的非离子性界面活性剂。此外,若有需要,可添加载体蛋白,例如牛血清白蛋白(BSA)而达到少量mg/ml。例示性水性缓冲液包含标准磷酸盐缓冲盐水、tris缓冲盐水、或其他广为人知的缓冲液及细胞培养基调配物。

[0093] 术语“刺激(stimulate)”或“刺激(stimulating)”意指增加、放大、增强、提高免疫应答。刺激可为正向改变。例示性增加可为例如,增加5%、10%、25%、50%、75%或甚至90至100%。其他例示性增加包含增加2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、或甚至100倍。

[0094] 术语“抑制(suppress)”或“抑制(suppressing)”意指减少、减弱、降低、遏止或平抑免疫应答。抑制可为负向改变。例示性减少可为例如,减少5%、10%、25%、50%、75%或甚至90至100%。例示性减少包含减少2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、或甚至100倍。

[0095] 术语“T细胞受体”(TCR)意指参与T细胞应答抗原呈递的活化作用的整合性膜蛋白

(integral membrane protein)复合物的多肽。T细胞经由 $\alpha\beta$ 异二聚体T细胞受体 (TCR) 辨识结合至MHC产物的肽。TCR库具有广泛的多样性,该多样性由抗体重链及轻链基因中所使用的相同基因重排机制所创造 [Tonegawa, S. (1988) Biosci. Rep. 8:3-26]。大部分的多样性产生于编码 α 及 β 链的互补性决定区3 (complementarity determining region 3, CDR3) 的可变 (variable, V) 区及连接 (joining, J) 区 (或变异 (diversity, D) 区) 的接合处 [Davis and Bjorkman (1988) Nature 334:395-402]。然而, TCR不会如同抗体般,可能不会巧合地,进行体细胞点突变。TCR亦不会进行与抗体相同程度的亲和性成熟 (affinity maturation)。TCR在其自然产生时显现出具有范围介于 10^5 至 10^7M^{-1} 的亲和性,而抗体则典型地具有范围介于 10^5 至 10^9M^{-1} 的亲和性 [Davis et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16:523-544; Eisen et al. (1996) Adv. Protein Chem. 49:1-56]。尽管在TCR中缺乏体细胞突变可能与较低亲和性相关,但亦有主张认为TCR具有较高亲和性并不具有选择优势。事实上, T细胞活化作用的序列触发 (serial-triggering) [Valitutti et al. (1995) Nature 375:148-151] 及动态校正 (kinetic proofreading) [Rabinowitz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1401-1405] 模型皆提出较长的分离速率 (off-rates) (与较高亲和性相关) 将不利于讯息传递过程。较高亲和性的TCR亦可能无法维持T细胞应答所需的肽特异性。举例而言,结合于MHC沟 (MHC groove) 中的肽呈现有限的可及表面 (accessible surface) [Bjorkman, P. J. (1997) Cell 89:167-170], 其可能进而限制在相互作用可产生能量的量。另一方面,通过将能量导向MHC螺旋来提升TCR的亲和性可能将导致负向选择期间的胸腺缺失 [Bevan, M. J. (1997) Immunity 7:175-178]。术语“TCR”涵括多株T细胞受体、单株T细胞受体、嵌合T细胞受体、人类化T细胞受体、异二聚体T细胞受体及单链T细胞受体或其功能性片段,包含包括有TCR Va及V β 结构域的分子。术语“TCR”亦涵括揭示于例如, 2008年3月19日申请且案名为“T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF”的美国临时申请案以及美国专利公开案US 200301-44474A1中的T细胞受体。

[0096] 术语“载体”为能够在宿主细胞中自行复制且可接受外来DNA的核酸分子。载体带有其本身的复制起始点、可用于插入外来DNA的一种或多种限制性内切酶的独特识别位置、以及通常带有筛选标志 (selectable marker) (例如, 编码抗生素抗性的基因)、且常带有用于表达所插入的DNA的识别序列 (例如, 启动子)。常见的载体包含质体载体及噬菌体载体。

[0097] T细胞受体 (TCR)

[0098] T细胞为细胞的次族群, 其与其他免疫细胞类型 (多形核嗜中性白细胞、嗜酸性白细胞、嗜碱性白细胞、肥胖细胞、B细胞、NK细胞) 共同构成免疫系统的细胞组分。在生理条件下, T细胞在免疫监控及消灭外来抗原方面发挥作用。然而, 在病理条件下, 有强烈的证据显示T细胞在疾病的引发及扩散中扮演着重要的角色。于此等疾患中, 破坏T细胞免疫耐受性 (中枢性或周边性) 为引发自体免疫疾病的主要基本过程。

[0099] TCR由至少7个跨膜蛋白 (transmembrane protein) 所构成。经二硫键连结的 ($\alpha\beta$) 异二聚体形成单型抗原辨识单元, 而CD3的恒定链 (invariant chain) (其由 ϵ (epsilon)、 γ (gamma)、 δ (delta) 与 ζ (zeta) 及 η (eta) 链所组成) 负责与结合至讯息传递路径的配体联合, 造成T细胞活化而发挥细胞免疫应答的作用。无论TCR链的基因多样性为何, 所有已知的次单元皆共有两种结构特征。首先, 该等次单元为具有单一跨膜结构域 (single transmembrane spanning domain) (可能为 α -螺旋) 的跨膜蛋白。其次, 所有TCR链皆具有在

预定跨膜结构域内有带电荷氨基酸的不寻常特征。恒定链具有单一负电荷,其在小鼠与人类之间具保守性,而可变链则拥有一个(TCR- β)或两个(TCR- α)正电荷。TCR- α 的跨膜序列在多种物种中具高度保守性,因此可在系统发生学上扮演重要的功能角色。含有亲水性氨基酸精氨酸及赖氨酸的八肽序列(octapeptide sequence)在物种之间为相同。

[0100] T细胞应答是由结合至TCR的抗原所调控。其中一种类型的TCR为由 α 及 β 链(类似免疫球蛋白的可变(V)及恒定(C)区)所组成的膜结合性异二聚体。TCR α 链包含共价连结的V- α 及C- α 链,而 β 链则包含共价连结至C- β 链的V- β 链。V- α 及V- β 链形成在主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)(在人类中称为HLA复合物)的背景中可与超级抗原(superantigen)或抗原结合的囊状物或凹口。参见Davis Ann.Rev.of Immunology 3:537(1985);Fundamental Immunology 3rd Ed., W.Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993)。

[0101] 融合蛋白

[0102] 本发明的可溶性融合蛋白及共轭分子复合物包括至少两种可溶性融合蛋白,其中,第一融合蛋白包含第一生物活性多肽,其共价连结至介白素-15(interleukin-15, IL-15)或其功能性片段,第二融合蛋白包括第二生物活性多肽,其共价连结至可溶性介白素-15受体 α (IL-15Ra)多肽或其功能性片段,其中第一融合蛋白的IL-15结构域结合至第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域以形成可溶性融合蛋白复合物。

[0103] 于某些实例中,生物活性多肽之一包括第一可溶性TCR或其片段。该生物活性多肽之另一个或第二生物活性多肽包含第一可溶性TCR或其功能性片段,因而创造多价TCR融合蛋白复合物,其具有相较于单价TCR而言,对同源性配体增加的结合活性。再者,该另一个生物活性多肽包括不同于该第一可溶性TCR的第二可溶性TCR或其功能性片段。于某些实例中,相较于天然TCR而言,所产生的TCR具有较高的亲和性,或对同源性配体增加的结合活性。若此处所述的本发明可溶性TCR对其配体具有较高的结合性(avidity)或亲和性,则其适用于作为细胞表面结合性抗原的特异性探针。于本发明的某些优选实例中,TCR特定抗原的辨识具有特异性。

[0104] 于例示性具体例中,TCR为包括 α 链(此处称为 α 、阿伐(alpha)或a链)及 β 链(此处称为 β 、贝他(beta)或b链)的异二聚体。于其他例示性具体例中,TCR包括单链TCR多肽。单链TCR可包括通过肽接头序列共价连结至TCR V- β 链的TCR V- α 链。单链TCR可进一步包括共价连结至TCR V- β 链的可溶性TCR C β 链片段。单链TCR可进一步包括共价连结至TCR V- α 链的可溶性TCR C α 链片段。

[0105] 于再一具体例中,第一与第二生物活性多肽的一个或两个包括抗体或其功能性片段。

[0106] 此处所使用的术语“生物活性多肽”或“效应物分子”意指可产生此处讨论的所欲效果的氨基酸序列,例如蛋白质、多肽或肽;糖或多糖;脂质或醣脂、醣蛋白、或脂蛋白。效应物分子亦包含化学药剂。亦涵括编码生物活性或效应物蛋白、多肽、或肽的效应物分子核酸。因此,适当的分子包含调节因子、酶、抗体或药物,以及DNA、RNA及寡核苷酸。生物活性多肽或效应物分子可为天然存在的,或者,其可例如通过重组或化学合成法从已知成分合成,且可包含异源组分。通过标准分子分级技术(例如离心或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)进行判定时,生物活性多肽或效应物分子一般介于约0.1至100KD之间或更大而高达约

1000KD,优选地介于约0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30及50KD之间。本发明的所欲效果包含,但不限于例如:在预防或治疗疾病方面形成具有增加的结合性的TCR融合蛋白复合物、杀死靶细胞,以例如引发细胞增生或细胞死亡、起始免疫应答,或者作为用于诊断目的之检测分子。对于此等检测可使用检定法,例如包含下列连续步骤的检定法:培养细胞以使其增生,使该细胞与本发明的TCR融合复合物接触,接着评估TCR融合复合物是否抑制该细胞的进一步发展。

[0107] 依据本发明共价连结效应物分子至TCR肽提供多个显著优点。本发明的TCR融合复合物可制造成含有单一效应物分子,包含具有已知结构的肽。此外,种类繁多的效应物分子可在相似的DNA载体中制造。换言之,不同效应物分子库可连结至TCR分子,以用于呈递经感染细胞或疾病细胞。再者,就治疗应用而言,可对个体给予编码连结至效应物肽的TCR分子的DNA表达载体以于活体内表达TCR融合复合物,而不对个体给予TCR分子。此等方法避免典型地与制备重组蛋白相关的昂贵纯化步骤,且避免与习知方法相关的抗原摄取及加工的复杂步骤。

[0108] 如所述,此处揭示的融合蛋白组分(例如,效应物分子,如细胞激素、趋化激素、生长因子、蛋白毒素、免疫球蛋白结构域或其他生物活性分子以及任何肽接头)可依几乎任合方式组织,限制条件为该融合蛋白具有其所谋求的功能。特定而言,若有需要,融合蛋白的各组分可通过至少一个适当的肽接头序列而彼此隔开。此外,融合蛋白可包含标识物(tag),以例如帮助融合蛋白的修饰、辨别及/或纯化。更具体的融合蛋白如下文实施例中所述。

[0109] [接头]

[0110] 本发明的融合复合物优选地亦包含插至于IL-15或IL-15R α 结构域与生物性活性多肽之间的可挠性接头序列(flexible linker sequence)。接头序列使生物性活性多肽对IL-15或IL-15R α 结构域的有效定位得以达成,而使该两种结构域的功能活性得以发挥。于生物性活性多肽为TCR的具体例中,接头序列定位TCR分子结合沟,使得T细胞受体可辨识呈递MHC-肽复合物,且可运送效应物分子至所欲位置。通过以下揭示的检定法测定时,效应物分子成功的呈递可调控细胞的活性或者引发或抑制T细胞增生,或者起始或抑制对特定位置的免疫应答,该检定法包含活体外检定法,其包含下列连续步骤:培养T细胞以使其增生,使该T细胞与本发明的TCR融合复合物接触,接着评估TCR融合复合物是否抑制该细胞的进一步发展。

[0111] 于某些具体例中,可溶性融合蛋白复合物具有接头,其中,第一生物性活性多肽通过多肽接头序列共价连结至IL-15(或其功能性片段)。

[0112] 于其他具体例中,此处所述的可溶性融合蛋白复合物具有接头,其中,第二生物性活性多肽通过多肽接头序列共价连结至IL-15R α 多肽(或其功能性片段)。

[0113] 接头序列优选地由能得到可有效地定位用于辨识呈递抗原的TCR分子结合沟的肽的核苷酸序列所编码。此处所使用的词语“生物性活性多肽对IL-15或IL-15R α 结构域的有效定位”或其他类似词语意指将连结至IL-15或IL-15R α 结构域的生物性活性多肽予以定位,使得IL-15或IL-15R α 结构域能够彼此产生相互作用,以形成蛋白复合物。于某些具体例中,IL-15或IL-15R α 结构域经有效定位,而得以与免疫细胞产生相互作用,以起始或抑制免疫反应、或者抑制或刺激细胞的发展。

[0114] 优选地,接头序列包括约7至20个氨基酸,更优选地,约8至16个氨基酸。接头序列优选地为具可挠性,因而不会将生物性活性多肽或效应物分子固定于单一非所欲构形。可使用接头序列以例如隔开识别位置与融合分子。详言之,肽接头序列可在生物性活性多肽及效应物分子之间进行定位,以例如将其化学性交联以及提供分子可挠性。接头优选地主要包括具有小侧链的氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸及丝氨酸,以提供可挠性。优选地,约80或90%或更高的接头序列包括甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸残基,尤其是甘氨酸及丝氨酸残基。对于包括异二聚体TCR的融合蛋白复合物,接头序列宜连结至TCR分子的b链,尽管接头序列亦可附接至TCR分子的a链。或者,接头序列可连结至TCR分子的a链及b链两个。当此等β肽链与a链同时表达时,连结的TCR-效应物肽会折叠而产生如图1所概述的功能性TCR分子。一种适当的接头序列为ASGGGSGGG(亦即,AlaSer Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly),优选地连结至TCR的b结构域的第一个氨基酸。可使用包含任何数目的可挠性接头设计的不同接头序列,其已成功地用于将抗体可变区连接在一起,参见Whitlow, M. et al., (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105。于某些实例中,对于共价连接效应物分子至TCR b链分子,接头的氨基酸序列应能从TCRβ链的C-端残基至效应物分子的N-端残基横跨适当的距离。适当的接头序列可凭经验轻易地鉴别。此外,接头序列适当的大小及序列亦可通过以TCR分子的预定大小及形状为基准的习知电脑模拟技术测得。

[0115] 一般而言,本发明融合蛋白复合物的制备可通过此处所揭示的程序以及通过经认可的重组DNA技术来完成,该重组DNA技术涉及例如:聚合酶链扩增反应(PCR)、制备质体DNA、以限制酶酶切DNA、制备寡核苷酸、DNA的粘结(ligation)、单离mRNA、将DNA导入适当的细胞、宿主的转形或转染、培养宿主。此外,融合分子可使用离液剂 chaotropic agent) 以及广为人知的电泳法、离心法及层析法而单离及纯化。参见Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. (1989); 以及Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) 中与此等方法相关的内容。

[0116] 此处所使用的本发明生物性活性多肽或效应物分子可包含诸如细胞激素、趋化激素、生长因子、蛋白毒素、免疫球蛋白结构域或其他活性蛋白(例如酶)等因子。生物性活性多肽亦可包含其他化合物的共轭体,例如非蛋白毒素、细胞毒性药剂、化学治疗药剂、可检测性标记、放射活性物质等。

[0117] 本发明的细胞激素界定为由细胞所产生且影响其他细胞且负责任何数目的细胞免疫性多重效果的任何因子。细胞激素的实例包含,但不限于:IL-2家族、干扰素(IFN)、IL-10、IL-1、IL-17、TGF及TNF细胞激素家族,以及IL-1至IL-35、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、TGF-β、TNF-α及TNFβ。

[0118] 于本发明的一态样中,第一融合蛋白包括第一生物性活性多肽,其共价连结至介白素-15(IL-15)结构域或其功能性片段。IL-15为影响T细胞活化及增生的细胞激素。在影响免疫细胞活化及增生上,IL-15活性在某些方面类似于IL2,尽管已对主要的差异进行充分的定性(Waldmann, TA, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601)。

[0119] 于本发明的另一态样中,第一融合蛋白包括为IL-15变异体(此处亦称为IL-15突变体)的介白素-15(IL-15)结构域。IL-15变异体优选地包括与天然(或野生型)IL-15蛋白不同的氨基酸序列。IL-15变异体优选地与IL-15Ra多肽结合且作用为IL-15激动剂或拮抗剂。优选地,具有激动剂活性的IL-15变异体具有极大的激动剂活性。于某些具体例中,无关

于其与IL-15Ra的联合作用,IL-15变异体可作用为IL-15激动剂或拮抗剂。IL-15激动剂可例示为:相较于野生型IL-15而言具有相当的或增加的生物活性者。IL-15拮抗剂可例示为:相较于野生型IL-15而言具有减少的生物活性者,或具有抑制IL-15媒介的应答的能力者。于某些实例中,IL-15变异体以增加或减少的活性结合至IL-15R β γ C受体。于某些具体例中,相较于天然的IL-2序列,IL-15变异体的序列具有至少一个氨基酸变异,例如取代(substitution)或删除(deletion),此等变异导致IL-15激动剂或拮抗剂活性。优选地,氨基酸取代/删除在IL-15与IL-15R β 及/或 γ C发生相互作用的结构域中。更优选地,氨基酸取代/删除不会影响IL-15Ra多肽的结合性或产生IL-15变异体的能力。用以产生IL-15变异体的适当氨基酸取代/删除可如此处所提供经由理性或随机的诱变及功能检定,依据推定的或已知的IL-15结构、IL-15与同源分子(例如,具有已知结构的IL-2)的比较而加以辨别,或者可利用其他经验方法加以辨别。此外,适当的氨基酸取代可为额外氨基酸的保守性或非保守性改变及插入。优选地,本发明的IL-15变异体在成熟人类IL-15序列的位置8、61、65、72、92、101、108或111含有一个或超过一个氨基酸取代/删除;尤其,D8N("D8"意指在天然成熟人类IL-15序列中的氨基酸及残基位置,而"N"意指在IL-15变异体该位置上的取代氨基酸残基)、D8A、D61A、N65A、N72R或Q108A取代产生具有拮抗剂活性的IL-15变异体,而N72D取代将产生具有激动剂活性的IL-15变异体。

[0120] 尽管在本发明的一态样中IL-15变异体为融合蛋白复合物的组分,在其他态样中IL-15变异体为非融合蛋白。优选地,非融合型的IL-15变异体为可溶性细胞激素,其作用为IL-15激动剂或拮抗剂。于某些具体例中,非融合性IL-15变异体与IL-15Ra形成复合物,而于其他具体例中,非融合性IL-15变异体与IL-15Ra独立作用。

[0121] 类似于细胞激素,本发明的趋化激素定义为当暴露于其他细胞时负责任何数目的细胞免疫性多重效果的任何化学因子或分子。适当的趋化激素可包含,但不限于:CXC、CC、C及CX₃C趋化激素家族,以及CCL-1至CCL-28,以及CXC-1至CXC-17、XCL-1、XCL-2、CX3CL1、MIP-1b、IL-8、MCP-1及Rantes。

[0122] 生长因子包含当暴露于特定细胞时会引发所影响的细胞的增生及/或分化的任何分子。生长因子包含蛋白质与化学分子,其中某些包含:GM-CSF、G-CSF、人类生长因子及干细胞生长因子。其他生长因子亦可适用于本文所述的用途。

[0123] 毒素或细胞毒性药剂包含当暴露于细胞时对生长具有致死效果或抑制效果的任何物质。更详言之,效应物分子可为例如植物或细菌来源的细胞毒素,举例而言,如白喉毒素(diphtheria toxin,DT)、志贺毒素(shiga toxin)、相思子毒素(abrin)、霍乱毒素(cholera toxin)、蓖麻毒素(ricin)、皂草素(saporin)、绿脓杆菌外毒素(pseudomonas exotoxin,PE)、商路抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein)或白树素(gelonin)。此等毒素的生物活性片段在此技艺中为广知者,且包含例如DT A链及蓖麻毒素A链。此外,毒素可为在细胞表面具活性的药剂,举例而言,如磷脂酶(phospholipase enzyme)(例如,磷脂酶C)。

[0124] 再者,效应物分子可为化学治疗药物,举例而言,如长春地辛(vindesine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastin)、甲氨喋呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、博来霉素(bleomycin)或顺铂(cisplatin)。

[0125] 此外,效应物分子可为适用于诊断或影像学研究的可检测性标记分子。此等标记

包含生物素 (biotin) 或链霉亲和素/亲和素 (streptavidin/avidin)、可检测性纳米粒子 (nanoparticle) 或结晶、酶或其催化性活性片段、荧光标记 (例如, 绿色荧光蛋白、FITC、藻红素 (phycoerythrin)、细胞色素 (cychrome)、德州红 (texas red) 或量子点 (quantum dots)); 放射核种 (radionuclide), 例如碘-131、钷-90、镱-188 或铟-212; 磷光分子或化学冷光分子、或可经 PET、超声波或 MRI 检测的标记 (例如, 以 Gd 为主的对比剂或以顺磁金属离子 (paramagnetic metal ion) 为主的对比剂)。参见例如 Moskaug, et al. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. Cell 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982); PCT 公开案案号 W0 94/29350; PCT 公开案案号 W094/04689; PCT 公开案案号 W02005046449 及美国专利 5,620,939 中有关制造及使用包括效应物或标识物的蛋白的内容。

[0126] 包含共价连结的 IL-15 及 IL-15Ra 结构域的蛋白融合或共轭复合物具有多种重要用途。举例而言, 包括 TCR 的蛋白融合或共轭复合物可用于运送 IL-15/IL-15Ra 复合物至能够与 TCR 特异性结合的某些细胞。因此, 蛋白融合或共轭复合物提供选择性伤害或杀死包括配体的细胞的手段。能够受到包括 TCR 的蛋白融合或共轭复合物所伤害或杀死的细胞或组织的实例包含表达一种或多种能够受到 TCR 特异性结合的配体的肿瘤及经病毒或细菌感染的细胞。容易受到伤害或杀死的细胞或组织可通过此处所揭示的方法轻易地检验出来。

[0127] 本发明的 IL-15 及 IL-15Ra 多肽在氨基酸序列上适当地对应于天然存在的 IL-15 及 IL-15Ra 分子, 例如, 人类、小鼠或其他啮齿动物、或其他哺乳动物的 IL-15 及 IL-15Ra 分子。

[0128] 在某些情形中, 使本发明的蛋白融合或共轭复合物成为多价 (例如, 增加 sc-TCR 的价数) 可为有利的。特定而言, 融合蛋白复合物的 IL-15 与 IL-15Ra 结构域之间的相互作用提供产生多价复合物的手段。此外, 通过使用例如标准生物-链霉亲和素标记技术, 或通过共轭结合至适当固体担体 (例如, 乳胶珠), 可经由在一及四个蛋白 (相同或不同) 之间共价或非共价连结在一起而制造多价融合蛋白。经化学性交联连结的蛋白 (例如, 交联成树枝状聚合物 (dendrimer)) 亦为适当的多价物种。举例而言, 可通过纳入具有化学反应性侧链 (例如, Cys 或 His) 的氨基酸残基或是编码可经修饰的标识物序列 (例如, 生物素化 BirA 标识物) 的序列而修饰蛋白。此等氨基酸标识物或化学反应性氨基酸可位于融合蛋白的各种不同位置, 优选地, 于生物性活性多肽或效应物分子的活性位置的末端。举例而言, 可溶性融合蛋白的 C-端可共价连结至标识物或包含此等反应性氨基酸的其他融合蛋白。可纳入适当的侧链以化学性连结两个或更多个融合蛋白至适当的树枝状聚合物或其他纳米粒子, 以获得多价分子。树枝状聚合物为合成性化学聚合物, 其可于表面具有的任一种多种不同官能基 (D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993))。依据本发明所使用的例示性树枝状聚合物包含例如: E9 星爆型聚胺树枝状聚合物 (E9 starburst polyamine dendrimer) 及 E9 燃烧型聚胺树枝状聚合物 (E9 combust polyamine dendrimer), 其可连结胱氨酸残基。

[0129] 核酸及载体

[0130] (核酸)

[0131] 本发明另提供编码本发明融合蛋白的核酸序列 (尤其是 DNA 序列)。优选地, 该 DNA 序列由适用于染色体外复制的载体 (例如, 噬菌体、病毒、质体、噬菌粒 (phagemid)、粘质体 (cosmid)、YAC 或离合染色小体 (episome)) 所携带。特定而言, 编码所欲融合蛋白的 DNA 载体

可用于增进此处所述的制备方法以及获得显著大量的融合蛋白。可将该DNA序列插入适当的表达载体,亦即,含有所插入蛋白质编码序列(protein-coding sequence)的转录及翻译用必要元素的载体。可使用各种宿主-载体系统来表达蛋白质编码序列。此等系统包含经病毒(例如,牛痘病毒、腺病毒等)感染的哺乳动物细胞系统;经病毒(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;微生物,如含有酵母菌载体的酵母菌,或经噬菌体DNA、质体DNA或粘质体DNA转形的细菌。根据所用的宿主-载体系统,可使用多种适当的转录及翻译元素的任一个。参见上述Sambrook et al.及上述Ausubel et al.。

[0132] 本发明包含制造可溶性融合蛋白复合物的方法,该方法包括:将此处所述编码该第一与第二融合蛋白的DNA载体导入宿主细胞,在足以于细胞或培养基中表达该融合蛋白的条件下,在培养基中培养该宿主细胞,且使第一融合蛋白的IL-15结构域与第二融合蛋白的可溶性IL-15Ra结构域之间发生联合,以形成可溶性融合蛋白复合物,由该宿主细胞或培养基纯化该可溶性融合蛋白复合物。

[0133] 一般而言,根据本发明优选的DNA载体包括通过磷酸二酯键连结的核苷酸序列,其以5'朝向3'方向包括用于导入的编码TCR链的第一核苷酸序列的第一选殖位置,该第一核苷酸序列操作性连结至编码效应物分子的序列。

[0134] 由DNA载体所编码的融合蛋白组分可呈匣盒形式(cassette format)提供。术语“匣盒(cassette)”意指通过标准重组方法可轻易地将各组分取代另一个组分。特定而言,当所编码的融合复合物是用来对抗可能具有或具有发展出血清型(serotype)的能力的病原体时,配置成匣盒形式的DNA载体尤其适宜。

[0135] 通过使用适当的粘结酶(ligase),将编码TCR分子的序列连结至编码效应物肽的序列,以制造编码TCR融合复合物的载体。编码呈递的肽的DNA可通过从天然来源(例如,从适当的细胞系)单离DNA而得,或通过已知合成方法(例如,磷酸三酯方法)而得。参见例如Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (MJ. Gait, ed., 1984)。亦可使用市面上可购得的寡核苷酸自动合成剂来制备合成性寡核苷酸。一旦经过单离后,编码TCR分子的基因可通过聚合酶链反应(PCR)或其他此技艺中已知的手段加以扩增。用以扩增TCR肽基因的适当PCR引子可将限制酶切割位置(restriction site)加入PCR产物中。PCR产物优选地包含效应物肽所需的剪接位置(splice site)以及恰当表达及分泌TCR-效应物融合复合物所需的前导序列。PCR产物亦优选地包含编码接头序列的序列,或用于粘结此等序列的限制酶切割位置。

[0136] 此处所述的融合蛋白优选地通过标准重组DNA技术制成。举例而言,一旦编码TCR蛋白的DNA分子经单离后,序列可连结至编码效应物多肽的另一个DNA分子。编码TCR分子的核苷酸序列可直接接合至编码效应物肽的DNA序列,或者,更详言之,此处所讨论的编码接头序列的DNA序列可插置于编码TCR分子的序列与编码效应物肽的序列之间,并使用适当的粘结酶予以接合。所得杂合DNA分子可在适当宿主细胞中表达,以产生TCR融合复合物。将DNA分子彼此以5'朝向3'方向粘结,使得粘结后,所编码多肽的翻译读框(translational frame)不会改变(亦及,DNA分子彼此以符合读框(in-frame)的方式连结)。所得DNA分子编码符合读框的融合蛋白。

[0137] 其他核苷酸序列亦可纳入基因构筑体中。举例而言,启动子序列(其控制编码融合至效应物肽的TCR肽的序列的表达)或前导序列(其将TCR融合复合物导向细胞表面或培养

基)可纳入构筑体中或存在于构筑体所插入的表达载体中。特别优选者为免疫球蛋白或CMV启动子。

[0138] 于获得的变异TCR编码序列中,熟习此技艺者将了解TCR衍生的蛋白可在不会丧失或降低生物活性情形下通过某些氨基酸的取代、添加、删除、以及翻译后修饰而加以修饰。特定而言,已广知保守性氨基酸取代(亦即,以一氨基酸取代具有相似大小、电荷、极性、及构形的另一个氨基酸)不太可能会显著地改变蛋白质功能。为蛋白质构造成分的20个标准氨基酸可大致分成下列四个保守性氨基酸群组:非极性(疏水性)群组,包含丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸及缬氨酸;极性(不带电,中性)群组,包含天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸;正电(碱性)群组,包含精氨酸、组氨酸及赖氨酸;以及负电(酸性)群组,包含天冬氨酸及谷氨酸。于蛋白质中以一氨基酸取代相同群组内的另一个氨基酸不太可能会对蛋白质的生物活性具有不利的影响。

[0139] 核苷酸序列之间的同源性(homology)可通过DNA杂合分析测得,其中,双股DNA杂合体的安定性取决于所发生的碱基配对程度。高温及/或低盐含量的条件降低杂合体的安定性,且可改变此等条件以预防具有低于选定的同源性程度的序列发生缓冷配对(annealing)。举例而言,对于具有约55%G-C含量(G-C content)的序列,40至50℃,6倍SSC(氯化钠/柠檬酸钠缓冲液)及0.1%SDS(十二基硫酸钠)的杂合及洗涤条件表示约60至70%同源性;50至65℃,1倍SSC及0.1%SDS的杂合及洗涤条件表示约82至97%同源性;以及52℃,0.1倍SSC及0.1%SDS的杂合及洗涤条件表示约99至100%同源性。亦可利用比较核苷酸及氨基酸序列(以及测定同源性程度)用的广范围电脑程式,而提供市面上可购得的软体及免费软体资源的表单可见于Ausubel et al. (1999)。可即时取得的序列比较及多重序列比对演算法分别为基本区域比对搜寻工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)(Altschul et al., 1997)及ClustalW程式(ClustalW programs)。BLAST可于全球资讯网上在ncbi.nlm.nih.gov取得,而ClustalW的版本可在2.ebi.ac.uk取得。

[0140] 融合蛋白的组分几乎可依任何顺序加以配置,惟其各者能够实施其所预期的功能。举例而言,于一具体例中,TCR是位于效应物分子的C或N端。

[0141] 本发明优选效应物分子的大小为有助于彼等结构域所预期的功能者。本发明的效应物分子可通过各种方法(包含广知的化学交联方法)制造并融合至TCR。参见例如Means, G.E. and Feeney, R.E. (1974) in Chemical Modification of Proteins, Holden-Day. 亦参见S.S. Wong (1991) in Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press. 然而,一般而言,使用重组操作来制造符合读框的融合蛋白为优选者。

[0142] 如所述,可依数种方式来配置依据本发明的融合分子或共轭分子。于示例性配置中,TCR的C-端操作性连结至效应物分子的N-端。若有需要,该连结可通过重组方法达成。然而,于另一配置中,TCR的N-端连结至效应物分子的C-端。

[0143] 或者,或此外,有需要时,可将一种或多种额外的效应物分子插入TCR融合复合物或共轭复合物。

[0144] (载体及表达)

[0145] 可利用多种策略来使本发明的蛋白融合复合物表达。举例而言,可通过已知手段(例如,通过使用限制酶在载体中制造切位以用于插入构筑体,随后进行粘结作用)将上述的TCR基因融合构筑体并入适当的载体。接着,将含有基因构筑体的载体导入适当宿主中以

用于表达TCR融合肽。参见如上述之Sambrook et al.。可基于与选殖操作流程相关的因素凭经验选择适当载体。举例而言,载体应可与所用的宿主相容且具有对于该宿主而言恰当的复制单元(replicon)。再者,载体必须能够容纳编码所欲表达的TCR融合复合物的DNA序列。适当的宿主细胞包含真核细胞及原核细胞,优选地为那些可轻易转形且在培养基中显现快速生长性的细胞。特别优选的宿主细胞包含例如大肠杆菌(*E.coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)等原核生物,以及例如动物细胞及酵母菌菌株(例如,啤酒酵母(*S.cerevisiae*))等真核生物。一般而言,哺乳动物细胞为优选者,尤其是J558、NS0、SP2-0或CHO。其他适当的宿主包含例如昆虫细胞,如Sf9。使用习知的培养条件。参见如上述之Sambrook。接着,可筛选安定的经转形细胞系或经转染细胞系。表达本发明TCR融合复合物的细胞可通过已知程序测定。举例而言,连结至免疫球蛋白的TCR融合复合物的表达可通过对所连结的免疫球蛋白具特异性的ELISA及/或通过免疫转印法(immunoblotting)予以测定。用于检测包括连结至IL-15或IL-15Ra结构域的TCR的融合蛋白的表达的其他方法揭示于实施例中。

[0146] 如以上所概述,宿主细胞可用于制备目的,以增殖编码所欲融合蛋白的核酸。因此,宿主细胞可包含特别谋求产生融合蛋白的原核细胞或真核细胞。因此,特定而言,宿主细胞包含酵母菌、蝇类、虫类、植物、蛙类、哺乳动物细胞以及能够增殖编码该融合物的核酸的器官。可使用的哺乳动物细胞系的非限制性实例包含CHO dhfr-细胞(Urlauband Chasm, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216(1980))、293细胞(Graham et al,J Gen.Virol.,36:59(1977))、或骨髓瘤细胞,如SP2或NS0(Galfre and Milstein,Meth.Enzymol.,73(B):3(1981))。

[0147] 能够增殖编码所欲融合蛋白的核酸的宿主细胞亦涵括非哺乳动物真核细胞,包含昆虫(例如,草地贪夜蛾(*Sp.frugiperda*))、酵母菌(例如,啤酒酵母(*S.cerevisiae*))、裂殖酵母(*S.pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、克鲁维酵母(*K.lactis*)、汉森酵母(*H.polymorpha*);如Fleer,R.,Current Opinion in Biotechnology,3(5):486496(1992)中所概论)、真菌及植物细胞。亦涵括某些原核生物,例如大肠杆菌(*E.coli*)及杆菌属(*Bacillus*)。

[0148] 可通过用于转染细胞的标准技术将编码所欲融合蛋白的核酸导入宿主细胞。术语“转染(transfecting)”或“转染(transfection)”意图涵括用于将核酸导入宿主细胞的所有习知技术,包含磷酸钙共沉淀法(calcium phosphate co-precipitation)、DEAE-葡聚糖媒介的转染(DEAE-dextran-mediated transfection)、脂质体转染(lipofection)、电穿孔(electroporation)、微注射(microinjection)、病毒转导及/或插入。用于转染宿主细胞的适当方法可见于如上述的Sambrook et al以及其他实验室课本。

[0149] 根据本发明,可使用各种启动子(转录起始调节区)。恰当启动子的选择取决于所提出的表达宿主。可使用得自异源性来源的启动子,只要其在所选的宿主中具有功能即可。

[0150] 启动子的选择亦取决于肽或蛋白质所欲的产生效率及程度。常使用诱发性启动子(例如,tac)以急剧地增加大肠杆菌中的蛋白质表达程度。蛋白质的过量表达(overexpression)可能对宿主细胞有害。结果,可能会限制宿主细胞的生长。使用诱发性启动子系统使得宿主细胞得以在诱发基因表达之前培育至可接受的密度,藉此促进较高的产物产率。

[0151] 根据本发明,可使用各种讯息序列。可使用与TCR编码序列同源的讯息序列。或者,亦可使用经选定或设计成会在表达宿主中有效分泌及制造加工的讯息序列。举例而言,适当的讯息序列/宿主细胞配对包含用于在枯草杆菌中表达的枯草杆菌*sacB*讯息序列(*B.subtilis**sacB* signal sequence),及啤酒酵母 α -交配因子(*Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor)或用于巴斯德毕赤酵母分泌作用的巴斯德毕赤酵母酸磷酸盐*phoI*讯息序列(*P.pastoris* acid phosphatase *phoI*signal sequence)。讯息序列可通过编码该讯息肽酶(signal peptidase)切割位置的序列直接连接至蛋白质编码序列,或通过由通常少于十个密码子(codon)所组成的短核苷酸桥联(bridge)连接至蛋白质编码序列,其中,该桥联确保正确的下游TCR序列读框。

[0152] 已对真核生物蛋白表达系统鉴别出用于增进转录及翻译的元素。举例而言,将花椰菜镶嵌病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV) 启动子1000碱基对(bp) 定位于异源性启动子任一侧可在植物细胞中提升转录程度10至400倍。表达构筑体亦应包含适合的翻译起始序列。为了恰当的翻译起始而将表达构筑体纳入Kozak一致性序列(Kozak consensus sequence)的修饰作用可增加翻译程度10倍。

[0153] 通常使用筛选标志,其可为表达构筑体的一部分或与表达构筑体分开(例如,由表达载体携带),使得该标志可插入不同于感兴趣的基因的位置。标志的实例包含赋予对抗生素的抗性的标志(例如,bla对大肠杆菌宿主细胞赋予对胺苄青霉素(ampicillin)的抗性,nptII对广大种类的原核细胞及真核细胞赋予对卡那霉素(kanamycin)的抗性)或容许宿主在基本培养基(minimal medium)生长的标志(例如,HIS4使巴斯德毕赤酵母或补充有组氨酸的啤酒酵母(*His.sup.-S.cerevisiae*)能够在组氨酸缺乏下生长)。筛选标志具有其本身的转录及翻译起始及终止调节区,而使该标志得以独立表达。若利用抗生素抗性作为标志,则用于筛选的抗生素浓度将视抗生素而异,一般介于10至600 μ g抗生素/培养基(mL)的范围。

[0154] 通过使用已知的重组DNA技术来组装表达构筑体(Sambrook et al.,1989;Ausubel et al.,1999)。限制酶酶切及粘结为用于连接两个DNA片段的基本步骤。DNA片段的终端在粘结之前可能需要予以修饰,此修饰作用可通过填补突出部分(overhang)、以核酸酶(nuclease)(例如,ExoIII)删除片段的终端部分、定点突变(site directed mutagenesis)、或通过以PCR添加新的碱基对而完成。可使用多接头(polylinker)及接合子(adaptor)来促进所选择片段的连接。表达构筑体典型地在利用酶切、粘结及大肠杆菌的转形的循环之阶段中予以组装。多种适用于构筑表达构筑体的选殖载体在此技艺中为已知者(.lambda.ZAP and pBLUESCRIPT SK-I,Stratagene,LaJolla,Calif,pET,Novagen Inc.,Madison,Wis.-记载于Ausubel et al.,1999),且对本发明而言特定的选择并不重要。选殖载体的选择将受到经选定以用来将表达构筑体导入宿主细胞的基因转移系统(gene transfer system)所影响。在各阶段结束时,所得构筑体可通过酶切、DNA序列、杂合及PCR分析予以分析。

[0155] 表达构筑体可以选殖载体构筑体(线性或环状)的形式转形至宿主中,或可从选殖载体中移除而以其本身使用或导入传递载体(delivery vector)。传递载体促使表达构筑体在所选定的宿主细胞类型中的导入及维持。表达构筑体是通过多种已知基因转移系统(例如,自然转形能力(natural competence)、化学媒介的转形、原生质体转形(protoplast transformation)、电穿孔、基因枪转形(biolistic transformation)、转染或

共轭)的任一个导入宿主细胞(Ausubel et al.,1999;Sambrook et al.,1989)。所选择的基因转移系统取决于所使用的宿主细胞及载体系统。

[0156] 举例而言,可通过原生质体转形或电穿孔将表达构筑体导入啤酒酵母。啤酒酵母的电穿孔可轻易完成,且产生与原生质球状体转形(spheroplast transformation)相当的转形效率。

[0157] 本发明另提供用于单离感兴趣的融合蛋白的制程。在此过程中,已导入操作性连结至调节序列的编码感兴趣的蛋白质之核酸的宿主细胞(例如,酵母菌、真菌、昆虫、细菌或动物细胞)是在融合蛋白存在下于培养基中以生产规模生长,以刺激编码感兴趣的融合蛋白的核苷酸序列的转录。随后,从所收取的宿主细胞中或从培养基中单离感兴趣的融合蛋白。可使用标准蛋白质纯化技术从培养基中或从所收取的宿主细胞中单离感兴趣的蛋白质。特定而言,可使用纯化技术由各种器具(包含转瓶(roller bottle)、旋转瓶(spinner flask)、组织培养盘、生物反应器或发酵器)大规模(亦即,以至少毫克(milligram)量)表达及纯化所欲融合蛋白。

[0158] 所表达的蛋白融合复合物可通过已知方法单离及纯化。典型地,将培养基离心,接着通过亲和性或免疫亲和性层析(例如,蛋白-A(Protein-A)或蛋白-G(Protein-G)亲和性层析),或包括使用与融合复合物(例如,经连结的TCR或其免疫球蛋白区)结合的单株抗体的免疫亲和性操作流程来纯化上清液。本发明的融合蛋白可通过已知技术的适当组合予以分离及纯化。此等技术包括例如:利用溶解度的方法,如盐沉淀及溶剂沉淀;利用分子量的不同的方法,如透析、超过滤、凝胶过滤及SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;利用电荷的不同的方法,如离子交换管柱层析;利用特定亲和性的方法,如亲和性层析;利用疏水性的不同的方法,如逆相高效液相层析;以及利用等电点的不同的方法,如等电聚焦电泳,金属亲和性管柱,如Ni-NTA。参见如上述的Sambrook et al.及Ausubel et al.有关于此等方法的内容。

[0159] 优选地,本发明的融合蛋白为实质上纯的。换言之,融合蛋白已从自然伴随而得的细胞取代物中单离,使得融合蛋白优选地以至少80%或90%至95%同质性(homogeneity)(w/w)存在。对于许多医药、临床及研究应用而言,具有至少98至99%同质性(w/w)的融合蛋白为最优选者。一旦经实质纯化后,融合蛋白应为实质上不含污染物(对于治疗应用而言)。一旦经部分纯化或纯化至实质纯度后,可溶性融合蛋白可于治疗上使用,或在实施如此处所揭示的活体外或活体内分析中使用。实质纯度可通过各种标准技术(例如,层析及凝胶电泳)予以测定。

[0160] 本发明的经截头(truncated)TCR融合复合物含有足以被截头的TCR分子,故该TCR融合复合物可在表达后分泌至培养基中。因此,经截头TCR融合复合物将不包含富有疏水性残基的区域,典型地为TCR分子的跨膜及细胞质结构域。因此,举例而言,对于本发明优选的经截头DR1 TCR分子而言,TCR分子的b链约第199至237个残基及a链约第193至230个残基优选地不包含在经截头TCR融合复合物中。

[0161] 本发明的TCR融合及共轭复合物适用于与受感染的细胞或可能因一种或多种疾病而成为受感染的细胞于活体外或活体内使用。

[0162] 方法

[0163] (治疗)

[0164] 本发明包含预防或治疗患者的疾病的方法,其中,该疾病细胞表达疾病相关抗原,

该方法包括：对该患者给予包括识别疾病相关抗原的生物性活性多肽的可溶性融合蛋白复合物，在抗原表达的疾病细胞与IL-15R表达的免疫细胞之间形成特异性结合复合物（桥联），其足以定位该免疫细胞，以及伤害或杀死该疾病细胞，其足以预防或治疗患者的疾病。

[0165] 本发明包含预防或治疗患者的疾病的方法，其中，该疾病细胞表达疾病相关抗原，该方法包括：将承载该IL-15R链的免疫细胞与包括识别疾病相关抗原的生物性活性多肽的可溶性融合蛋白复合物（例如，肽/MHC复合物）混合，对患者给予免疫细胞-融合蛋白复合物，在抗原表达的疾病细胞与IL-15R表达的免疫细胞之间形成特异性结合复合物（桥联），其足以定位该免疫细胞，以及伤害或杀死该疾病细胞，其足以预防或治疗患者的疾病。

[0166] 本发明亦包含杀死靶细胞的方法，该方法包括：使多种细胞与可溶性融合蛋白复合物接触，其中，该多种细胞进一步包括承载有权利要求1的IL-15结构域所识别的IL-15R链的免疫细胞，以及承载有此处所述的生物性活性多肽的至少一个所识别的抗原的靶细胞；在该靶细胞的抗原与该免疫细胞的IL-15R链之间形成特异性结合复合物（桥联），其足以结合与活化该免疫细胞；以及通过所结合的经活化免疫细胞杀死该靶细胞。

[0167] 本发明亦包含经由产生可溶性融合蛋白复合物而增加IL-15的活体内半衰期及/或增进其安定结合免疫细胞的能力（例如，增加细胞表面滞留时间）的方法。举例而言，如此处所述，执行融合蛋白复合物的药物动力学参数及细胞表面滞留时间的评估并与IL-15比较。基于其治疗利用性的改善，具有增加的血清半衰期或细胞表面滞留时间的融合蛋白复合物为优选者。

[0168] 可治疗的疾病的实例包含，但不限于：肿瘤形成(neoplasia)（包含癌症）、或病毒感染。“肿瘤形成”意指由不当的高程度细胞分裂、不当的低程度细胞雕亡(apoptosis)或这二个所造成的任何疾病，或导致不当的高程度细胞分裂、不当的低程度细胞雕亡或此二者的任何疾病。举例而言，癌症为肿瘤形成的实例。癌症的实例包含，但不限于：白血病（例如，急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、急性成髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、急性红细胞性白血病、慢性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病）、真性红细胞增多症(polycythemia vera)、淋巴瘤（何杰金氏症(Hodgkin's disease)、非何杰金氏症）、巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病(heavy chain disease)、及实体肿瘤，如肉瘤及恶性肿瘤（例如，纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、依汶氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳突癌、乳突腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管肺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精母细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor)、子宫颈癌、子宫癌、睪丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星状细胞瘤、神经管胚细胞瘤、颅咽瘤、类室管膜瘤、松果腺瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、寡树突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经胚细胞瘤、及视网膜胚细胞瘤）。淋巴增生性疾病亦视为增生性疾病。

[0169] 本发明亦包含刺激哺乳动物的免疫应答的方法，该方法包括：对该哺乳动物给予有效量的如此处所述的可溶性融合蛋白复合物或IL-15变异体。本发明亦包含抑制哺乳动物的免疫应答的方法，该方法包括：对该哺乳动物给予有效量的如此处所述的可溶性融合

蛋白复合物或IL-15变异体。于免疫抑制的情形中,包括IL-15拮抗剂或缺乏与IL-15 $\beta\gamma$ c复合物结合的能力之IL-15结构域的融合蛋白复合物或IL-15变异体可为特别有利者。

[0170] 至于融合蛋白复合物治疗的使用说明,可将经培养的细胞以单一血清型的病原体感染。接着,将受感染的细胞与指定的融合蛋白复合物于活体外接触。如以上所讨论,配置融合蛋白复合物,使得毒杀性结构域通过TCR的联合而呈现至受感染的细胞。将生物活性分子导入细胞后(一般而言,低于约30分钟),使该细胞引发所欲的效应高达约2至24小时,典型地约18小时的时间。在此时间后,在适当缓冲液或细胞培养基中洗涤该细胞,接着评估存活率。对通过融合蛋白复合物的细胞毒杀或伤害所分配的时间将随所选特定效应物分子而异。然而,存活率则经常可在约2至6小时,且高达约24小时之后评估。下文中将更详细地说明,细胞存活率可通过监测某些广知的染料(例如,台盼蓝(trypan blue))或发光体的摄入性而轻易地予以测定及定量。

[0171] 与本发明的融合蛋白复合物一起培养的细胞可通过标准方法分析存活率。于一例示性方法中,细胞存活率可通过测定在培养后或培养期间的DNA复制而轻易地予以分析。举例而言,优选的分析涉及一种或多种可检测性标记核苷(如放射性标记胸腺嘧啶核苷)的细胞摄入。该摄入可通过多种习知方法(包含三氯乙酸(TCA)沉淀,随后进行闪烁计数)方便地测得。其它细胞存活率方法包含广知的台盼蓝排除技术(trypan blue exclusion technique)或以WST-1为主的增生分析。

[0172] 本发明融合复合物的TCR分子在氨基酸序列上适当地对应天然存在的TCR分子,例如,人类、小鼠或其他啮齿动物、或其他哺乳动物的TCR分子。

[0173] 因此,用于抑制自体免疫或发炎反应的本发明治疗方法包含融合蛋白复合物,其包括对疾病相关抗原具结合特异性的T细胞受体或抗体。优选地,给予“经截头的”可溶性TCR复合物,亦即,TCR复合物不含有跨膜部分。融合蛋白复合物亦包括作用为IL-15拮抗剂的IL-15变异体以抑制不必要的免疫应答。给予之后,TCR或抗体结构域将融合蛋白复合物标靶至疾病位置,于此处IL-15拮抗剂抑制自体免疫或发炎反应。此种融合蛋白复合物可特别适用于治疗过敏、自体免疫疾病(例如,多发性硬化症)、胰岛素依赖性糖尿病及风湿性关节炎或移植排斥。类似的非靶向方法可使用拮抗剂IL-15变异体作为非融合蛋白而进行。

[0174] 用于引发免疫应答的本发明其他治疗方法为在任何共同刺激性效应物分子(例如,细胞激素)存在下给予有效量的本发明蛋白融合复合物,藉以在与生物活性多肽结合的呈递抗原的所在处引发所欲的免疫应答。

[0175] 本发明不同的疗法亦可与其它已知治疗剂(例如,消炎药物)组合使用,以提供对疾患更有效的治疗。举例而言,免疫抑制性蛋白融合复合物或IL-15变异体可与消炎药物(例如,皮质类固醇及非类固醇药物)组合使用,以用于治疗自体免疫疾患及过敏。

[0176] 本发明的化合物尤其适用于具有或疑有恶性疾病、疾患或病症的人类患者。本发明的化合物特别适用于标靶至人类患者中的特定肿瘤抗原。可依据本发明治疗的疾病的具体实例包含癌症,例如乳癌、前列腺癌等;病毒感染,例如HCV、HIV等;以及此处所述及病症的其他特定疾患。

[0177] 不期望受到理论所局限,咸信本发明的多重及不同共价连结化合物(亦即,至少IL-15与至少一个TCR组合)可例如通过增加IL-15对个体的靶抗原的标靶性而显著地增进IL-15的效力。

[0178] 再者,通过共价连结的优点,本发明的共轭物实质上同时对个体细胞呈递IL-15及TCR,该效果可能无法通过以未共价连结化合物的药物“调和液(cocktail)”调配物给予相同化合物而轻易地达成。

[0179] 亦有报导指出利用一种药物的治疗可进而使患者对另一个药物敏感。因此,经由本发明的共轭物实质上同时对个体细胞呈递IL-15及TCR可例如通过提供协同性结果及/或通过增进产生免疫应答而增进药物活性。

[0180] (诊断)

[0181] 对特定pMHC配体具特异性的高亲和性或多价TCR蛋白适用于诊断动物,包含咸信患有与特定pMHC相关的疾病的人类。本发明的融合蛋白复合物适用于实质上检测任何抗原,包含但不限于彼等与肿瘤病症、异常蛋白、自体免疫疾病或细菌、真菌、病毒、原生动物、酵母菌、线虫或其他寄生虫感染或寄生相关者。

[0182] 于用于检测个体的肿瘤或病毒感染细胞或组织的一方法中,其中,在MHC复合物的背景中该细胞或组织包括呈递于细胞或组织上的肿瘤或病毒相关肽抗原,该方法包括:a)在所呈递的肽抗原与TCR之间形成特异性结合复合物的条件下,对个体给予包括可溶性TCR的本发明可溶性融合蛋白复合物;以及b)检测特异性结合复合物,作为包括所呈递的肿瘤或病毒相关肽抗原的肿瘤或病毒感染细胞或组织的指标。

[0183] 融合蛋白复合物亦可用于诊断会产生异常蛋白的某些基因疾患。融合蛋白复合物的例示性应用为诊断及治疗具有已知的pMHC的自体免疫疾病。关于引起免疫破坏的自体抗原(autoantigen),已对第I型糖尿病进行相当完整的定性。多发性硬化症、腹腔疾病、炎性肠胃疾病、克隆氏症(Crohn's disease)及风湿性关节炎为此等应用的其他候选疾病。

[0184] 包括IL-15变异体多肽的本发明融合蛋白复合物可尤其适用于此等应用。举例而言,如此处所述,对于包括TCR分子的融合蛋白复合物,IL-15变异体结构域与IL-15Ra多肽之间的相互作用产生具有增进的抗原结合活性的多价TCR分子。再者,IL-15变异体含有氨基酸变异,其可能消除对承载IL-15RB γ C受体的细胞的结合性,藉此降低对免疫细胞的非特异性或非靶向结合。结果,利用此等融合蛋白复合物可达成增进的TCR特异性抗原检测。此外,如此处所述,本发明的融合蛋白复合物可另外经由肽标识物序列或共轭至可检测性标记而予以多聚体化。

[0185] 剂量及给予

[0186] 本发明化合物的给予可通过各种适当的途径进行,包含口服、局部(包含经皮、口腔或舌下)、经鼻及非经肠道(包含腹膜内、皮下、静脉内、皮内或肌肉内注射),一般以口服或非经肠道为优选者。亦应了解的是优选的给予方法及剂量可依例如接受者的状况及年龄而异。

[0187] 本发明化合物可单独用于疗法中或联合其他药剂(例如彼等具有经认可的药理活性者)来治疗所欲的适应症。例示性药剂包含经认可的疗法,例如外科手术、放射线、化学疗法及其他形式的免疫疗法(例如,疫苗、以抗体为主的疗法)。需要时,可在此等疗法之前、期间或之后给予本发明化合物。

[0188] 尽管可单独给予一种或多种本发明化合物,其亦可呈与习知赋形剂混合的医药组合物的一部分存在,该赋形剂亦即医药上可接受的有机或无机载剂物质,其适用于非经肠道、口服或其他所欲给予方式以及不会与活性化合物有害地反应且不会对其接受者有害。

本发明的医药组成物一般包括一种或多种本发明的融合蛋白复合物或IL-15变异体或编码此等化合物的DNA构筑体,连同一种或多种可接受的载剂。从可与调配物的其他成分相容且不会对其接受者有害的意义上而言,载剂必须为“可接受的”。适当的医药上可接受的载剂包括,但不限于:水、盐溶液、醇类、植物油、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉糖(amylose)、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡(viscous paraffin)、香料油、脂肪酸单甘油酯及二甘油酯、石油醚脂肪酸酯(petroethral fatty acid ester)、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯啉酮(polyvinylpyrrolidone)等。可将医药制剂进行消毒,以及若有需要,与辅助剂混合,该辅助剂为例如,润滑剂、防腐剂、安定剂、湿润剂、乳化剂、影响渗透压的盐类、缓冲剂、着色剂、调味剂及/或芳香族物质等,该等辅助剂不会与活性化合物有害地反应。

[0189] 对于非经肠道的应用,尤其适当者为溶液(优选地为油性或水性溶液)及悬浮液、乳液或植入物(包含栓剂)。安瓿为方便的单位剂型。

[0190] 对于经肠道的应用,尤其适当者为锭剂、丸剂或胶囊,其具有滑石及/或碳水化合物载剂、粘结剂等,载剂优选地为乳糖及/或玉米淀粉及/或马铃薯淀粉。可使用糖浆、酞剂等,于该等制剂中采用甜的媒剂。可调配成缓释型组成物,其包含其中活性成分例如通过微包裹、多重包覆等而受到可差异性降解的涂层所保护的彼等物质。

[0191] 本发明的治疗性化合物亦可并入脂质体(liposome)中。该并入可依据已知的脂质体制备程序(例如,声裂法(sonication)及挤出法(extrusion))而进行。制备脂质体的适当习知方法亦揭示于例如A.D.Bangham et al.,J.Mol.Biol.,23:238-252(1965);F.Olson et al.,Biochim.Biophys.Acta,557:9-23(1979);F.Szoka et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.,75:4194-4198(1978);S.Kim et al.,Biochim.Biophys.Acta,728:339-348(1983);以及Mayer et al.,Biochim.Biophys.Acta,858:161-168(1986)。

[0192] 本发明亦提供引起哺乳动物(例如,人类)的免疫应答的方法,其包含对哺乳动物(例如,人类)注射疫苗以对抗致病原(infectious agent)或靶疾患(例如,癌症)。

[0193] 此等方法包括对哺乳动物给予有效量的包括编码本发明融合蛋白复合物或IL-15变异体的DNA载体的DNA序列。融合蛋白复合物及IL-15变异体的表达载体的制备叙述于上文以及以下实施例中。已有报导指出给予质体DNA的方法、由经给予个体的细胞摄入该DNA的方法、以及表达蛋白质的方法。参见Ulmer,J.B.,et al.,Science(1993) 259:1745-1749。

[0194] 编码本发明融合蛋白复合物与IL-15变异体的DNA载体优选地通过肌肉内注射适当地给予至哺乳动物(包含人类)。将cDNA给予至哺乳动物的骨骼肌,随后由肌肉细胞摄入所给予的表达载体以及表达该DNA所编码的蛋白质已详述于Ulmer et al.,且其代表例示性操作流程[Ulmer,J.B.,et al.,Science 259:1745-1749]。对于指定治疗应用而言最理想的剂量可通过习知手段测得。

[0195] 除了治疗人类疾患之外,本发明融合蛋白复合物及IL-15变异体以及编码此等分子的本发明DNA构筑体对于兽医应用将具有重要的用途,例如,治疗家畜(例如,牛、羊等)及宠物(例如,狗及猫)的疾患。

[0196] 应了解的是,本发明指定的融合蛋白复合物及IL-15变异体或编码该融合蛋白复合物及IL-15变异体的DNA构筑体用于指定疗法的实际优选量将依下列各者而异:欲使用的特定一种或多种活性化合物、所调配的特定组成物、应用模式、特定给予位置、患者的体重、一般健康状况、性别等、欲治疗的特定适应症等,以及由彼等熟习此技艺者(包含主治医师

或兽医)所认定的其他此种因子。对指定给予操作流程而言最理想的给予率可由彼等熟习此技艺者使用习知的剂量决定测试法轻易地测得,该剂量决定测试法是例如对于前述指导方针及此处所揭示的分析而进行。

[0197] 实施例

[0198] 应了解,本发明不应意图局限于所述实施例;或更确切而言,本发明应意图包含此处所提供的任何及所有应用以及具通常技艺者所知的技术领域内的所有等价变化型。

[0199] 实施例1-包含scTCR/huIL15及scTCR/huIL15R α 融合蛋白的融合蛋白复合物的设计

[0200] 已确立IL-15稳定地结合至IL-15R α 的细胞外结构域,且所得复合物能够经由该中间型或高亲和性IL-15R复合物调控(亦即,刺激或阻断)免疫应答(1至4)。此外,已证实单链TCR或抗体多肽可融合至细胞激素及其他免疫效应物结构域,且此等双特异性融合分子保有两种融合结构域的功能活性(5至8)。再者,已显示多价型TCR对其配体提供增强的结合性(9)。因此,本发明的特征为融合蛋白复合物,其包括:至少一种融合蛋白,其中,第一TCR多肽融合至IL-15;以及至少一种融合物,其中,第二TCR多肽融合IL-15R α 的细胞外结构域,使得该两种融合蛋白经由IL-15与IL-15R α 结构域之间的结合相互作用而形成复合物。于此融合蛋白复合物中,TCR多肽可相同或不同,且呈单链或异二聚体形式。

[0201] 含有单链TCR多肽的融合蛋白复合物的实例概要显示于图1A。于此融合蛋白复合物中,多价TCR结构域对其配体提供增加的结合性/亲和性。例示性配体包括,但不限于肽/MHC复合物。IL-15/IL-15R α 结构域提供免疫调控活性。包括融合蛋白复合物的代表性融合蛋白构筑体概要显示于图1B。于此等构筑体中,TCR多肽为由肽接头序列((G4S)₄)连结的TCR-V α 及TCR-V β -C β 结构域所构成的单链TCR(264scTCR)。scTCR多肽直接或经由肽接头序列融合至IL-15或IL-15R α 结构域。开始scTCR多肽为容许可溶性表达的讯息肽(或前导肽)序列。随后讯息肽在蛋白质运送期间被切割,以产生成熟的融合蛋白。于融合蛋白复合物的其他实例中,可使抗体结构域取代描绘于图1A及1B中的TCR结构域。此等抗体可呈单链或异二聚体形式。对于上述任一种融合蛋白复合物,序列可为人类序列或非人类序列(例如,但不限于小鼠序列)。此等序列可用于作为部分或所有融合蛋白结构域。此外,结构域的配置可不同,只要融合蛋白保有可溶性及功能即可。

[0202] 实施例2-c264scTCR/huIL15基因融合物于表达载体中的构筑

[0203] 对于p53(aa264-272)-特异性TCR的TCR基因的单离及定性如前文所述(5至7)。为获得人类IL15及IL15R α 基因,以HISTOPAGUE-1077(Sigma)从200mL输血者的血液(Lot# 2238789,Community Blood Bank,Miami,FL)中单离人类PBMC。在CO₂培养器,于含有10% FBS的IMDM中,以30ng/ml的PMA(Sigma)、200ng/ml的依诺霉素(ionomycin)、及220ng/ml的重组人类IL2将细胞(1.5×10^7)活化10天。将经活化的细胞(每mL 1×10^7)冷冻于-70C,以供进一步应用。为从经活化的PBMC中纯化总RNA,依据制造者的操作流程使用RNEASY PLUS MINI(Qiagen)。自总RNA扩增含有编码区以及5'及3'侧区(flanking region)部分的人类IL15基因,该扩增为利用前引子(front primer)

[0204] 5'-CACCTTGCCATAGCCAGCTCTTC-3'

[0205] 与后引子(back primer)

[0206] 5'-GTCTAAGCAGCAGAGTGATGTTTG-3'

[0207] 通过SUPERScript III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen), 依据下列条件而进行: 对于反转录 (RT); 55C, 30分钟; 94C, 2分钟; 对于扩增cDNA; 94C, 30秒; 53C, 30秒; 68C, 1分钟; x40个循环; 68C, 5分钟。通过在1%琼脂糖凝胶 (agarose gel) 上电泳而分开并单离600bp的人类IL15PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组 (Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)) 从琼脂糖中纯化cDNA产物。自600bp人类IL15 cDNA扩增成熟人类IL15蛋白的基因, 该扩增为利用前引子

[0208] 5'-TGGTTAACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

[0209] 与后引子

[0210] 5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGTGATGAACATTTGGAC-3'

[0211] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行: 94C, 1分钟; 63C, 1分钟; 72C, 1分钟; x35个循环; 72C, 10分钟。将成熟人类IL15蛋白基因从凝胶纯化并依据制造者的操作流程以TOP0反应选殖入穿梭载体 (shuttle vector) pcDNA3.1 Directional TOP0表达载体 (Invitrogen)。基于诊断型PCR (diagnostic PCR) 鉴定含有成熟人类IL15蛋白基因插入物的纯系 (clone), 该鉴定是利用前引子

[0212] 5'-TGGTTAACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

[0213] 与后引子

[0214] 5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGTGATGAACATTTGGAC-3'

[0215] 通过RedTag (Sigma) 于下列条件下而进行: 94C, 1分钟; 63C, 1分钟; 72C, 1分钟; x35个循环; 72C, 10分钟。依据制造者的操作流程利用QUICK START KIT (Beckman Coulter) 以GenomeLab DyeTermination Cycle Sequencing进行DNA定序来确认正确纯系的序列。通过以HpaI及MluI酶切将成熟人类IL15蛋白基因从穿梭载体移出, 并粘结至经HpaI及MluI酶切的表达载体pNEF38-c264scTCR。pNEF38-c264scTCR表达载体含有编码连结至p53 (aa264-272) 肽特异性可溶性嵌合单链TCR蛋白的免疫球蛋白轻链前导 (或分泌讯息) 序列 (c264scTCR) 的基因片段 (5)。载体亦含有5'调节/增强子 (enhancer) 区、转录调节区及启动子区、翻译调节/起始/终止序列 (包含Kozak一致性序列及poly-A终止区)、以及具有推定的基质结合调节元素 (matrix attachment regulatory element) 的3'调节区。载体亦含有容许在哺乳动物细胞 (SV40启动子/neoR基因/poly-A) 及细菌 (ori/amp基因) 中选择性生长的DNA序列。将编码成熟人类IL15蛋白的DNA片段选殖进入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR/huIL15融合基因: 3'-免疫球蛋白轻链前导子-264 TCRV- α -肽接头-264 TCR V- β -人类TCR C- β -人类IL-15。所得载体 (pNEF38-c264scTCR/huIL15) (如图2A所示) 是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。c264scTCR/huIL15融合基因及蛋白质的序列 (包含前导序列) 分别显示于图2B及图2C。

[0216] 实施例3-含有突变的人类IgG1铰链区 (hinge region) 的c264scTCR/huIL15基因融合物于表达载体中的构筑

[0217] pNEF38-c264scTCR/huIL15载体的构筑详述于实施例2。使用来自人类IgG1H链的突变铰链区 (其中, 三个半胱氨酸残基经由三个丝氨酸残基所取代) 连结至c264scTCR及huIL15。铰链区是从前述的264scTCR/IgG1基因突变及扩增而来 (7), 该扩增是利用前引子

[0218] 5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

[0219] 与后引子

[0220] 5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

[0221] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件进行:94C,30秒;65C,30秒;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离70bp突变的人类IgG1铰链PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组(Qiagen)从琼脂糖中纯化cDNA产物。以HpaI及MluI酶切突变铰链区基因并粘结至经HpaI及MluI酶切的pNEF38-c264scTCR。基于诊断型PCR鉴定含有突变铰链区基因插入物的纯系,该鉴定是利用前引子

[0222] 5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

[0223] 与后引子

[0224] 5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

[0225] 通过RedTag (Sigma) 于下列条件下进行:94C,30秒;64C,30秒;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。自实施例2所述的pNEF38-c264scTCR/huIL15载体扩增huIL15,该扩增是利用前引子

[0226] 5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

[0227] 与后引子

[0228] 5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

[0229] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,30秒;65C,30秒;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离380bp huIL15 PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组(Qiagen)从琼脂糖中纯化cDNA产物。以MluI及XbaI酶切huIL15基因并粘结至经MluI及XbaI酶切的含有突变铰链基因的pNEF38-c264scTCR。基于诊断型PCR鉴定含有huIL15基因插入物的纯系,该鉴定是利用前引子

[0230] 5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

[0231] 与后引子

[0232] 5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

[0233] 通过RedTag (Sigma) 于下列条件下进行:94C,30秒;64C,2分钟;70C,2分钟;x35个循环;72C,10分钟。依据制造者的操作流程利用QUICK START KIT (Beckman Coulter) 以GenomeLab DyeTermination Cycle Sequencing进行DNA定序来确认正确纯系的序列。pNEF38-c264scTCR表达载体详述于上述实施例2。编码突变的人类IgG1铰链区及成熟人类IL15蛋白的DNA片段选殖进入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR-hmt-huIL15融合基因:3'-免疫球蛋白轻链前导子-264TCRV- α -肽接头-264TCR V- β -人类TCR C- β -突变的人类IgG1铰链-人类IL-15。所得载体(pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15) (如图3A所示) 是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。c264scTCR-hmt-huIL15融合基因及蛋白质的序列(包含前导序列) 分别显示于图3B及图3C。

[0234] 实施例4-c264scTCR/huIL15R α Δ E3基因融合物于表达载体中的构筑

[0235] 如上所述制备PBMC的总RNA。自PBMC的总RNA扩增含有编码区以及5'及3'侧区部分的人类IL15R α 基因,该扩增是利用前引子

[0236] 5'-AGTCCAGCGGTGTCCTGTGG-3'

[0237] 与后引子

[0238] 5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'

[0239] 通过SUPERScript III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen) 依据

下列条件而进行:对于RT;55C,30分钟;94C,2分钟;对于扩增cDNA;94C,1分钟;66C,1分钟;72C,1分钟;x35个循环;72C,5分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离970bp人类IL15R α PCR cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组(Qiagen)从琼脂糖中纯化cDNA产物。自970bp人类IL15R α cDNA扩增人类IL15R α 细胞外结构域基因,该扩增是利用前引子

[0240] 5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

[0241] 与后引子

[0242] 5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'

[0243] 通过Pfi iULTRA (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,1分钟;72C,2分钟;x35个循环,72C,10分钟。将人类IL15R α 细胞外结构域基因从凝胶纯化并依据制造者的操作流程以TOP0反应选殖入穿梭载体pcDNA3.1 Directional TOP0表达载体(Invitrogen)。基于诊断型PCR选择含有正确人类IL15R α 细胞外结构域基因插入物的纯系,并依据制造者的操作流程利用QUICK START KIT以GenomeLabDye Termination Cycle Sequencing进行DNA定序予以确认。该基因经判定为人类IL15 R α Δ E3细胞外结构域基因。通过以HpaI及MluI酶切将人类IL15 R α Δ E3细胞外结构域基因从穿梭载体移出,并粘结至经HpaI及MluI酶切的pNEF38-c264scTCR。将编码人类IL15R α Δ E3细胞外结构域的DNA片段选殖进入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR/huIL15R α 融合基因:3'-免疫球蛋白轻链前导子-264TCR V- α -肽接头-264TCR V- β -人类TCR C- β -IL15R α Δ E3细胞外结构域。含有正确IL15 R α Δ E3细胞外结构域基因插入物的所得载体(pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Δ E3)(如图4A所示)是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。的序列c264scTCR/huIL15R α Δ E3基因及蛋白质分别显示于图4B及图4C。

[0244] 实施例5-c264scTCR/huIL15R α Sushi基因融合物于表达载体中的构筑

[0245] 如上所述制备PBMC的总RNA。自970bp人类IL15R α cDNA(参见实施例3)扩增人类IL15R α Sushi基因,该扩增是利用前引子

[0246] 5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

[0247] 与后引子

[0248] 5'-TTGTTGACGCGTTTATCTAATGCATTTGAGACTGG-3'

[0249] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,1分钟;66C,1分钟;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。将人类IL15R α Sushi基因的PCR产物从凝胶纯化并以HpaI及MluI酶切。将该基因粘结至经HpaI及MluI酶切的pNEF38-c264scTCR。将编码人类IL15R α Sushi结构域的DNA片段选殖进入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR/huIL15R α 融合基因:3'-免疫球蛋白轻链前导子-264TCR V- α -肽接头-264TCR V- β -人类TCR C- β -人类IL15R α Sushi。含有正确人类IL15R α Sushi基因插入物的所得载体(如图5A所示)是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。c264scTCR/huIL15R α Sushi基因及蛋白质的序列分别显示于图5B及图5C。

[0250] 实施例6-含有突变的人类IgG1铰链区的c264scTCR/huIL15R α Sushi基因融合物于表达载体中的构筑

[0251] 如上所述构筑pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Sushi载体。使用来自人类IgG1H链的突变铰链区(其中,三个半胱氨酸残基经由三个丝氨酸残基所取代)连结至c264scTCR及huIL15R α Sushi。如上所述,将该铰链区突变、扩增、粘结、及确认。自上述pNEF38-

c264scTCR/huIL15R α Sushi载体扩增huIL15R α Sushi,该扩增是利用前引子

[0252] 5'-TAATAAACGCGTATCACGTGCCCTC-3'

[0253] 与后引子

[0254] 5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG-3'

[0255] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,30秒;65C,30秒;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离250bp huIL15R α Sushi PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组 (Qiagen) 从琼脂糖中纯化cDNA产物。以MluI及XbaI酶切huIL15R α Sushi基因并粘结至经MluI及XbaI酶切的含有突变较链基因的pNEF38-c264scTCR。基于诊断型PCR鉴定含有huIL15基因插入物的纯系,该鉴定是利用前引子

[0256] 5'-TGGTGGGTAAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

[0257] 与后引子

[0258] 5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG-3'

[0259] 通过RedTag (Sigma) 于下列条件下进行:94C,30秒;65C,1分钟;70C,1分钟;x35个循环;72C,10分钟。依据制造者的操作流程利用QUICK START KIT (Beckman Coulter) 以GenomeLab DyeTermination Cycle Sequencing进行DNA定序来确认正确纯系的序列。pNEF38-c264scTCR表达载体为如上所述。将编码突变的人类IgG1较链区及人类IL15R α Sushi蛋白的DNA片段选殖进入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR-hmt-huIL15R α Sushi融合基因:3'-免疫球蛋白轻链前导子-264TCR V- α -肽接头-264TCR V- β -人类TCR C- β -突变的人类IgG1较链-人类IL15R α Sushi。所得载体 (pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15R α Sushi) (如图6所示) 是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。c264scTCR-hmt-huIL15R α Sushi融合基因及蛋白质的序列 (包含前导序列) 分别显示于图6B及图6C。

[0260] 实施例7-c264scTCR/huIL15R α Sushi及c264scTCR/huIL15基因于单一表达载体中的构筑

[0261] 为达成在单一表达宿主细胞中表达本发明的两种融合蛋白,将编码c264scTCR/huIL15R α Sushi及c264scTCR/huIL15的基因选殖入单一表达载体。自实施例5所述的模板通过PfuUltra (Stratagene) 扩增c264scTCR/huIL15R α Sushi基因,该扩增是利用前引子5'-TGAGTGTC CGGAACCA CCA TGGAGACAGACAC-3'与后引子5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCATCTAATGCATTTGAG-3'于下列条件下进行:94C,1分钟;68C,1分钟;72C,2分钟;x35个循环;72C,10分钟。将264scTCR/huIL15R α Sushi基因的PCR产物从凝胶纯化,以BspEI及NotI酶切并粘结至经BspEI及NotI酶切the pSUN34R1表达载体。pSUN34R1表达载体含有两个用于选殖感兴趣的基因的位置以及5'调节/增强子区、转录调节区及启动子区、翻译调节/起始/终止序列 (包含Kozak一致性序列及poly-A终止区)、及内含子以及具有调节元素的3'区。此载体亦含有容许在哺乳动物细胞 (SV40启动子/neoR基因/poly-A) 及细菌 (ori/amp基因) 中选择性生长的DNA序列。含有正确c264scTCR/IL15R α Sushi基因插入物的载体是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。自实施例2所述的模板扩增c264scTCR/huIL15基因,该扩增是利用前引子

[0262] 5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

[0263] 与后引子

[0264] 5'-TGAGTGTTCGAATTATCAAGAAGTGTGATGAAC-3'

[0265] 于下列条件下进行:94C,1分钟;65C,1分钟;72C,2分钟;x35个循环;72C,10分钟。将c264scTCR/huIL15基因的PCR产物从凝胶纯化,以C1aI及Csp45I酶切并粘结至经C1aI及Csp45I酶切的pSUN34R1-c264scTCR/huIL15RaSushi表达载体。含有正确c264scTCR/huIL15基因插入物的所得载体(pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi)(如图7所示)是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。此载体含有c264scTCR/huIL15RaSushi及c264scTCR/huIL15基因。

[0266] 实施例8-c264scTCR/huIL15Ra Δ E3及c264scTCR/huIL15基因于单一表达载体中的构筑

[0267] 自实施例4所述的模板通过PfuUltra (Stratagene) 扩增c264scTCR/huIL15Ra Δ E3融合基因,该扩增是利用前引子

[0268] 5'-TGAGTGTCCGGAACCAACCATGGAGACAGACAC-3'

[0269] 与后引子

[0270] 5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCAAGTGGTGTGCTG-3'

[0271] 于下列条件下进行:94C,1分钟;68C,1分钟;72C,2分钟;x35个循环;72C,10分钟。将c264scTCR/huIL15Ra Δ E3基因的PCR产物从凝胶纯化,以BspEI及NotI酶切并粘结至经BspEI及NotI酶切的表达载体pSUN34R1。含有正确c264scTCR/huIL15Ra Δ E3基因插入物的载体是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。扩增c264scTCR/huIL15基因并选殖进入如实施例7所述的表达载体。含有正确c264scTCR/huIL15基因插入物的所得载体(pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaDE3)(如图8所示)是基于诊断型PCR予以鉴定并通过DNA定序再确认。此载体含有c264scTCR/huIL15Ra Δ E3及c264scTCR/huIL15基因。

[0272] 实施例9-产生融合蛋白的经转染宿主细胞系的生成

[0273] 可通过多种不同的转形、转染或转导方法将表达载体导入各种宿主细胞系。于此等方法中,将CHO-K1细胞(5×10^4)接种于6孔盘并于CO₂培养器中培养一整夜。依据制造者的操作流程,使用10μLMirus TransIT-LT1试剂(Mirus),以5μg含有TCR/IL15及/或TCR/IL15Ra融合基因的表达载体转染该细胞。转染后一天将细胞以4mg/mL G418(Invitrogen)筛选。具G418抗性的细胞经扩充以及通过3至5回合如下文所述的MACS筛选来富集化(enrich)TCR融合蛋白表达细胞。将细胞于10mM EDTA中剥离并以含有10%FBS的IMDM洗涤一次。将细胞再悬浮(10^7 个细胞于100μL)并与5μg经R-藻红素(R-Phycoerythrin,PE)共轭的p53(aa264-272)/HLA-A2四聚体试剂于4C培养15分钟。将细胞洗涤一次并与经抗PE抗体共轭的磁珠(Miltenyi Biotec)于4C培养15分钟。将细胞载入磁性管柱(于磁场中),并以洗涤缓冲液(含有0.5%BSA的PBS)去除未结合的细胞。将管柱从磁场中移走后,以含有10%FBS的IMDM冲提与管柱结合的细胞。基于在制造/分泌过程的期间细胞表面上的可溶性融合蛋白的短暂呈现,此程序使融合蛋白表达细胞富集化。在各富集化作用后,监测融合蛋白的细胞表面联合作用。将通过流式细胞仪所测得的与细胞表面结合的融合蛋白浓度与通过ELISA所测得的存在于细胞培养基中的可溶性融合蛋白浓度进行比较。该比较的实例显示于图9A及9B。于此实例中,经pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi转染的CHO-K1细胞通过MACS富集化一至五次,接着接种(1×10^6 个细胞/孔)于6孔盘。24小时后,接着将细胞以10mM

EDTA剥离,以IMDM+10%FBS洗涤一次,并以0.6 μ g经PE共轭的p53(aa264-272)/HLA-A2四聚体或相同量的对照组经PE共轭的CMVpp65(aa495-503)/HLA-A2四聚体于4C染色(2×10^5 个细胞/100 μ L的IMDM+10%FBS)30分钟。将细胞洗涤一次并通过流式细胞仪分析与细胞表面联合的可溶性融合蛋白浓度,如图9A所示。分泌至细胞培养基的可溶性融合蛋白浓度亦如前述通过TCR特异性ELISA,利用捕捉抗体(抗人类TCR CB抗体(BF1))及检测抗体(生物素化抗人类TCR CB β 抗体(W4F))予以测定(5),如图9B所示。结果显示以磁珠为主的富集化过程所得到的转染株产生的可溶性融合蛋白浓度增加。接着,将经富集化的转染细胞通过极限稀释(limiting dilution)次选殖(subclone)三次,并基于分泌至培养基中的可溶性融合蛋白浓度(由前述ELISA所测得)筛选生产细胞系(production cell line)。在适于生成可溶性融合蛋白的条件(亦即,烧瓶、旋转器、发酵器、培养袋、培养瓶)使生产细胞系扩充并生长于IMDM+10%FBS或不含血清的培养基中。

[0274] 于某些情形中,将宿主细胞利用不同表达载体共转染以生成能够表达多种融合蛋白的转染株。表达一种融合蛋白的转染株亦可利用一种或多种表达载体再转染,以生成表达多种融合蛋白的转染株。细胞亦利用一个含有超过一种融合蛋白基因的表达载体(如例示于实施例7及8者)转染,以生成表达多种融合蛋白的转染株。所得细胞可用于制造于细胞培养基中呈可溶性分子形式的本发明多成分型融合蛋白复合物。

[0275] 经由U.S.S.N.09/204,979中所述的细胞转染及筛选方法亦可达到高浓度的融合蛋白或融合蛋白复合物产量。

[0276] 实施例10-TCR/IL15及TCR/IL15 α 融合蛋白或融合蛋白复合物的纯化

[0277] 本发明的可溶性融合蛋白或融合蛋白复合物可使用各种方法从宿主细胞或细胞培养基中纯化,该等方法包含利用在溶剂中的选择性分溶或溶解度的方法、或者利用基于电荷、疏水性、亲水性、尺寸大小及/或对配体的选择性或半选择性结合的分离的方法(亦即,经由层析)。可经由使用适当的蛋白折叠条件而自不可溶性物质中生成可溶性融合蛋白或融合蛋白复合物。于一实例中,通过使用辨识人类TCR-CB结构域的抗体(BF1)的亲性和性层析而自细胞培养基中纯化c264scTCR/IL15融合蛋白。典型地,首先将含有经BF1共轭的Sepharose的管柱以20mM Tris-HCl pH 8.0(载入缓冲液(loadingbuffer))平衡,接着以2ml/分钟载入含有c264scTCR/IL15融合蛋白的pH经调整的细胞培养基。接着,将管柱以5管柱容积的载入缓冲液洗涤,以去除未结合的蛋白质,并将c264scTCR/IL15融合蛋白以4管柱容积的0.5M柠檬酸钠(pH 4)冲提。收集后,将冲出液通过2MTris-HCl(pH 8.0)调整至pH 8.0。将经纯化的蛋白予以缓冲交换(bufferexchange)为PBS,并使用0.22 μ m过滤器过滤。将BF1管柱以50mM甘氨酸-HCl(pH 3.0)予以剥离,并存放在20%乙醇,4C中,以供进一步使用。融合蛋白可进一步通过离子交换及/或尺寸排出层析予以纯化。将含有c264scTCR/IL15、c264scTCR/IL15 α Sushi及c264scTCR/IL15 α Δ E3融合蛋白的细胞培养物悬浮液通过上述方法纯化,并将经纯化融合蛋白样品在还原条件下通过在SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳而进行分析,随后以考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)予以染色。此等凝焦的实例显示于图10。主要的蛋白质条带对应于基于融合蛋白序列所预期的正确分子量。

[0278] 实施例11-TCR/IL15及TCR/IL15 α 融合蛋白的融合蛋白复合物的生成

[0279] IL15以高亲和性而特异性结合至细胞外IL15 α 结构域(4)。因此,承载IL-15及IL15 α 结构域的融合蛋白的复合物可在各种条件下形成,包含于表达细胞之内或于细胞外

以未经纯化或经纯化的融合蛋白形成。于一实例中,可将等摩尔量(molar amount)的经纯化融合蛋白于适当条件下(亦即,于室温10分钟,)混合,以形成融合蛋白复合物。可使用各种技术监测复合物的形成,该等技术包含直接结合分析、竞争性结合分析、免疫沉淀、表面电浆共振、或基于复合物尺寸大小、活性或其他性质的分析。举例而言,如图11所示,尺寸排出色谱可基于分子量监测包括c264scTCR/huIL15及c264scTCR/huIL15 α Sushi融合蛋白的复合物的形成。于此研究中,将约100 μ g的c264scTCR/huIL15(0.5mg/ml)载于Superdex 200HR10/30管柱以供分析。c264scTCR/huIL15的计算分子量为约57kD。基于SEC图谱(图11),估计分子量为约98kD,显示此融合蛋白似乎为单体。同样地,将约60 μ g的c264scTCR/huIL15 α Sushi融合蛋白(0.3mg/ml)载于Superdex管柱。c264scTCR/huIL15 α Sushi的计算分子量为约52kD。基于SEC图谱(图11B),融合蛋白的估计分子量为约81kD,再次显示此融合蛋白为单体。过去其他以TCR为主体的融合蛋白的SEC分析显示类似的糖化融合蛋白的计算分子量与估计分子量之间的差异。当以等摩尔量混合c264scTCR/huIL15及c264scTCR/huIL15 α Sushi融合蛋白并将约126 μ g的混合蛋白(0.63mg/ml)载于管柱时,获得图11所示的图谱。估计两个主要波峰的分子量:一个为约170kD,其为两个融合蛋白的异二聚体;而另一个为约91kD,其似乎为单体型融合蛋白的混合物。因此,在混合的c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi融合蛋白制备物中出现170kD物种为可生成本发明融合蛋白复合物的证据。

[0280] 亦进行包括c264scTCR/huIL15及c264scTCR/huIL15 α Δ E3融合蛋白的融合蛋白复合物的分析。将约100 μ g的c264scTCR/huIL15 α Δ E3融合蛋白(0.5mg/ml)载于Superdex管柱。c264scTCR/huIL15 α Δ E3的计算分子量为约60kD。基于SEC图谱(图12A),该蛋白的估计分子量为约173kD,显示此蛋白是以同型二聚体(homodimer)存在。当以等摩尔量混合c264scTCR/huIL15及c264scTCR/huIL15 α Δ E3融合蛋白并将约118 μ g的混合蛋白(0.59mg/ml)载于管柱,获得图12B所示的图谱。估计两个主要波峰的分子量:一个为>210kD,其似乎为两个异二聚体所构成的四聚体;而另一个为约93kD,其似乎为c264scTCR/huIL15单体。因此,在混合的c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Δ E3融合蛋白制备物中出现170kD物种为可生成本发明融合蛋白复合物的证据。

[0281] 实施例12-TCR/IL15及TCR/IL15 α 融合蛋白的融合蛋白复合物显现出对肽/MHC复合物增强的结合性

[0282] 对上述所生成的融合蛋白复合物结合TCR特异性抗原p53(aa264-272/HLA-A2.1)的能力进行定性。为生成呈递此抗原的细胞,于26C以p53(aa264-272)肽载入HLA-A2.1阳性T2细胞一整夜,接着以 5×10^6 细胞/mL存放于液态氮中。将未与肽共同培养的T2细胞作为对照组。将载入p53肽的T2细胞或对照组T2细胞解冻并再悬浮于1mL的IMDM+10%FBS中。接着,以0.5 μ g的下列融合蛋白将细胞(5×10^5 /100 μ L)于室温染色30分钟:c264scTCR/huIL15、c264scTCR/huIL15 α Sushi、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi复合物。将细胞以洗涤缓冲液(含有0.5%BSA及0.05%叠氮化钠的PBS)洗涤一次,并于100 μ L洗涤缓冲液中以0.1 μ g生物素化小鼠单株抗人类TCR α CB抗体(BF1)于室温染色30分钟。将细胞洗涤一次并于100 μ L洗涤缓冲液中以0.5 μ g经R-藻红素共轭的链霉亲和素于室温染色30分钟。洗涤并再悬浮该细胞以供通过流式细胞仪进行分析。如图13所示,各融合蛋白能够对载入p53肽的细胞进行特异性染色。此外,c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi融合蛋白复合物

经由多价c264scTCR结构域而对呈递于T2细胞的p53(aa264-272)/HLA-A2.1复合物呈现增强的特异性结合性。特定而言,相较于单体c264scTCR/huIL15或c264scTCR/huIL15R α Sushi融合蛋白,二聚体融合蛋白复合物对载入p53肽的T2细胞显现出较佳的染色。此等数据显示相较于单体型融合蛋白,多聚体融合蛋白复合物将提供较佳的抗原辨识性质。

[0283] 实施例13-huIL-15突变基因的生成以及c264scTCR-hmt-huIL15突变基因表达载体的构筑

[0284] 如上所述,c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi多肽能够经由IL-15与IL-15R α 结构域的相互作用而形成复合物,且多价融合蛋白复合物对肽/MHC复合物具有增强的结合性。基于增强的结合活性,此融合蛋白复合物具有作为抗原特异性或靶向研究的诊断及治疗剂的优点。如此处所表明,融合蛋白的IL-15/IL-15R α 结构域与表达IL-15受体的细胞结合的能力亦为所期望的特征。然而,有些应用中,增加或降低IL-15/IL-15R α 结构域与表达IL15受体的细胞的相互作用的能力及/或影响表达IL15受体的细胞的反应的能力将为有利的。举例而言,在主要目标为使用融合蛋白复合物特异性检测肽/MHC复合物的应用(亦即,研究及诊断用途)中,减少此相互作用可为适宜的。于治疗应用中,生成能够增加或降低IL-15媒介的应答的含有IL-15结构域的融合蛋白复合物亦可为适宜的。为解决此问题,已进行突变分析来鉴定IL-15中影响其对IL-2/15R β γ c复合物的结合性但不影响其对IL-15R α 的相互作用的残基。所得突变可创造IL-15变异体,包含拮抗剂或激动剂。除了用于本发明的融合蛋白以外,所得IL-15拮抗剂及激动剂亦可具有作为可溶性细胞激素(亦即,非融合蛋白)或作为具有IL-15R α 结构域的复合物以供研究、诊断或治疗应用的效用。举例而言,于治疗策略中,IL-15拮抗剂可用于抑制不想要的免疫应答,而IL-15激动剂可用于刺激免疫应答,以治疗各种疾病。

[0285] 基于IL-15与IL-2的氨基酸序列及结构之间的比较,数个氨基酸被鉴定为可能影响IL-15与IL-15R α 、IL-15R β 及/或 γ C之间的相互作用。如表1及图14A所示,所创造的IL-15变异体中,成熟人类IL-15蛋白对IL-15R β γ c受体的可能结合位置,于位置8、61、65、72及108的氨基酸(基于成熟天然人类IL-15序列予以编号),为各自经取代或各自与两个或更多个其他取代组合。位置8的天冬氨酸经丙氨酸或天冬酰胺所取代。位置61的天冬氨酸经丙氨酸所取代。位置65的天冬酰胺经丙氨酸或天冬氨酸所取代。位置72的天冬酰胺经精氨酸或天冬氨酸所取代。位置108的谷氨酰胺经丙氨酸所取代。位置8的Asp及位置108的Gln两者各自经丙氨酸所取代。位置8的Asp及位置65的Asn两者各自经天冬酰胺或丙氨酸所取代。位置8的Asp及位置65的Asn两者各自经丝氨酸或精氨酸所取代。使用重叠PCR(overlapping PCR)来生成IL-15突变体。

[0286] 举例而言,为生成位置8的Asp经丙氨酸或天冬酰胺残基取代的突变体,使用pNEF38-c264scTCR/huIL15载体作为模板来扩增两个重叠的c-DNA片段,该扩增是利用片段1的前引子

[0287] 5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

[0288] 与片段1的后引子

[0289] 5'-AGATCTTCAATTTTTTTCAAMKHACTTATTACATTACCCAG-3'

[0290] 以及利用片段2的前引子

[0291] 5'-ACTGGGTGAATGTAATAAGTDMKTTGAAAAAATTGAAGATC-3'

[0292] 与片段2的后引子

[0293] 5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

[0294] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,1分钟;66C,1.5分钟;72C,1.5分钟;x35个循环;72C,10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离片段1及片段2的PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组 (Qiagen) 从琼脂糖中纯化cDNA产物。将片段1及片段2的PCR-cDNA产物融合在一起,该融合是利用PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,1分钟;66C,1.5分钟;72C,1.5分钟;x10个循环。扩增重叠的PCR-cDNA片段,该扩增是利用前引子

[0295] 5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

[0296] 与后引子

[0297] 5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

[0298] 通过PfuUltra (Stratagene) 于下列PCR条件下而进行:94C,1分钟;64C,1.5分钟;69C,1.5分钟;x30个循环;72C,10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳而分开并单离huIL-15突变的PCR-cDNA产物。以Qiaquick凝胶萃取套组 (Qiagen) 从琼脂糖中纯化cDNA产物。以MluI及XbaI酶切huIL15突变基因并粘结至经MluI及XbaI酶切的pNEF38-c264scTCR-hmt。依据制造者的操作流程利用QUICK STARTKIT (Beckman Coulter) 以GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing进行DNA定序来确认含有于位置8具有丙氨酸或天冬酰胺取代的huIL15基因的纯系。pNEF38-c264scTCR表达载体如上所述。将编码突变的人类IL-15蛋白的DNA片段选殖入pNEF38-c264scTCR载体而得到包括下列序列的c264scTCR-hmt-huIL15D8A或c264scTCR-hmt-huIL15D8N融合基因:3'-免疫球蛋白轻链前导子-64 TCR V- α -肽接头-264 TCR V- β -人类TCR C- β -突变的人类IgG1铰链-人类IL15D8A或-人类IL15D8N。将所得载体 (pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A或pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N) (如图14B所示) 通过DNA定序确认。pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8A或pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15D8N融合基因及蛋白质的序列 (包含前导序列) 分别显示于图14C及图14D。

[0299] 如上所述以类似方式将其他突变导入所构筑的表达载体。如实施例9所述将表达载体导入CHO.K1细胞以生成安定的转染株。TCR/IL15融合蛋白及包括IL-15变异体的融合蛋白复合物的制造及纯化是使用类似于实施例10及11所述的方法而进行。呈可溶性细胞激素形式的IL-15变异体的生成可经由此技艺中已知的各种方法进行,该等方法包含于原核及真核表达系统中制造 (参见例如W09527722;Hsu et al.2005J.Immunol.175:7226)。

[0300] 实施例14-TCR/IL15及TCR/IL15 α 融合蛋白以及融合蛋白复合物的功能定性

[0301] 基于实施例9中所述的使用p53 (aa264-272) /HLA-A2.1试剂的ELISA及细胞染色法,以及实施例12中所述的抗原呈递细胞染色法证实融合蛋白TCR结构域的功能性结合。如实施例11所述,证实融合蛋白IL15及IL15 α 结构域相互作用的能力。再者,可经由各种方法评估IL15及IL15 α 结构域的功能活性,该等方法包含结合至IL-2/15R β γ c受体或调控承载有IL-15受体的免疫细胞的活性。于一实例中,将表达异三聚体IL-15R ($\alpha\beta\gamma$ c链) 的CTLL-2细胞与0.5 μ g的下列个别融合蛋白于室温培养30分钟:c264scTCR/huIL15、264scTCR/huIL15 α Sushi或c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi复合物。将细胞以洗涤缓冲液 (含有0.5%BSA及0.05%叠氮化钠的PBS) 洗涤一次,并以0.5 μ g经R-藻红素 (PE) 共轭的

p53 (aa264-272) /HLA-A2四聚体于室温染色30分钟。洗涤并再悬浮该细胞以供通过流式细胞仪进行分析。如图15所示, c264scTCR/huIL15融合蛋白及c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi复合物经由其huIL15结构域与CTLL-2细胞上的IL-15受体的联合作用可利用能辨识所结合的融合蛋白c264scTCR结构域的经PE共轭的p53 (aa264-272) /HLA-A2四聚体与以检测。此等结果显示融合蛋白/融合蛋白复合物的IL-15及TCR结构域皆能够与其同源性配体功能性地相互作用。

[0302] 此外, CTLL-2细胞依赖细胞激素生长且可对重组人类IL-15产生应答。发展出使用CTLL-2细胞的以细胞为主的WST-1增生分析来评估融合蛋白及融合蛋白复合物的IL-15生物活性。WST-1 (Roche) 为可通过代谢活性细胞中所发现的去氢酶而转化成甲臞(formazan)的试剂。于WST-1分析中, 通过440至450nm吸光度的量值所测得的培养基中甲臞的量直接与培养物中的活细胞数成比例。于37C, 在CO₂培养器中, 将CTLL-2细胞 (2×10^4 /200 μ L) 与下列指定浓度的融合蛋白 (0至28ng/mL) 于96孔盘中培养3天: c264scTCR/huIL15、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi复合物或c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Δ E3复合物。将该细胞与10 μ L的WST-1培养4小时之后, 收取100 μ L的培养基, 以利用微量滴定盘判读机进行440至450nm吸光度测定。如图16所示, c264scTCR/huIL15融合蛋白可以低至1.8ng/mL (~ 31.25 pM) 的浓度维持CTLL-2细胞增生, 显示c264scTCR/huIL15融合蛋白经由高亲和性的IL15受体活化CTLL-2细胞。令人感兴趣的是, 融合蛋白复合物亦维持CTLL-2细胞增生, 但达到较低的程度, 显示在与c264scTCR/huIL15R α Sushi或c264scTCR/huIL15R α Δ E3形成复合物之后, c264scTCR/huIL15刺激活性受到抑制 (分别为一倍或四倍)。此结果显示c264scTCR/huIL15对高亲和性IL15受体的结合性受到c264scTCR/huIL15R α Sushi或c264scTCR/huIL15R α Δ E3融合蛋白的抑制。此等结果提供融合蛋白及融合蛋白复合物可于不同条件下活化或抑制免疫细胞的应答的证据。

[0303] 对仅表达中间型亲和性的IL-15 β γ c受体的细胞系 (例如, 32D β 细胞系 (参见下文)) 进行类似的分析。于某些情形中, 当IL15呈具有IL15R α 结构域的复合物形式时, 可能会增强IL15刺激承载有IL-15R的细胞增生的生物活性 (1至3)。评估c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi或c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Δ E3复合物对细胞增生的刺激, 其可提供融合蛋白复合物可刺激或活化免疫细胞的免疫应答的其他证据。

[0304] 实施例15-TCR/IL15R α Sushi及TCR/IL15变异体的二聚体融合蛋白复合物对肽/MHC复合物显现出TCR特异性结合, 但对IL-15R β γ c受体显现出较低的结合

[0305] 对如上所述包括IL-15变异体的融合蛋白复合物结合TCR特异性抗原p53 (aa264-272) /HLA-A2.1的能力进行定性。为了生成呈递p53 (aa264-272) /HLA-A2.1的细胞, 于37C在1x PLE (Altor Bioscience) 存在下以20 μ M p53 (aa264-272) 肽载入HLA-A2.1-阳性T2细胞 (2×10^6 /mL) 2至3小时。将未与肽共同培养的T2细胞及表达IL-2/15R β γ c的32D β 细胞作为对照组。接着, 将载入p53肽的T2细胞、对照组T2细胞或32D β 细胞 (2×10^5 /100 μ L) 与320nM下列二聚体融合蛋白复合物于4C培养30分钟: 1) c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi、2) c264scTCR/huIL15D8A+c264scTCR/huIL15R α Sushi、以及3) c264scTCR/huIL15D8N+c264scTCR/huIL15R α Sushi。通过于4C培养160nM经纯化的c264scTCRhuIL15融合蛋白及160nM经纯化的c264scTCRhuIL15R α Sushi融合蛋白3小时而生成此等复合物。染色之后, 将细胞以洗涤缓冲液 (含有0.5% BSA及0.05% 叠氮化钠的PBS) 洗涤一次, 并于100 μ L洗涤缓冲

液中以0.5 μ g生物素化小鼠单株抗人类TCR CB 抗体(BF1)于4 $^{\circ}\text{C}$ 染色30分钟。将细胞洗涤一次并于100 μL 洗涤缓冲液中以0.5 μg 经R-藻红素共轭的链霉亲和素于4 $^{\circ}\text{C}$ 染色30分钟。洗涤并再悬浮该细胞以供通过流式细胞仪进行分析。如图17A所示,对于特异性染色载入p53肽的T2细胞而言,c264scTCR/huIL15D8A+c264scTCR/huIL15 α Sushi复合物及c264scTCR/huIL15D8N+c264scTCR/huIL15 α Sushi复合物显现出与c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi复合物相等的活性。此等结果显示在此等融合复合物各者中的多价scTCR结构域具有完整的功能。然而,如图17B及图17C所示,对于对照组T2细胞(图17B)及IL-15 β γ c-阳性32D β 细胞(图17C),相较于野生型c264scTCR/IL15融合蛋白复合物,突变的c264scTCR/huIL15融合蛋白复合物显现出较低的背景染色。因此,此等包括IL-15变异体(D8A及D8N)的融合蛋白复合物不会对呈递于32D β 细胞的IL-15 β γ c受体显现出结合活性。利用其他包括IL-15变异体的融合蛋白进行IL-15 β γ c受体结合性的类似研究并总结于表1。结果显示包括IL-15变异体的本发明融合蛋白及融合蛋白复合物保有辨识肽/MHC复合物的活性并对IL-15 β γ c受体展现出降低或增加的结合活性。

[0306] 为确认上述融合蛋白功能性TCR与IL-15结构域,通过ELISA分析测定肽/MHC及IL-15 α 结合活性。于4 $^{\circ}\text{C}$,在3小时的期间,以于碳化缓冲液(pH 9.1)(碳酸氢钠35mM, Na_2CO_3 17.5mM, NaCl 50mM)的20nM BF1、抗TCR CB 抗体、或20nM TCR/IL15 α Sushi预先涂覆96孔微量滴定盘。将该盘以洗涤缓冲液(咪唑40mM, NaCl150mM)洗涤4次,并以1%BSA-PBS封阻(block)10分钟。添加浓度0.03-4nM的指定融合蛋白至该盘,并于室温培养30分钟。洗涤该盘4次。将经BF1捕捉的融合蛋白与1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 经HRP共轭的p53/HLA-A2.1四聚体于室温培养45分钟,并将经TCR/IL15 α Sushi捕捉的融合蛋白与50ng/mL生物素化小鼠抗人类IL-15于室温培养30分钟。洗涤4次后,将与生物素化小鼠抗人类IL-15共同培养的该盘与0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP-链霉亲和素培养15分钟。将该盘洗涤4次,与过氧化酶受质ABT培养1至10分钟并显色,以供利用微量滴定盘判读机的405nm吸光度测定。如图18A及图18B所示,多种融合蛋白对p53/HLA-A2四聚体共有类似的TCR特异性结合活性,且对IL15 α Sushi共有相等的IL-15结合活性。利用其他包括IL-15变异体的融合蛋白进行IL-15 α 结合性的类似研究并总结于表1。结果显示包括IL-15变异体的本发明融合蛋白及融合蛋白复合物保有辨识肽/MHC复合物及IL-15 α 受体的活性。

[0307] 实施例16-TCR/IL15突变体融合蛋白及融合蛋白复合物的功能定性如上所表明,包括IL-15拮抗剂或激动剂的融合蛋白可有助于作为靶向药剂,以用于在疾病位置抑制或刺激IL-15媒介的应答(亦即,T细胞或NK细胞活性)。为了测定此等融合蛋白影响免疫应答的IL-15生物活性,利用表达高亲和性IL-15R($\alpha\beta$ γ c链)的CTLL-2细胞及利用表达中间型IL-15R(β γ c链)的32D β 细胞进行细胞增生研究。于37 $^{\circ}\text{C}$,在 CO_2 培养器中,将细胞($2 \times 10^4/200 \mu\text{L}$)与0.4至40nM的上述TCR/IL15融合蛋白于96孔盘中培养3天。将该细胞与10 μL 的WST-1培养4小时之后,收取150 μL 的培养基,以利用微量滴定盘判读机进行440nm吸光度测定。如图19A及图19B所示,包括野生型IL-15结构域的c264scTCR/huIL15融合蛋白可分别以低至40pM或1nM的浓度维持CTLL-2及32D β 细胞增生。令人感兴趣的是,相较于包括野生型IL-15结构域的融合蛋白,包括具有在位置72以氨基酸将天冬酰胺取代成天冬氨酸的IL15变异体的融合蛋白(c264scTCR/huIL15N72D)在维持32D β 细胞系增生上更具活性,显示出低至80pM(图19B)浓度的生物活性。在此方面,包括IL-15变异体的融合蛋白(huIL15N72D)显示出极

佳的激动剂活性。在具有一对一比例的c264scTCR/IL15R α Sushi的复合物中,c26scTCR/huIL15N72D对T2细胞上的p53/HLA-A2.1复合物具有类似于c264scTCR/huIL15wt的结合能力(图17A),但对32D β 细胞上的IL-15R β γ c受体则显现出增加的结合能力(图17C)。相反地,相较于c264scTCR/huIL15wt融合蛋白,包括在位置8(c264scTCR/huIL15D8N或c264scTCR/huIL15D8A)、位置65(c264scTCR/huIL15N65A)、位置108(c264scTCR/huIL15Q108A)具有取代的IL-15变异体,或在位置72(c264scTCR/huIL15N72R)具有不同取代的IL-15变异体的融合蛋白在维持CTLL-2及32D β 细胞的增生上皆具有较低的活性(图19A及图19B)。利用其他包括IL-15变异体的融合蛋白进行IL-15相依性增生活性的类似研究并总结于表1。该数据支持下述假设:IL-15蛋白在位置8、61、65、72及108的突变可产生对IL-15R具有降低的结合性且对刺激免疫应答具有极少或不具有活性的IL-15拮抗剂。位置72取代的结果意外地得到一个突变体(c264scTCR/huIL15N72R),其作用为IL-15拮抗剂,而不同的突变体(c264scTCR/huIL15N72D)则显示出对IL-15R增加的结合性及对刺激免疫应答增强的活性。

[0308] 于典型的情况下,IL-15由树突细胞表面上的IL15R α 转呈递(trans-present)至记忆T细胞、NKT细胞或NK细胞上的IL-15R β γ c受体,以维持细胞存活及刺激免疫应答。拮抗剂应通过与IL15R α 结合而阻断IL-15的转呈递作用。为评估拮抗剂融合蛋白是否可与c264scTCR/huIL15wt竞争以阻断其维持CTLL-2细胞生长的活性,在50nM(100倍摩尔过量)的各种c264scTCR/huIL15突变体融合蛋白存在或不存在下,将 4×10^4 个CTLL-2细胞与0.5nM的c264scTCR/huIL15wt于37C在CO₂培养器中培养24小时。将该细胞与10 μ L的WST-1培养4小时之后,收取150 μ L的培养基,以利用微量滴定盘判读机进行440nm吸光度测定。如图19C所示,c264scTCR/huIL15wt维持CTLL-2细胞增生的能力在100倍以上的c264scTCR/huIL15D8N、c264scTCR/huIL15D8A、c264scTCR/huIL15D8A/Q108A、c264scTCR/huIL15Q108A或c264scTCR/huIL15D8N/N65A的存在下被完全地阻断,而在c264scTCR/huIL15N72R融合蛋白的存在下则下降62%。此结果显示此等融合蛋白为c264scTCR/IL15融合蛋白的拮抗剂。基于此等蛋白与IL-15R α 结合但不与IL-15R β γ c受体结合的能力所预期,此数据指出c264scTCR/huIL15突变体融合蛋白为IL-15活性的功能性拮抗剂。

[0309] 利用此处所述其他TCR/IL15融合蛋白与IL-15变异体进行类似研究,以证实IL-15拮抗剂及激动剂活性。如表1所总结,IL-15在位置8、61、65、72及108的取代显示出影响IL-15对IL-15R(β γ c链)结合性的能力。IL-15在位置92、101及111的其他取代亦将作为IL-15R相互作用的可能结合位置而予以评估。此外,包含所有或数个此等残基的取代的变化组合可创造有效的IL-15拮抗剂或激动剂。包含上述的分子,欲加以评估的IL-15变异体包含彼等具有下列改变者:在位置8改变成丙氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、赖氨酸、苏氨酸或酪氨酸;在位置61改变成丙氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、赖氨酸、苏氨酸或酪氨酸;在位置65改变成丙氨酸、天冬氨酸或精氨酸;在位置72改变成丙氨酸、天冬氨酸或精氨酸;以及在位置92、101、108或111改变成丙氨酸或丝氨酸。

[0310] 实施例17-通过TCR/IL15及TCR/IL15R α 融合蛋白及融合蛋白复合物的细胞-细胞接合及免疫细胞再标靶(retargeting)

[0311] 为证实融合蛋白或融合蛋白复合物可将承载有IL-15受体的细胞与承载有肽/MHC的靶细胞桥联,将T2细胞载入p53(aa264-272)肽或对照组CMVpp65(aa495-503)肽,接着以

二氢乙啶(dihydroethidium)标记。将CTLL-2细胞以钙黄绿素AM(calcein AM)标记,将两个经标记的细胞族群混合并在融合蛋白或融合蛋白复合物的存在或不存在下培养。在融合蛋白复合物不存在下或将T2细胞载入对照组肽时,通过流式细胞仪评估时,预期细胞会保持两个清楚区别的族群。然而,当将T2细胞载入p53(aa264-272)并在融合蛋白或复合物的存在下与CTLL-2细胞培养时,双重染色的细胞族群外观为T2细胞经由融合蛋白或融合蛋白复合物接合至CTLL-2细胞的指标。

[0312] 同样地,可进行研究来证实融合蛋白复合物可桥联承载有IL-15受体的免疫细胞与承载有肽/MHC的靶细胞,并将免疫细胞毒性导向靶细胞。举例而言,将T2细胞载入p53(aa264-272)肽或对照组CMVpp65(aa495-503)肽,接着以钙黄绿素AM标记。以不同的比例混合承载IL-15受体的免疫效应物细胞(亦即,经活化的NK细胞或T细胞),并在融合蛋白复合物的存在或不存在下于适当条件培养(亦即,于37C培养2至4小时)。通过标准方法,基于钙黄绿素从T2靶细胞至培养基的释放而评估细胞毒性。测定钙黄绿素-AM的特异性释放或与自然释放钙黄绿素-AM的非特异性对照组进行比较。在融合蛋白复合物不存在下或将T2细胞载入对照组肽时,预期得到低浓度的靶细胞细胞毒性。然而,当将T2细胞载入p53(aa264-272)并在融合蛋白或复合物的存在下与免疫效应物细胞培养时,T2细胞的特异性裂解(lysis)为免疫效应物细胞经由融合蛋白复合物再标靶p53肽呈递细胞的指标。利用呈递p53(aa264-272)/HLA-A2.1复合物的肿瘤细胞系作为靶细胞进行类似研究。

[0313] 实施例18-活体内证实IL-15变异体激动剂、TCR/IL15融合蛋白及融合蛋白复合物的抗肿瘤功效

[0314] 使用实验性异体移植肿瘤模型来测定融合蛋白复合物或IL-15变异体激动剂是否具有活体内抗肿瘤活性。已利用于其他TCR为主的融合蛋白的类似动物功效研究(5至7)中使用的表达p53(aa264-272)/HLA-A2.1复合物的人类肿瘤细胞系(例如,A375黑色素瘤、MDA-MB-231乳腺癌、PANC1胰腺癌)。举例而言,将A375人类黑色素瘤细胞皮下注射至裸小鼠侧腹,并使肿瘤建立3天。对荷肿瘤小鼠静脉每日注射c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi复合物或IL-15变异体激动剂(剂量范围-0.1至2mg/kg)、或等剂量体积(dose volume equivalent)的PBS,共注射4天或更多天。研究期间,测量肿瘤尺寸并计算肿瘤体积。预期所有经PBS处理的小鼠会发展出肿瘤。在某些或所有经融合蛋白复合物或IL-15变异体激动剂处理的小鼠中,肿瘤生长的抑制作用或完全的肿瘤退化(tumor regression)为该处理的抗肿瘤效果的指标。其他替代性给药计画(包含多周期给药(multi-cycle dosing))亦可证实融合蛋白或IL-15变异体激动剂的抗肿瘤功效。对于通过融合蛋白复合物的c264scTCR-结构域的抗原特异性辨识作用,可使用缺乏p53(aa264-272)/HLA-A2.1复合物的肿瘤细胞系(例如,HT-29或AsPC-1(5,9))作为对照组。可使用包括其他TCR结构域的替代性融合蛋白复合物(亦即,对CMVpp65(aa495-503)肽具特异性者(9))作为非肿瘤靶向对照组。

[0315] 此外,在异体移植荷肿瘤小鼠中进行授受性细胞转移研究。举例而言,将承载有IL-15受体的免疫细胞(例如,原初(naïve)或经活化(或记忆型)脾细胞、NK细胞或T细胞)从小鼠中单离,并与c264scTCR/huIL15+c264scTCR7huIL15R α Sushi复合物或激动剂IL-15变异体于容许结合至该细胞的条件下培养。于某些情形中,将使用融合蛋白复合物或激动剂IL-15变异体来活化免疫细胞。接着,将经IL-15变异体活化的细胞或经融合蛋白复合物包

覆的细胞转移至荷A375肿瘤的裸小鼠。对照组包含转移未经处理的免疫细胞、单独的融合蛋白复合物、及PBS。监测到肿瘤生长,且预期所有经PBS处理的小鼠会发展出肿瘤。在某些或所有经IL-15变异体活化的细胞或经融合蛋白复合物包覆的细胞中,肿瘤生长的抑制作用或完全的肿瘤退化为该处理的抗肿瘤效果的指标。或者,IL-15变异体或融合蛋白复合物及免疫细胞是同时给予,或同时或不同时分开给予。对于荷肿瘤宿主,免疫细胞可为自体性 (autologous) 或异源性 (allogeneic)。改变所转移的细胞数及给药计画以评估及最佳化抗肿瘤功效。如上所述,利用其他肿瘤细胞系或融合蛋白复合物来测定抗原靶向在任何所观察的抗肿瘤活性中所扮演的角色。

[0316] 实施例19-以TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物活体外处理免疫细胞,随后进行授受性细胞转移而在异体移植肿瘤动物模型中提供增进的存活率

[0317] 为证实预先与TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物共同培养的经验富集化异源小鼠NK细胞对肿瘤生长的抗肿瘤功效,使用人类NSCLC A549A2肿瘤细胞于裸小鼠的实验性转移模型中进行下列研究。

[0318] 将无胸腺裸小鼠 (每组n=4,雌性,5至6周龄) 经由侧尾静脉以 5×10^6 个细胞/小鼠静脉内 (IV) 注射人类NSCLC肿瘤细胞系A549-A2。A549-A2细胞系代表带有表达人类HLA-A2.1 cDNA的载体的p53阳性A549亲本的转染株。

[0319] 收集来自A2小鼠 (B6背景) 的脾脏,并使用得自Miltenyi Biotech, Inc. 的NK细胞单离套组依据制造者的操作指南单离NK细胞。简言之,通过通过金属筛网 (60网目) 于HBSS中均质化脾脏而制备脾细胞的单一细胞悬浮液。于ACK红细胞裂解缓冲液中使红细胞裂解。将细胞与生物素-抗体调和液 (10 μ L, 对于 10^7 细胞) 于4至8C培养10分钟。测定白细胞的数目,并对每 10^7 个细胞添加30 μ L的缓冲液 (PBSpH 7.2, 0.5% BSA及2mM EDTA) 及20 μ L的抗生物素微珠 (anti-biotin MicroBead), 并将混合物于4至8C培养15分钟。将细胞于2mL缓冲液中洗涤并以300xg离心10分钟。将细胞再悬浮于500 μ L缓冲液中,以用于载入MACS管柱。收集流通物 (flow through) 并使用FACScan分析测定NK细胞的纯度。

[0320] 为了活化细胞,在c264scTCR/IL15:c264scTCR7IL15R α 融合蛋白复合物、TCR-IL2融合蛋白或rhIL-2的存在或不存在下,将NK细胞 (5×10^6) 于T25瓶中在补充有10% FBS的10ml RPMI1640于37C培养一整夜。添加浓度为0.8 μ g/mL的c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 融合蛋白复合物及TCR-IL2融合蛋白,以及添加浓度为0.2 μ g/mL的rhIL-2。培养一整夜后,收取细胞,并将细胞于100 μ L的0.5mg/mL c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 融合蛋白复合物或TCR-IL2融合蛋白或0.125mg/mL rhIL-2在冰上预先培养30分钟。于PBS (1mL) 中洗涤后,将细胞以 10×10^6 个/mL再悬浮于PBS中以供授受性转移。

[0321] 于第1天,经由尾静脉对小鼠静脉内注射A549A2肿瘤细胞 (5×10^6) 以建立肺肿瘤。肿瘤细胞注射后第14天,将小鼠随机分配成5组 (n=4)。于第14及21天,经由腹膜内注射以200mg/kg的剂量以环磷酰胺 (CTX) 处理小鼠。于第16及22天,以经不同融合蛋白或rhIL-2预先培养的NK细胞 (1×10^6 个/小鼠) 进行静脉内注射,并将接收PBS的小鼠作为对照组。处理计画总结如下:

[0322]

组别	CTX		NK 细胞	
	剂量 (mg/kg)	注射(腹膜 内)	剂量 ($\times 10^6$)	注射(静脉 内)
CTX	200	第 14 及 21 天	0	第 16 及 22 天
CTX + NK/rhIL2	200	第 14 及 21 天	1	第 16 及 22 天
CTX + NK/MART-1scTCR-IL2	200	第 14 及 21 天	1	第 16 及 22 天
CTX + NK/c264scTCR-IL2	200	第 14 及 21 天	1	第 16 及 22 天
CTX + NK/c264scTCR/IL15: c264scTCR/IL15R α 融合蛋白 复合物	200	第 14 及 21 天	1	第 16 及 22 天

[0323] 每天监测荷肿瘤小鼠的存活率。牺牲垂死的小鼠并计为死亡。肿瘤注射后存活超过100天的小鼠视为已痊愈。

[0324] 在CTX、CTX+NK/rhIL-2、CTX+NK/MART1scTCR-IL2、CTX+NK/c264scTCR-IL2及c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 融合蛋白复合物处理组中的小鼠存活中间值分别为52、67.5、64.5、85.5及80天(图20)。因此,相较于在单独经化学疗法处理或在经非靶向MARTscTCR-IL2或rhIL-2活化的NK细胞处理的荷肿瘤动物中所观察到的存活时间中间值,授受性转移经c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 活化的NK细胞得到较长的存活时间中间值。此试验性实验的结果指出以c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 活化及标靶至小鼠NK细胞可提供增强的抗肿瘤活性。

[0325] 实施例20-通过延长的细胞表面滞留时间证明TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物对承载有IL-15R的免疫细胞增强的结合性

[0326] 融合蛋白复合物在承载有IL-15R的细胞上的细胞表面滞留时间可能影响融合蛋白将效应物细胞标靶至及桥联TCR特异性肿瘤细胞的能力。为探讨此,通过流式细胞仪直接比较scTCR/IL-15融合蛋白、TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物及重组IL-15对承载有IL-15R $\alpha\beta\gamma$ C受体的CTLL-2细胞及承载有IL-15R $\beta\gamma$ C受体的CTLL-2细胞32D β 细胞的结合性。与各种蛋白质培养后,将细胞加以洗涤并在培养基中于37℃培养高达180分钟,利用经

PE标记的抗IL-15单株抗体检测留在细胞表面上的蛋白质浓度。比较初始时间零染色与后续的各时间以测定各蛋白结合至IL-15R的细胞表面滞留时间。相较于IL-15, scTCR/IL-15融合蛋白或TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物的细胞表面滞留时间增加为受体结合活性增强且更安定的指标。

[0327] 实施例21-相较于IL-15而言,小鼠中的TCR/IL15融合蛋白及TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合蛋白复合物的活体内半衰期增加

[0328] 于HLA A2.1/Kb-基因转殖小鼠品系中评估c264scTCR/IL-15、c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 复合物、重组IL-15或可溶性IL-15:IL-15R α 复合物的药物动力学参数。HLA-A2.1结构域(c264scTCR/IL-2限定)的存在可能影响此融合蛋白的药物动力学,而可提供比其他小鼠品系更相关的“人类化”观点药物动力学。对小鼠静脉内注射等摩尔量的c264scTCR/IL-15、c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 复合物、重组IL-15或可溶性IL-15:IL-15R α 复合物,在注射后5分钟至2周的多个不同时间点收集血液。使用上述ELISA模式评估融合蛋白的血清浓度。利用标准IL-15特异性ELISA检测IL-15的浓度。

[0329] 使用曲线嵌合软体(例如,WinNonlin)测定c264scTCR/IL-15、c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 复合物、重组IL-15或可溶性IL-15:IL-15R α 复合物的活体内药物动力学参数。相较于重组IL-15或可溶性IL-15:IL-15R α 复合物,c264scTCR/IL-15或c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 复合物升高的C_{max}值、增加的血清半衰期或降低的清除率为下述者的指标:TCR-IL15融合物或TCR/IL15:TCR/IL-15R α 复合物的生成将提供相较于单独的IL-15所观察到的药物动力学而言更有利的药物动力学。

[0330] 实施例22-活体内证实IL-15变异体拮抗剂、TCR/IL15融合蛋白及融合蛋白复合物的免疫抑制效果

[0331] 使用实验性自体免疫关节炎模型来测定融合蛋白复合物或IL-15变异体拮抗剂是否具有活体内免疫抑制活性。已证实在HLA-DR4-基因转殖小鼠中给予第II型胶原蛋白(CII)之后可引发自体免疫关节炎(Rosloniec et al.1998.J Immunol.160:2573-8)。此外,已对涉及此疾病病理学的CII特异性T细胞定性。如先前实施例所述,使用来自此等T细胞的TCR基因来构筑适当的表达载体及宿主细胞系,以生成包括IL-15变异体拮抗剂的CIIscTCR/IL15以及CIIscTCR/IL15R α Sushi融合蛋白。通过给予CII而引发关节炎后,对HLA-DR4-基因转殖小鼠每日静脉内给予CIIscTCR/IL15-拮抗剂+CIIscTCR/IL15R α Sushi复合物或IL-15变异体拮抗剂(剂量范围-0.1至2mg/kg),或等剂量体积的PBS,共注射4天或更多天。研究期间,对小鼠足关节的发炎程度予以评估及计分,等级为0至4。预期所有经PBS处理的小鼠皆发展出关节炎。在某些或所有经融合蛋白复合物或IL-15变异体处理的小鼠中的关节炎抑制作用(例如,降低的发病率或临床评分)为该处理的免疫抑制效果的指标。其他替代性给药计画(包含多周期给药)亦可证实融合蛋白或IL-15变异体的免疫抑制功效。可使用包括其他TCR结构域的替代性融合蛋白复合物(亦即,对p53肽具特异性者)作为非疾病靶向对照组,以证实靶向TCR融合蛋白的特异性具有将免疫抑制活性导向疾病位置的能力。

[0332] 参考资料的并入

[0333] 本申请案全文所引用的所有参考资料、专利、申请中的专利案及已公开专利的内容均藉此特地以参考资料的方式并入。

[0334] 等价物

[0335] 熟习此技艺者使用不超出例行的实验将了解或能够确定此处所述本发明的特定具体例的许多等价物。这些等价物意图涵括于权利要求书中。

[0336] 参考资料

[0337] 1.Mortier,E.,A.Quemener,P.Vusio,I.Lorenzen,Y.Boublik,J.Grotzinger,A.Plet,and Y.Jacques.2006.Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma.Hyperagonist IL-15xIL-15R alpha fusion proteins.J Biol Chem 281:1612-1619.

[0338] 2.Stoklasek,T.A.,K.S.Schluns,and L.Lefrancois.2006.Combined IL-15/IL-15R alpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo.J Immunol 177:6072-6080.

[0339] 3.Rubinstein,M.P.,M.Kovar,J.F.Purton,J.H.Cho,O.Boyman,C.D.Surh,and J.Sprent.2006.Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R {alpha}.Proc Natl Acad Sci U S A 103:9166-9171.

[0340] 4.Waldmann,T.A.2006.The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design.Nat Rev Immunol 6:595-601.

[0341] 5.Belmont,H.J.,S.Price-Schiavi,B.Liu,K.F.Card,H.I.Lee,K.P.Han,J.Wen,S.Tang,X.Zhu,J.Merrill,P.A.Chavillaz,J.L.Wong,P.R.Rhode,and H.C.Wong.2006.Potent antitumor activity of a tumor-specific soluble TCR/IL-2 fusion protein.Clin Immunol 121:29-39.

[0342] 6.Card,K.F.,S.A.Price-Schiavi,B.Liu,E.Thomson,E.Nieves,H.Belmont,J.Builes,J.A.Jiao,J.Hernandez,J.Weidanz,L.Sherman,J.L.Francis,A.Amirkhosravi,and H.C.Wong.2004.A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity.Cancer Immunol Immunother 53:345-357.

[0343] 7.Mosquera,L.A.,K.F.Card,S.A.Price-Schiavi,H.J.Belmont,B.Liu,J.Builes,X.Zhu,P.A.Chavillaz,H.I.Lee,J.A.Jiao,J.L.Francis,A.Amirkhosravi,R.L.Wong,and H.C.Wong.2005.In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgG1 fusion Protein.J Immunol 174:4381-4388.

[0344] 8.Penichet,M.L.,E.T.Harvill,and S.L.Morrison.1997.Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection.Hum Antibodies 8:106-118.

[0345] 9.Zhu,X.,H.J.Belmont,S.Price-Schiavi,B.Liu,H.I.Lee,M.Fernandez,R.L.Wong,J.Builes,P.R.Rhode,and H.C.Wong.2006.Visualization of p53²⁶⁴⁻²⁷²/HLA-A*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor.J Immunol 176:3223-3232.

[0001]	<110>阿尔托生物科学有限公司
[0002]	<120>融合分子与IL-15变异体
[0003]	<130>68295W0 (48340)
[0004]	<140>PCT/US08/005918
[0005]	<141>2008-05-19
[0006]	<150>60/928,900
[0007]	<151>2007-05-11
[0008]	<160>40
[0009]	<170>PatentIn Ver.3.3
[0010]	<210>1
[0011]	<211>114
[0012]	<212>PRT
[0013]	<213>人类 (Homo sapiens)
[0014]	<400>1
[0015]	Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
[0016]	1 5 10 15
[0017]	Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
[0018]	20 25 30
[0019]	Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
[0020]	35 40 45
[0021]	Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
[0022]	50 55 60
[0023]	Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
[0024]	65 70 75 80
[0025]	Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
[0026]	85 90 95
[0027]	Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
[0028]	100 105 110
[0029]	Thr Ser
[0030]	<210>2
[0031]	<211>345
[0032]	<212>DNA
[0033]	<213>人类 (Homo sapiens)
[0034]	<400>2
[0035]	aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 60
[0036]	attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
[0037]	aagtgccttc tcttggagtt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat 180
[0038]	gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240

[0039]	acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg	300
[0040]	cagagttttg tacatattgt ccaaattgttc atcaacactt ctga	345
[0041]	<210>3	
[0042]	<211>20	
[0043]	<212>PRT	
[0044]	<213>人工序列	
[0045]	<220>	
[0046]	<223>人工序列的描述:合成肽	
[0047]	<400>3	
[0048]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
[0049]	1 5 10 15	
[0050]	Gly Gly Gly Ser	
[0051]	20	
[0052]	<210>4	
[0053]	<211>1563	
[0054]	<212>DNA	
[0055]	<213>人工序列	
[0056]	<220>	
[0057]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0058]	<400>4	
[0059]	accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60
[0060]	accggtcagt cagtgcgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg	120
[0061]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac	180
[0062]	ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccacgt ggttcaagga	240
[0063]	gtgaatggct tcgaggtcga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc	300
[0064]	tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat	360
[0065]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg	420
[0066]	ggcagcggcg gtgggtgttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat	480
[0067]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg	540
[0068]	aggtgtatcc ctgaaaagg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600
[0069]	gagttttaa ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact	660
[0070]	gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc	720
[0071]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780
[0072]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840
[0073]	ccaccgagg tcgtgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	900
[0074]	acactggtgt gcctggccac aggtttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960
[0075]	aatgggaagg aggtgcacag tggggctcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020
[0076]	gcctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	1080
[0077]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	1140

[0078]	gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggt	1200
[0079]	agagcagacg ttaacaactg ggtgaatgta ataagtatt tgaaaaaaat tgaagatctt	1260
[0080]	attcaatcta tgcattattga tgctacttta tatacgaaa gtgatgttca cccagttgc	1320
[0081]	aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg gagttacaag ttatttctact tgagtccgga	1380
[0082]	gatgcaagta ttcatgatac agtagaaaat ctgatcatcc tagcaaaaaa cagtttgtct	1440
[0083]	tctaattggga atgtaacaga atctggatgc aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaaat	1500
[0084]	attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat attgtccaaa tgttcatcaa cacttcttga	1560
[0085]	taa	1563
[0086]	<210>5	
[0087]	<211>517	
[0088]	<212>PRT	
[0089]	<213>人工序列	
[0090]	<220>	
[0091]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0092]	<400>5	
[0093]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
[0094]	1 5 10 15	
[0095]	Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val	
[0096]	20 25 30	
[0097]	Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly	
[0098]	35 40 45	
[0099]	Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln	
[0100]	50 55 60	
[0101]	Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn	
[0102]	65 70 75 80	
[0103]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg	
[0104]	85 90 95	
[0105]	Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu	
[0106]	100 105 110	
[0107]	Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu	
[0108]	115 120 125	
[0109]	Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
[0110]	130 135 140	
[0111]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys	
[0112]	145 150 155 160	
[0113]	Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala	
[0114]	165 170 175	
[0115]	Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr	
[0116]	180 185 190	

[0117]	Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn		
[0118]	195	200	205
[0119]	Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala		
[0120]	210	215	220
[0121]	Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu		
[0122]	225	230	235 240
[0123]	Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly		
[0124]	245	250	255
[0125]	Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu		
[0126]	260	265	270
[0127]	Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser		
[0128]	275	280	285
[0129]	Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala		
[0130]	290	295	300
[0131]	Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly		
[0132]	305	310	315 320
[0133]	Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu		
[0134]	325	330	335
[0135]	Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg		
[0136]	340	345	350
[0137]	Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln		
[0138]	355	360	365
[0139]	Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg		
[0140]	370	375	380
[0141]	Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala		
[0142]	385	390	395 400
[0143]	Asp Val Asn Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu		
[0144]	405	410	415
[0145]	Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser		
[0146]	420	425	430
[0147]	Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu		
[0148]	435	440	445
[0149]	Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp		
[0150]	450	455	460
[0151]	Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn		
[0152]	465	470	475 480
[0153]	Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu		
[0154]	485	490	495
[0155]	Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met		

[0156]	500	505	510
[0157]	Phe Ile Asn Thr Ser		
[0158]	515		
[0159]	<210>6		
[0160]	<211>1614		
[0161]	<212>DNA		
[0162]	<213>人工序列		
[0163]	<220>		
[0164]	<223>人工序列的描述:合成构筑体		
[0165]	<400>6		
[0166]	accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60	
[0167]	accggtcagt cagtgcgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg	120	
[0168]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acacctatc tgttctggta tgtccagtac	180	
[0169]	ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga	240	
[0170]	gtgaatggct tcgaggtga gttcagcaag agtaactctt ccttcacct gcggaaagcc	300	
[0171]	tctgtgact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgtt tgagcgagga tagcaactat	360	
[0172]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg	420	
[0173]	ggcagcggcg gtgggtgttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat	480	
[0174]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg	540	
[0175]	aggtgtatcc ctgaaaagg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600	
[0176]	gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagtc ttcagcaaat agacatgact	660	
[0177]	gaaaaacgat tctctgtga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtc	720	
[0178]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780	
[0179]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840	
[0180]	ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	900	
[0181]	acactgggtg gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960	
[0182]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020	
[0183]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	1080	
[0184]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	1140	
[0185]	gagtggacce aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggt	1200	
[0186]	agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca	1260	
[0187]	acgcgtaact gggatgaatg aataagtgtt ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct	1320	
[0188]	atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca	1380	
[0189]	gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt	1440	
[0190]	attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttgct ttctaatggg	1500	
[0191]	aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa	1560	
[0192]	tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acatttcttg ataa	1614	
[0193]	<210>7		
[0194]	<211>534		

[0195]	<212>PRT															
[0196]	<213>人工序列															
[0197]	<220>															
[0198]	<223>人工序列的描述:合成构筑体															
[0199]	<400>7															
[0200]	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
[0201]	1				5					10					15	
[0202]	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Asp	Ala	Arg	Val	Thr	Val
[0203]					20					25					30	
[0204]	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Leu	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Gly
[0205]					35					40					45	
[0206]	Thr	Pro	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Val	Gln	Tyr	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Gln
[0207]					50					55					60	
[0208]	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asp	Pro	Val	Val	Gln	Gly	Val	Asn
[0209]	65					70					75					80
[0210]	Gly	Phe	Glu	Ala	Glu	Phe	Ser	Lys	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	His	Leu	Arg
[0211]						85					90					95
[0212]	Lys	Ala	Ser	Val	His	Trp	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Val	Leu
[0213]						100					105				110	
[0214]	Ser	Glu	Asp	Ser	Asn	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu
[0215]						115					120				125	
[0216]	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0217]						130					135				140	
[0218]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Lys
[0219]	145						150					155				160
[0220]	Val	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Ala
[0221]							165					170				175
[0222]	Lys	Met	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Lys	Gly	His	Pro	Val	Val	Phe	Trp	Tyr
[0223]							180					185				190
[0224]	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Ile	Asn	Phe	Gln	Asn
[0225]							195					200				205
[0226]	Gln	Glu	Val	Leu	Gln	Gln	Ile	Asp	Met	Thr	Glu	Lys	Arg	Phe	Ser	Ala
[0227]							210					215				220
[0228]	Glu	Cys	Pro	Ser	Asn	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu
[0229]	225						230					235				240
[0230]	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly
[0231]							245					250				255
[0232]	Gly	Thr	Glu	Val	Phe	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu
[0233]							260					265				270

[0234]	Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser		
[0235]	275	280	285
[0236]	Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala		
[0237]	290	295	300
[0238]	Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly		
[0239]	305	310	315 320
[0240]	Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Gru		
[0241]	325	330	335
[0242]	Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg		
[0243]	340	345	350
[0244]	Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln		
[0245]	355	360	365
[0246]	Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg		
[0247]	370	375	380
[0248]	Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala		
[0249]	385	390	395 400
[0250]	Asp Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro		
[0251]	405	410	415
[0252]	Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile		
[0253]	420	425	430
[0254]	Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu		
[0255]	435	440	445
[0256]	Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu		
[0257]	450	455	460
[0258]	Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His		
[0259]	465	470	475 480
[0260]	Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser		
[0261]	485	490	495
[0262]	Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu		
[0263]	500	505	510
[0264]	Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln		
[0265]	515	520	525
[0266]	Met Phe Ile Asn Thr Ser		
[0267]	530		
[0268]	<210>8		
[0269]	<211>1647		
[0270]	<212>DNA		
[0271]	<213>人工序列		
[0272]	<220>		

[0273]	<223>人工序列的描述:合成构筑体			
[0274]	<400>8			
[0275]	accaccatgg	agacagacac	actcctgtta	tggttactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
[0276]	accggtcagt	cagtgacgca	gcccgatgct	cgctcactg tctctgaagg agcctctctg 120
[0277]	cagctgagat	gcaagtattc	ctactctggg	acaccttacc tgttctggta tgtccagtac 180
[0278]	ccgcggcagg	ggctgcagct	gctcctcaag	tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
[0279]	gtgaatggct	tcgaggtcga	gttcagcaag	agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
[0280]	tctgtgcact	ggagcgactc	tgctgtgtac	ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
[0281]	cagttgatct	ggggctctgg	gaccaagcta	attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
[0282]	ggcagcggcg	gtgggtggtc	cgggtggcggc	ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480
[0283]	tcaaaagtca	ttcagactcc	aagatatctg	gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
[0284]	aggtgtatcc	ctgaaaaggg	acatccagtt	gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat 600
[0285]	gagtttaaat	ttttgattaa	ctttcagaat	caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
[0286]	gaaaaacgat	tctctgctga	gtgtccttca	aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc 720
[0287]	tctgaggcag	gagactcage	actgtacctc	tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
[0288]	gaagttttct	ttggtaaagg	aaccagactc	acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
[0289]	ccacccgagg	tcgtgtgttt	tgagccatca	gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc 900
[0290]	acactggtgt	gcctggccac	aggtctcttc	cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
[0291]	aatgggaagg	aggtgcacag	tggggctcagc	acggaccgcg agccctcaa ggagcagccc 1020
[0292]	gccctcaatg	actccagata	ctgcctgagc	agccgcctga gggctctggc caccttctgg 1080
[0293]	cagaaccccc	gcaaccactt	ccgtgtctaa	gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
[0294]	gagtggaccc	aggatagggc	caaaccgcgc	accagatcgc tcagcgccga ggcctgggg 1200
[0295]	agagcagacg	ttaacatcac	gtgccctccc	ccatgtccg tggaacacgc agacatctgg 1260
[0296]	gtcaagagct	acagcttgta	ctccaggagc	cggtacattt gtaactctgg tttcaagcgt 1320
[0297]	aaagccggca	cgtccagcct	gacggagtgc	gtgttgaaaca aggccacgaa tgctgcccc 1380
[0298]	tggaacaacc	ccagtctcaa	atgcattaga	ccgcagctt catctcccag ctcaaacaa 1440
[0299]	acagcggcca	caacagcagc	tattgtcccc	ggctcccagc tgatgccttc aaaatcacct 1500
[0300]	tccacaggaa	ccacagagat	aagcagtcac	gagtcctccc acggcacccc ctctcagaca 1560
[0301]	acagccaaga	actgggaact	cacagcatcc	gcctcccacc agccgccagg tgtgtatcca 1620
[0302]	cagggccaca	gcgacaccac	ttgataa	1647
[0303]	<210>9			
[0304]	<211>545			
[0305]	<212>PRT			
[0306]	<213>人工序列			
[0307]	<220>			
[0308]	<223>人工序列的描述:合成构筑体			
[0309]	<400>9			
[0310]	Met	Glu	Thr	Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0311]	1	5	10	15

[0312]	Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
[0313]	20 25 30
[0314]	Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
[0315]	35 40 45
[0316]	Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
[0317]	50 55 60
[0318]	Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
[0319]	65 70 75 80
[0320]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
[0321]	85 90 95
[0322]	Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
[0323]	100 105 110
[0324]	Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
[0325]	115 120 125
[0326]	Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0327]	130 135 140
[0328]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
[0329]	145 150 155 160
[0330]	Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
[0331]	165 170 175
[0332]	Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
[0333]	180 185 190
[0334]	Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
[0335]	195 200 205
[0336]	Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
[0337]	210 215 220
[0338]	Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
[0339]	225 230 235 240
[0340]	Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
[0341]	245 250 255
[0342]	Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
[0343]	260 265 270
[0344]	Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
[0345]	275 280 285
[0346]	Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
[0347]	290 295 300
[0348]	Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
[0349]	305 310 315 320
[0350]	Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu

[0351]		325		330		335
[0352]	Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg					
[0353]		340		345		350
[0354]	Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln					
[0355]		355		360		365
[0356]	Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg					
[0357]		370		375		380
[0358]	Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala					
[0359]		385		390		395
[0360]	Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp					
[0361]		405		410		415
[0362]	Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys					
[0363]		420		425		430
[0364]	Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys					
[0365]		435		440		445
[0366]	Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu					
[0367]		450		455		460
[0368]	Lys Cys Ile Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala					
[0369]		465		470		475
[0370]	Ala Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys					
[0371]		485		490		495
[0372]	Ser Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His					
[0373]		500		505		510
[0374]	Gly Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser					
[0375]		515		520		525
[0376]	Ala Ser His Gln Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr					
[0377]		530		535		540
[0378]	Thr					
[0379]	545					
[0380]	<210>10					
[0381]	<211>1410					
[0382]	<212>DNA					
[0383]	<213>人工序列					
[0384]	<220>					
[0385]	<223>人工序列的描述:合成构筑体					
[0386]	<400>10					
[0387]	accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60					
[0388]	accggtcagt cagtgaacga gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120					
[0389]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acacettatc tgttctggta tgtccagtac 180					

[0390]	ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga	240
[0391]	gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc	300
[0392]	tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat	360
[0393]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg	420
[0394]	ggcagcggcg gtggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat	480
[0395]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg	540
[0396]	aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600
[0397]	gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact	660
[0398]	gaaaaacgat tctctgtcga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc	720
[0399]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780
[0400]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840
[0401]	ccaccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	900
[0402]	acactggtgt gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960
[0403]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020
[0404]	gcctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	1080
[0405]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggtcttc ggagaatgac	1140
[0406]	gagtggacct aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggccctgggt	1200
[0407]	agagcagacg ttaacatcac gtgcctccc cccatgtccg tgaacacgc agacatctgg	1260
[0408]	gtcaagagct acagcttgta ctccaggag cggtacattt gtaactctgg tttcaagcgt	1320
[0409]	aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtgttgaaca aggccacgaa tgtcgccac	1380
[0410]	tggacaaccc ccagtctcaa atgcattaga	1410
[0411]	<210>11	
[0412]	<211>468	
[0413]	<212>PRT	
[0414]	<213>人工序列	
[0415]	<220>	
[0416]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0417]	<400>11	
[0418]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
[0419]	1 5 10 15	
[0420]	Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val	
[0421]	20 25 30	
[0422]	Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly	
[0423]	35 40 45	
[0424]	Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln	
[0425]	50 55 60	
[0426]	Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn	
[0427]	65 70 75 80	
[0428]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg	

[0429]	85							90							95				
[0430]	Lys	Ala	Ser	Val	His	Trp	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Val	Leu			
[0431]	100							105							110				
[0432]	Ser	Glu	Asp	Ser	Asn	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu			
[0433]	115							120							125				
[0434]	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly			
[0435]	130							135							140				
[0436]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Lys			
[0437]	145							150							155			160	
[0438]	Val	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Ala			
[0439]	165							170							175				
[0440]	Lys	Met	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Lys	Gly	His	Pro	Val	Val	Phe	Trp	Tyr			
[0441]	180							185							190				
[0442]	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Ile	Asn	Phe	Gln	Asn			
[0443]	195							200							205				
[0444]	Gln	Glu	Val	Leu	Gln	Gln	Ile	Asp	Met	Thr	Glu	Lys	Arg	Phe	Ser	Ala			
[0445]	210							215							220				
[0446]	Glu	Cys	Pro	Ser	Asn	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu			
[0447]	225							230							235			240	
[0448]	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly			
[0449]	245							250							255				
[0450]	Gly	Thr	Glu	Val	Phe	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu			
[0451]	260							265							270				
[0452]	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser			
[0453]	275							280							285				
[0454]	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala			
[0455]	290							295							300				
[0456]	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly			
[0457]	305							310							315			320	
[0458]	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu			
[0459]	325							330							335				
[0460]	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg			
[0461]	340							345							350				
[0462]	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln			
[0463]	355							360							365				
[0464]	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg			
[0465]	370							375							380				
[0466]	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala			
[0467]	385							390							395			400	

[0468]	Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp	
[0469]	405	410 415
[0470]	Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys	
[0471]	420	425 430
[0472]	Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys	
[0473]	435	440 445
[0474]	Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu	
[0475]	450	455 460
[0476]	Lys Cys Ile Arg	
[0477]	465	
[0478]	<210>12	
[0479]	<211>1467	
[0480]	<212>DNA	
[0481]	<213>人工序列	
[0482]	<220>	
[0483]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0484]	<400>12	
[0485]	accacatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60
[0486]	accggtcagt cagtgcgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg	120
[0487]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acacettatc tgttctggta tgtccagtac	180
[0488]	ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga	240
[0489]	gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc	300
[0490]	tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat	360
[0491]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg	420
[0492]	ggcagcggcg gtgggtgttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat	480
[0493]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg	540
[0494]	aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600
[0495]	gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact	660
[0496]	gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc	720
[0497]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780
[0498]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840
[0499]	ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac caaaaggcc	900
[0500]	acactggtgt gcctggccac aggtttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960
[0501]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020
[0502]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	1080
[0503]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggtcttc ggagaatgac	1140
[0504]	gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcga ggccctgggt	1200
[0505]	agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca	1260
[0506]	acgcgtatca cgtgccctcc ccccatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc	1320

[0507] tacagcttgt actccagga gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 1380
 [0508] acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc 1440
 [0509] cccagtctca aatgcattag atgataa 1467
 [0510] <210>13
 [0511] <211>485
 [0512] <212>pRT
 [0513] <213>人工序列
 [0514] <220>
 [0515] <223>人工序列的描述:合成构筑体
 [0516] <400>13
 [0517] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 [0518] 1 5 10 15
 [0519] Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 [0520] 20 25 30
 [0521] Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 [0522] 35 40 45
 [0523] Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 [0524] 50 55 60
 [0525] Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 [0526] 65 70 75 80
 [0527] Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 [0528] 85 90 95
 [0529] Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 [0530] 100 105 110
 [0531] Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 [0532] 115 120 125
 [0533] Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 [0534] 130 135 140
 [0535] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 [0536] 145 150 155 160
 [0537] Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 [0538] 165 170 175
 [0539] Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 [0540] 180 185 190
 [0541] Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 [0542] 195 200 205
 [0543] Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 [0544] 210 215 220
 [0545] Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu

[0546]	225	230	235	240
[0547]	Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly			
[0548]		245	250	255
[0549]	Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu			
[0550]		260	265	270
[0551]	Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser			
[0552]		275	280	285
[0553]	Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala			
[0554]		290	295	300
[0555]	Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly			
[0556]	305	310	315	320
[0557]	Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu			
[0558]		325	330	335
[0559]	Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg			
[0560]		340	345	350
[0561]	Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln			
[0562]		355	360	365
[0563]	Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg			
[0564]		370	375	380
[0565]	Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala			
[0566]	385	390	395	400
[0567]	Asp Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro			
[0568]		405	410	415
[0569]	Ser Pro Thr Arg Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala			
[0570]		420	425	430
[0571]	Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile			
[0572]		435	440	445
[0573]	Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu			
[0574]		450	455	460
[0575]	Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser			
[0576]	465	470	475	480
[0577]	Leu Lys Cys Ile Arg			
[0578]		485		
[0579]	<210>14			
[0580]	<211>1614			
[0581]	<212>DNA			
[0582]	<213>人工序列			
[0583]	<220>			
[0584]	<223>人工序列的描述:合成构筑体			

[0585]	<400>14	
[0586]	accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60
[0587]	accggtcagt cagtgcgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg	120
[0588]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac	180
[0589]	ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccacgt ggttcaagga	240
[0590]	gtgaatggct tcgaggtga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc	300
[0591]	tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat	360
[0592]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgt	420
[0593]	ggcagcggcg gtgggtgttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctgagcaat	480
[0594]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaaggc aaggacaaaa agcaaagatg	540
[0595]	aggtgtatcc ctgaaaagg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600
[0596]	gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagtc ttcagcaaat agacatgact	660
[0597]	gaaaaacgat tctctgtga gtgtccttca aactacett gcagcctaga aattcagtc	720
[0598]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780
[0599]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840
[0600]	ccaccgagg tcgtgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	900
[0601]	acactggtgt gctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960
[0602]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020
[0603]	gcctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc cacttcttg	1080
[0604]	cagaacccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	1140
[0605]	gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcga ggcctggggt	1200
[0606]	agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca	1260
[0607]	acgcgtaact gggatgaatgt aataagtgtt ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct	1320
[0608]	atgcatattg atgctacttt atatacgga agtgatgttc accccagttg caaagtaaca	1380
[0609]	gcaatgaagt gcttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcgg agatgcaagt	1440
[0610]	attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaca acagtttgct ttctaattggg	1500
[0611]	aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaacaaaa tattaagaa	1560
[0612]	ttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acattcttg ataa	1614
[0613]	<210>15	
[0614]	<211>1614	
[0615]	<212>DNA	
[0616]	<213>人工序列	
[0617]	<220>	
[0618]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0619]	<400>15	
[0620]	accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc	60
[0621]	accggtcagt cagtgcgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg	120
[0622]	cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgttctggta tgtccagtac	180
[0623]	ccgcggoagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccacgt ggttcaagga	240

[0624]	gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc	300
[0625]	tctgtgact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat	360
[0626]	cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg	420
[0627]	ggcagcggcg gtgggtgggtc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggttc ctcgagcaat	480
[0628]	tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg	540
[0629]	aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat	600
[0630]	gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact	660
[0631]	gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc	720
[0632]	tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca	780
[0633]	gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc	840
[0634]	ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	900
[0635]	acactggtgt gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	960
[0636]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc	1020
[0637]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	1080
[0638]	cagaaccccc gcaaccactt ccgtgtcaa gtccagttct acgggtcttc ggagaatgac	1140
[0639]	gagtggacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcga ggccctgggt	1200
[0640]	agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca	1260
[0641]	acgcgtaact gggatgaatgt aataagtaat ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct	1320
[0642]	atgcatattg atgctacttt atatacgga agtgatgttc accccagttg caaagtaaca	1380
[0643]	gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcgg agatgcaagt	1440
[0644]	attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaca acagtttgct ttctaattggg	1500
[0645]	aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg agggaaaaaaa tattaaagaa	1560
[0646]	tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acatttcttg ataa	1614
[0647]	<210>16	
[0648]	<211>534	
[0649]	<212>PRT	
[0650]	<213>人工序列	
[0651]	<220>	
[0652]	<223>人工序列的描述:合成构筑体	
[0653]	<400>16	
[0654]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
[0655]	1 5 10 15	
[0656]	Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val	
[0657]	20 25 30	
[0658]	Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly	
[0659]	35 40 45	
[0660]	Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln	
[0661]	50 55 60	
[0662]	Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn	

[0663]	65	70	75	80
[0664]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg			
[0665]		85	90	95
[0666]	Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu			
[0667]		100	105	110
[0668]	Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu			
[0669]		115	120	125
[0670]	Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
[0671]		130	135	140
[0672]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys			
[0673]	145	150	155	160
[0674]	Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala			
[0675]		165	170	175
[0676]	Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr			
[0677]		180	185	190
[0678]	Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn			
[0679]		195	200	205
[0680]	Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala			
[0681]		210	215	220
[0682]	Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu			
[0683]	225	230	235	240
[0684]	Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly			
[0685]		245	250	255
[0686]	Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu			
[0687]		260	265	270
[0688]	Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser			
[0689]		275	280	285
[0690]	Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala			
[0691]		290	295	300
[0692]	Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly			
[0693]	305	310	315	320
[0694]	Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu			
[0695]		325	330	335
[0696]	Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg			
[0697]		340	345	350
[0698]	Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln			
[0699]		355	360	365
[0700]	Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg			
[0701]		370	375	380

[0702]	Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
[0703]	385 390 395 400
[0704]	Asp Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
[0705]	405 410 415
[0706]	Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Ala Leu Lys Lys Ile
[0707]	420 425 430
[0708]	Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
[0709]	435 440 445
[0710]	Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
[0711]	450 455 460
[0712]	Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
[0713]	465 470 475 480
[0714]	Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
[0715]	485 490 495
[0716]	Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
[0717]	500 505 510
[0718]	Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
[0719]	515 520 525
[0720]	Met Phe Ile Asn Thr Ser
[0721]	530
[0722]	<210>17
[0723]	<211>534
[0724]	<212>PRT
[0725]	<213>人工序列
[0726]	<220>
[0727]	<223>人工序列的描述:合成构筑体
[0728]	<400>17
[0729]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0730]	1 5 10 15
[0731]	Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
[0732]	20 25 30
[0733]	Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
[0734]	35 40 45
[0735]	Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
[0736]	50 55 60
[0737]	Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
[0738]	65 70 75 80
[0739]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
[0740]	85 90 95

[0741]	Lys	Ala	Ser	Val	His	Trp	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Val	Leu
[0742]				100					105					110		
[0743]	Ser	Glu	Asp	Ser	Asn	Tyr	Gln	Leu	Ile	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu
[0744]				115					120					125		
[0745]	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0746]				130					135					140		
[0747]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Lys
[0748]	145							150					155			160
[0749]	Val	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Ala
[0750]								165					170			175
[0751]	Lys	Met	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Lys	Gly	His	Pro	Val	Val	Phe	Trp	Tyr
[0752]				180						185					190	
[0753]	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Ile	Asn	Phe	Gln	Asn
[0754]				195						200					205	
[0755]	Gln	Glu	Val	Leu	Gln	Gln	Ile	Asp	Met	Thr	Glu	Lys	Arg	Phe	Ser	Ala
[0756]				210						215				220		
[0757]	Glu	Cys	Pro	Ser	Asn	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu
[0758]	225						230					235				240
[0759]	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly
[0760]							245					250				255
[0761]	Gly	Thr	Glu	Val	Phe	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu
[0762]				260						265					270	
[0763]	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser
[0764]				275						280				285		
[0765]	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala
[0766]				290						295				300		
[0767]	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly
[0768]	305						310					315				320
[0769]	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
[0770]							325					330				335
[0771]	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
[0772]				340						345					350	
[0773]	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
[0774]				355						360				365		
[0775]	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
[0776]				370						375				380		
[0777]	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
[0778]	385						390					395				400
[0779]	Asp	Val	Asn	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro

[0780]	405	410	415
[0781]	Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asn Leu Lys Lys Ile		
[0782]	420	425	430
[0783]	Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu		
[0784]	435	440	445
[0785]	Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu		
[0786]	450	455	460
[0787]	Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His		
[0788]	465	470	475
[0789]	Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser		
[0790]	485	490	495
[0791]	Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu		
[0792]	500	505	510
[0793]	Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln		
[0794]	515	520	525
[0795]	Met Phe Ile Asn Thr Ser		
[0796]	530		
[0797]	<210>18		
[0798]	<211>10		
[0799]	<212>PRT		
[0800]	<213>人工序列		
[0801]	<220>		
[0802]	<223>人工序列的描述:合成肽		
[0803]	<400>18		
[0804]	Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0805]	1	5	10
[0806]	<210>19		
[0807]	<211>23		
[0808]	<212>DNA		
[0809]	<213>人工序列		
[0810]	<220>		
[0811]	<223>人工序列的描述:合成引子		
[0812]	<400>19		
[0813]	caccttgcca tagccagctcttc	23	
[0814]	<210>20		
[0815]	<211>24		
[0816]	<212>DNA		
[0817]	<213>人工序列		
[0818]	<220>		

[0819]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0820]	<400>20	
[0821]	gtctaagcag cagagtgatg ttg	24
[0822]	<210>21	
[0823]	<211>30	
[0824]	<212>DNA	
[0825]	<213>人工序列	
[0826]	<220>	
[0827]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0828]	<400>21	
[0829]	tggttaacaa ctgggtgaat gtaataagtg	30
[0830]	<210>22	
[0831]	<211>36	
[0832]	<212>DNA	
[0833]	<213>人工序列	
[0834]	<220>	
[0835]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0836]	<400>22	
[0837]	acgcgtttat caagaagtgt tgatgaacat ttggac	36
[0838]	<210>23	
[0839]	<211>28	
[0840]	<212>DNA	
[0841]	<213>人工序列	
[0842]	<220>	
[0843]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0844]	<400>23	
[0845]	tggtgggtta acgagcccaa atcttctg	28
[0846]	<210>24	
[0847]	<211>29	
[0848]	<212>DNA	
[0849]	<213>人工序列	
[0850]	<220>	
[0851]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0852]	<400>24	
[0853]	attattacgc gttggagacg gtggagatg	29
[0854]	<210>25	
[0855]	<211>32	
[0856]	<212>DNA	
[0857]	<213>人工序列	

[0858]	<220>	
[0859]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0860]	<400>25	
[0861]	tgagtgatcg ataccaccat ggagacagac ac	32
[0862]	<210>26	
[0863]	<211>25	
[0864]	<212>DNA	
[0865]	<213>人工序列	
[0866]	<220>	
[0867]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0868]	<400>26	
[0869]	tggtggacgc gtaactgggt gaatg	25
[0870]	<210>27	
[0871]	<211>32	
[0872]	<212>DNA	
[0873]	<213>人工序列	
[0874]	<220>	
[0875]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0876]	<400>27	
[0877]	tggtggtcta gaattatcaa gaagtgttga tg	32
[0878]	<210>28	
[0879]	<211>20	
[0880]	<212>DNA	
[0881]	<213>人工序列	
[0882]	<220>	
[0883]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0884]	<400>28	
[0885]	agtccagcgg tgcctgtgg	20
[0886]	<210>29	
[0887]	<211>31	
[0888]	<212>DNA	
[0889]	<213>人工序列	
[0890]	<220>	
[0891]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0892]	<400>29	
[0893]	tgacgcgttt aagtgggtgc gctgtgccct g	31
[0894]	<210>30	
[0895]	<211>29	
[0896]	<212>DNA	

[0897]	<213>人工序列	
[0898]	<220>	
[0899]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0900]	<400>30	
[0901]	tggttaacat cacgtgccct ccccccattg	29
[0902]	<210>31	
[0903]	<211>35	
[0904]	<212>DNA	
[0905]	<213>人工序列	
[0906]	<220>	
[0907]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0908]	<400>31	
[0909]	ttgttgacgc gtttatctaa tgcatttgagactgg	35
[0910]	<210>32	
[0911]	<211>25	
[0912]	<212>DNA	
[0913]	<213>人工序列	
[0914]	<220>	
[0915]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0916]	<400>32	
[0917]	taataaacgc gtatcacgtg ccctc	25
[0918]	<210>33	
[0919]	<211>31	
[0920]	<212>DNA	
[0921]	<213>人工序列	
[0922]	<220>	
[0923]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0924]	<400>33	
[0925]	tggtggtcta gattatcatc taatgcattt g	31
[0926]	<210>34	
[0927]	<211>32	
[0928]	<212>DNA	
[0929]	<213>人工序列	
[0930]	<220>	
[0931]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0932]	<400>34	
[0933]	tgagtgtccg ga accaccat ggagacagac ac	32
[0934]	<210>35	
[0935]	<211>35	

[0936]	<212>DNA	
[0937]	<213>人工序列	
[0938]	<220>	
[0939]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0940]	<400>35	
[0941]	ttgttggcgg ccgcttatca tctaatacat ttgag	35
[0942]	<210>36	
[0943]	<211>34	
[0944]	<212>DNA	
[0945]	<213>人工序列	
[0946]	<220>	
[0947]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0948]	<400>36	
[0949]	tgagtgttcg aattatcaag aagtgttgat gaac	34
[0950]	<210>37	
[0951]	<211>33	
[0952]	<212>DNA	
[0953]	<213>人工序列	
[0954]	<220>	
[0955]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0956]	<400>37	
[0957]	ttgttggcgg ccgcttatca agtggtgtcg ctg	33
[0958]	<210>38	
[0959]	<211>42	
[0960]	<212>DNA	
[0961]	<213>人工序列	
[0962]	<220>	
[0963]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0964]	<400>38	
[0965]	agatcttcaa tttttttcaa mkhacttatt acattcaccc ag	42
[0966]	<210>39	
[0967]	<211>42	
[0968]	<212>DNA	
[0969]	<213>人工序列	
[0970]	<220>	
[0971]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0972]	<400>39	
[0973]	actgggtgaa tgtaataagt dmkttgaaaa aaattgaagatc	42
[0974]	<210>40	

[0975]	<211>31	
[0976]	<212>DNA	
[0977]	<213>人工序列	
[0978]	<220>	
[0979]	<223>人工序列的描述:合成引子	
[0980]	<400>40	
[0981]	tggtggtcta gattatcaag aagtgttgat g	31

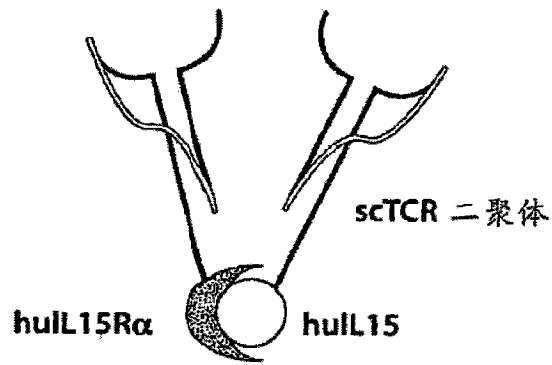


图1A

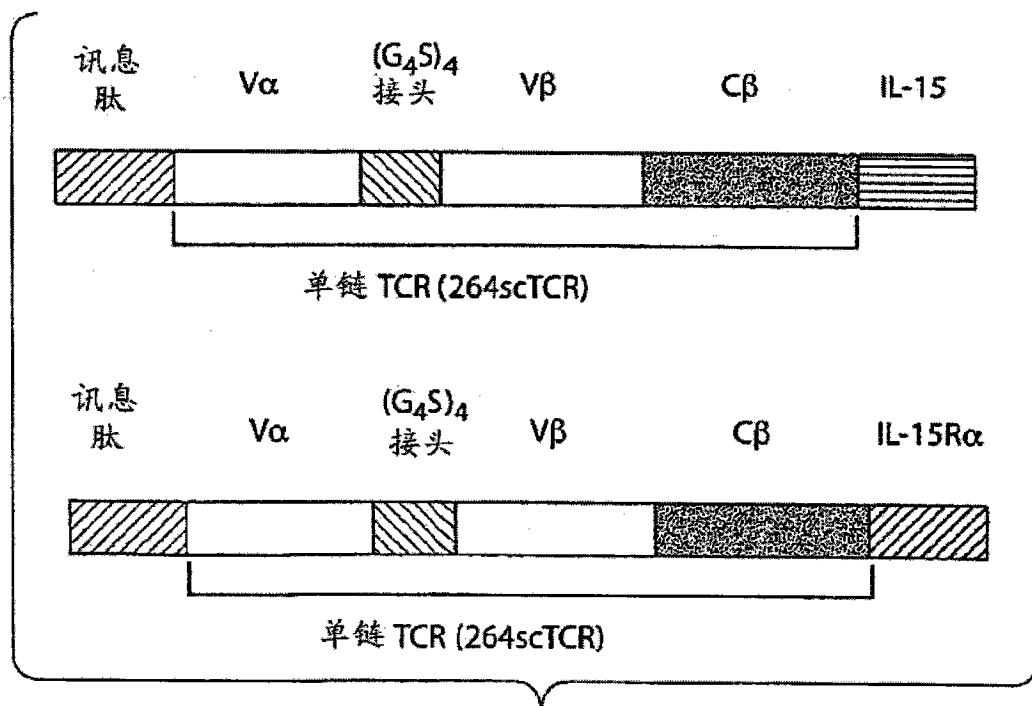


图1B

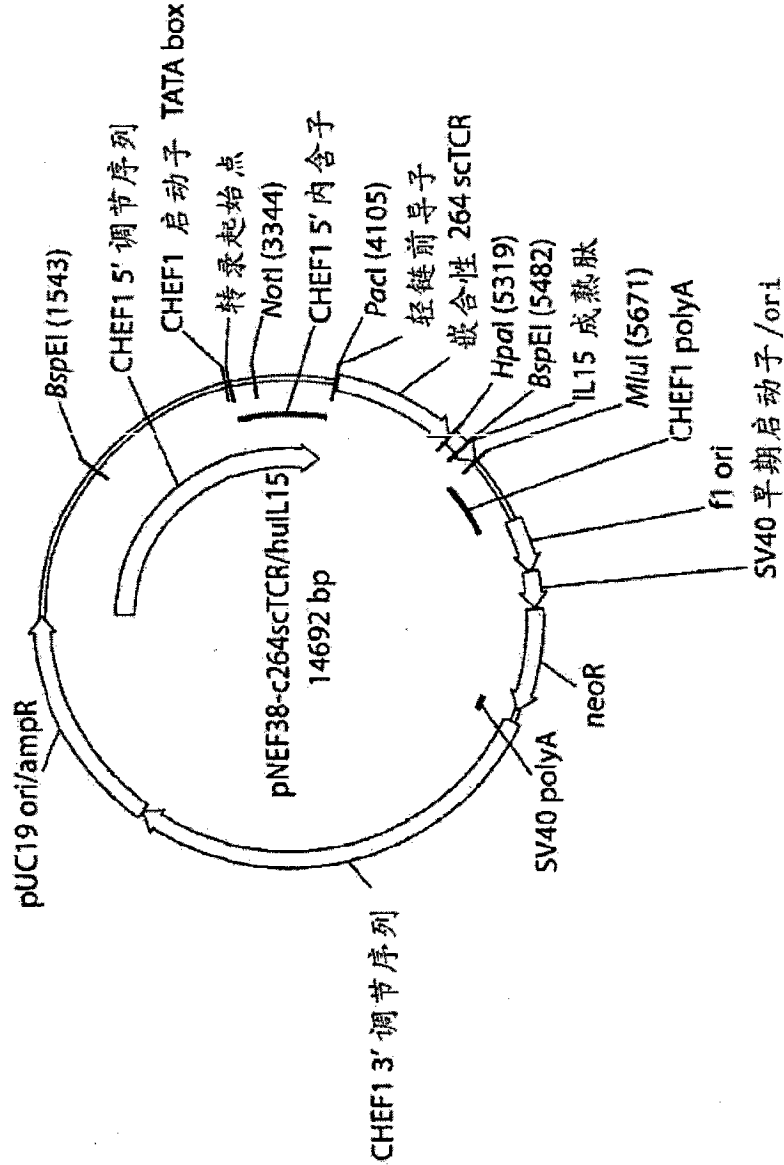


图2A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACATCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGTTCCAGGTTCCACCGGTCACT
 CAGTGACGACGCCGATGCTCGGTCATGCTCTGTAAGGAGCCCTCTCTGACGCTGAGATGCAAGTATTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTCTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGCAGGGGCTGCRGCTGCTCCTCAAG
 TACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGCCTGAGTTTCAGCAAGAGTAACTCTT
 CCTTCCACCTGCGGAAGCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTGTGAGCGAGGA
 TAGCAACTATCATGTTGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAAATATAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGCGGTGGTTCGGTGGCGCGGTCTGGCGGTGGCGGTCTCGAGCAATTCAAAAAGTCA
 TTCAGACTCCAAAGATATCTGTTGAAGGGCAAGGCAAAAAAGCAAGATGAGTTTAAATTTTGATTAACCTTCAGAAAT
 ACATCCAGTTGTATCTGGTATCAACAAAAATAAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGATTAACCTTCAGAAAT
 CAAGAACTTCTTCAGCAATAAGACATGACTGA AAAACGATTCCTGCTGAGTGTCTCTCAAACTCACCTT
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCCCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGTGCCAGCAGTCTGTCAAG
 GGGCGGCACAGAAATTTTCTTTGGTAAAGGAACCCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCCTGAACAAGGTGTTT
 CCACCCGAGGTGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCCAAAGGCCACACTGGTGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCCAGTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAG
 TGGGTTCAGCACGGACCCGACGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGC
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCGTCAGTCCGCTGTCAAGTCAAGTCT
 ACGGGCTCTCGGEGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAAGCCCGA
 GGCCCTGGGTAGAGCAGACGTTAAACAACCTGGGTGAATGTAAATAGTGATTTGAAAAAATTTGAAGATCTT
 ATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGAGTATTTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATAC
 CAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATAC
 AGTAGAAAAATCTGATCATCTCCTAGCAAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAACAGAACTCTGGATGC
 AAAAGAAATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAATATTAAAGAAATTTTTCAGAGTTTGTGTACATATTGTCCAAA
 TGTTCATCAACACTTCTTGATAA -3'

图2B

metdtlllwlllwpgstgqsvtqpdarvtvsegaslqlrckysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyyys
< 讯息肽 >< TCR Vα
gdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwsdsavfvcvlsedsnyqliwsgtgklilikpdtsgggsggg
TCR Vα >< 接头
ggsgggsgggsgggssnskviqtprylvkqgqgakmrcipekghpvvfwyqqnknefkflinfqnqevlq
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdppplkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnpnrnhfrcgvqfyqlsendewtgdrakpvtqiysaeawgradvnnwvvisdlkkiedliqsmhida
TCR Cβ > < IL-15
tlytesdvhpsockvtamkcfllelqvlslesgdasihdtvenliilannsslsgnvnvtesgckeceeleek
IL-15
nikeflqsfvhiqvfmfints
IL-15 >

图2C

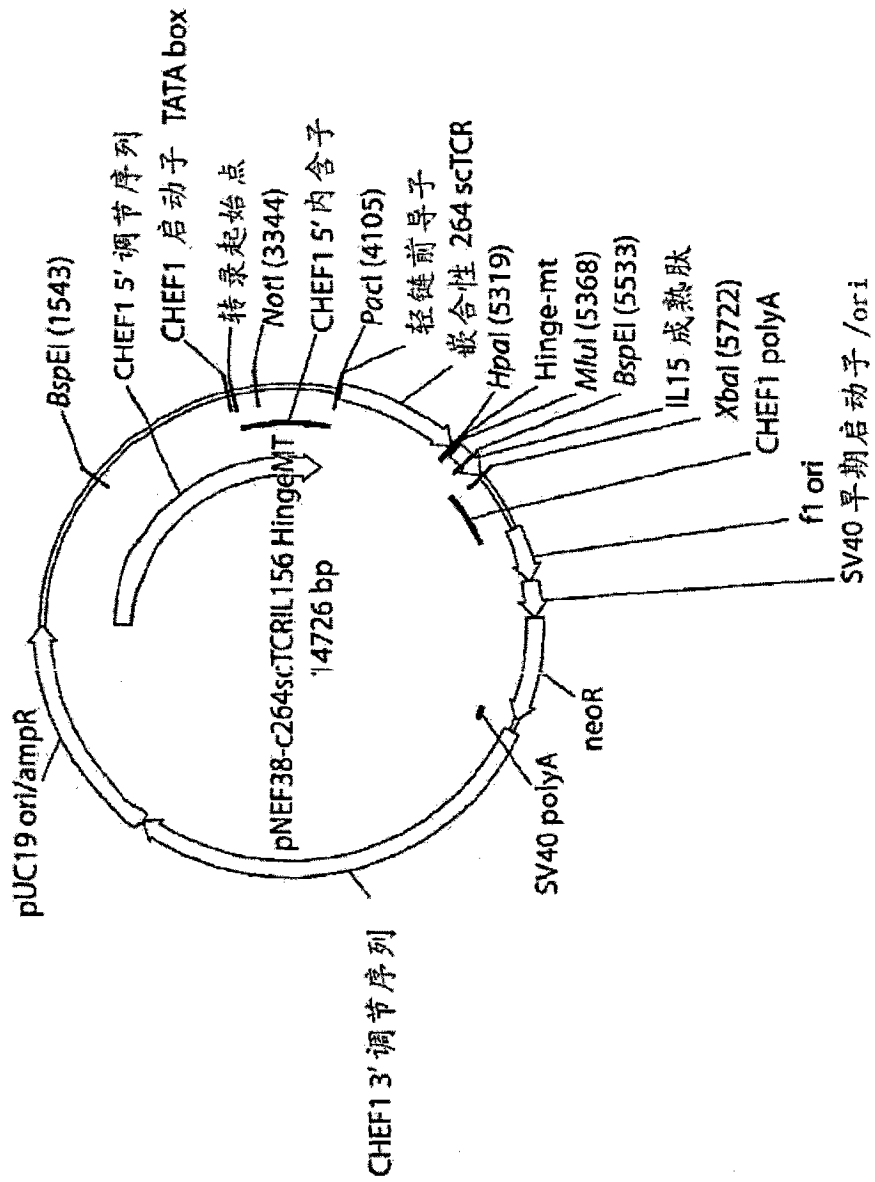


图3A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCTGTATATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAAGTCAGTCAGTCAGCGCAGC
 CCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCTCTACTCTCTGGGACACCTTATCTGT
 CTGGTATCTCCAGTACCCGCGGCAGGGCTGTCAGCTGCTCTCAAGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAT
 GGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTCTCTTCCACCTGCGGAAAGCCCTCTGTGCACTGGAGCGGACTCTGTCTGTGT
 ACTTCTGTGTTTTGAGCGGAGGATAGCAACTATATCAGTTGATCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATATAAGCCAGACACTAG
 TGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGTGGTTCGGTGGCGGCTCTGGGCTCTGGGCTCTCTCGAGCAATTCAAAAGTCATT
 CAGACTCCAAAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGCAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGTAT
 TCTGGTATCAACAAATAAGAAATGAGTTTAATTTTGTATTAACTTTCAAGTCAAGAAAGTTCTTCAGCAAAATAGACAT
 GACTGAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTCTTCAACTCACTTGCAGCCTAGAAAATTCAAGTCTCTCTGAGGCGAGGACTCA
 GCACGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTCAAGGGGCGGCACAGAGTTTCTTTGGTAAAGGAACCCAGACTCACAGTTGTAG
 AGGACCTGAAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGTGTGTGTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCCAAAGGCCAC
 ACTGGTGTGCTGCCACAGGCTTCTTCTGACCCACGTTGAGCTGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGG
 GTCAGCACGGACCCGACGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATATGCTGCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCT
 CGGCCACCTTCTGTGGCAGAACCCCGGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCTGGAGARTGACGAGTGGAC
 CCAGGATAGGGCCAAACCCGTCAACCCAGATCGTCAAGCGCCGAGGCTGGGTAGAGCAGACGTTAAGGAGCCCAAATCTTCT
 GACAAACTCAACATCTCCACCGTCTCCAACCGGTAACTGGGTGAATGTAATAGTGATTTGAAAATAATTGAAGATCTTA
 TTCAATCTATGCAATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGTGTTCCACCCAGTTGCAAAAGTAAACAGCAATGAAGTCTT
 TCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCATTGAGTCCGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGTATCATCTCTAGCA
 AACAAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTACAGARTCTGGATGCAAGAAATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAATAATTAAG
 AATTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTTGATAA - 3'

图3B

```

metdtllllwvllllwpgstgqsvtqpdarvtvsegasqlrckysysgtpylfwyvqyprgqllllkyys
< 讯息肽 >< TCR Vα
gdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqliwsgtklilkpdtsgggsgsgg
TCR Vα >< 接头
ggsgggsgggsgggssnskviqtprylvkgggqkakmrceipekghpvfwyqqnknefkflinfqnqevlq
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfqkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdfqplkeqpaldsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnpnrnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaaawgradvnepkssdkthtsppsptnwnvvi
TCR Cβ > < 接头 > < IL-15
sdlkkiedligsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllelqvislesgdasihdtvenlilannsslssn
IL-15
gnvtesgckeceeeleeknikeflqsfvhiqmfints
IL-15 >

```

图3C

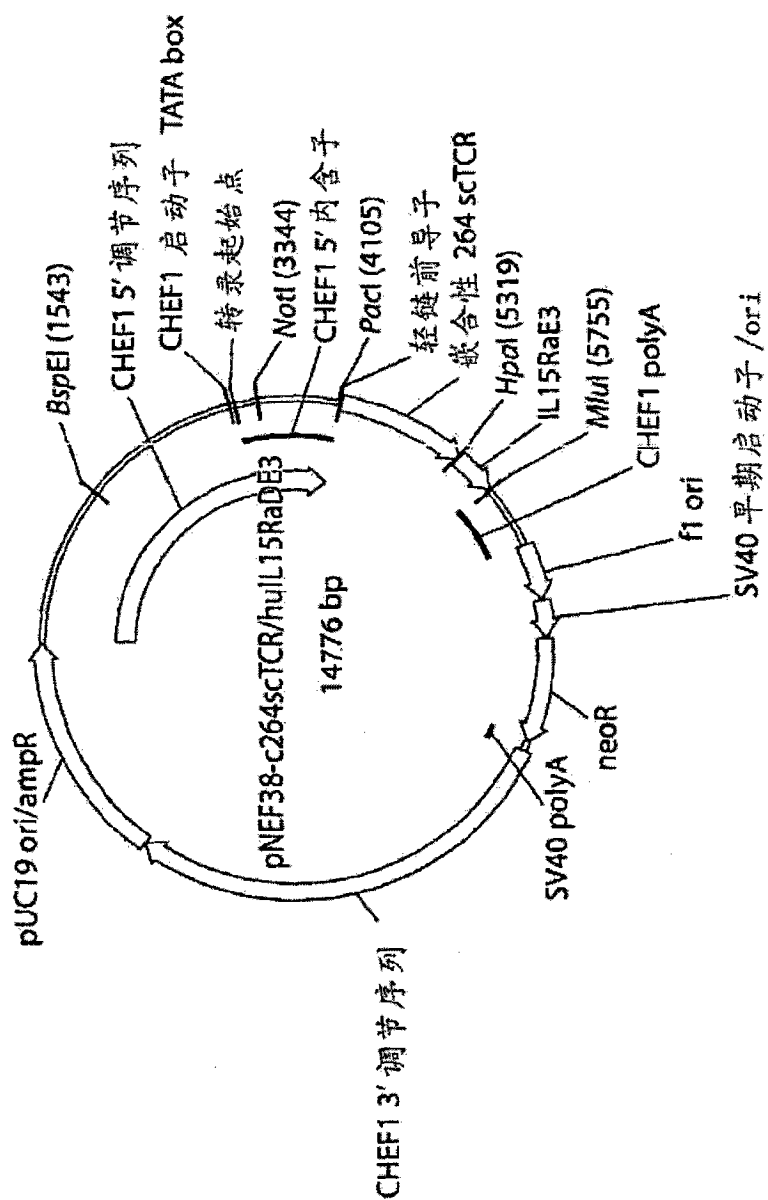


图4A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAGT
 CAGTGACGCCAGCCGATGCTCGGTCACCTGTCTCTGAAGAGGCTCTCTCTGTCAGCTGAGATGCAAGTATTTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGTGATGTCCTAGTACCCGCGGACGGGCTGCAGCTGCTCTCCTCAAG
 TACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCAGGCTGAGTTCAAGCAAGAGTAACTCTTT
 CCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGTGCTGTGTACTTCTGTGTGTTTGTAGCGGAGGA
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGCGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGCGGTGGTCCGGTGGCGCGGTCTGCGGCTGCGGTTCTCGAGCAATTCAAAAGTCA
 TTCAGACTCCAAAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAGCAAAAGCAAGATGAGGTGATCCCTGAAAAGGG
 ACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAATAAGAACAAATGACTTTTAAATTTTGTATTAACTTTTCAGAAAT
 CAAGAAGTTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAATAACGATTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTTT
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACGTGTACCTCTGTGTCAGCAGTCTGTGTGTCAGG
 GGGCGGCACAGAACTTTCTTTGGTAAAGGAACCCAGACTCACAGTCTGTAGAGGACCTGAACACAGGTGTTTC
 CCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCTCCACACCCCAAAAGGCCACACTGGTGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCAAGTGGAGCTGAGCTGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAG
 TGGGGTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAGGAGCAGCCGCTCAATGACTCCAGATACTGCTGAGC
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGTGGCAGAACCCCGGCTCACTCCGCTGCTGTCAGTCCAGTTCT
 ACGGGCTCTCGGAGAAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGA
 GGCCTGGGTTAGAGCAGACGTTAACTACATCACGTGCCCTCCCGCTGTCGGTGAACACGACATCTGG
 GTCAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTATCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCA
 CGTCCAGCCTGACGGAGTGGTGTGAAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAAACCCCAAGTCTCAA
 ATGCATTAGACCCGCGAGCTTCTATCTCCAGCTCAAAACAACACGCGGCCACAAACAGCAGTATTGTCCCG
 GGCTCCAGCTGATGCCCTTCAAAATCACCTTCCACAGGAACCCAGAGATAAGCAGTATGATCTCTCC
 ACGGCACCCCTCTCAGACAAACAGCCNAGAACTGGGAATCTCAGCATCCGCTCCACCCAGCCCGCCAGG
 TGTGTATCCACAGGGCCACAGCGGACACCACTTGATAA-3'

图4B

```

metdtlllwvlllwpgstgqsvtqpdarvtvsegaslqrcrkysgtpylfwyvqprqglqllkyyys
< 讯息肽 >< TCR Vα
gdpvvqgvngfeae fsksnssfhlrkasvhwdsavycvlse dsnyqliwsgtgkllikpdtsgggsggg
TCR Vα >< 接头
ggsgggsgggsgssnskviqtprylvkqggqkakmrncipekghpvfwyqqknnefkflinfqnqevlq
TCR Vβ ><
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqs seagdsalylcasslsgggt evffgkgt rltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhs gvsdtpqplkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnpnrnhfrcqvqfyqlsendewtqdrakpvtqivsaeawgradv nitc pppmsvehadiwvksyslys
TCR Cβ > < IL-15RaDE3
reryicnsgfkrkagtssltec vlnkatnvahwttpslkcirpaasspsnnntaattaaivpgs qlmpsk s
IL-15RaDE3
pstgtteiss heshgtpsqttaknwel tasashqppgvypqghsdt t
IL-15RaDE3 >

```

图4C

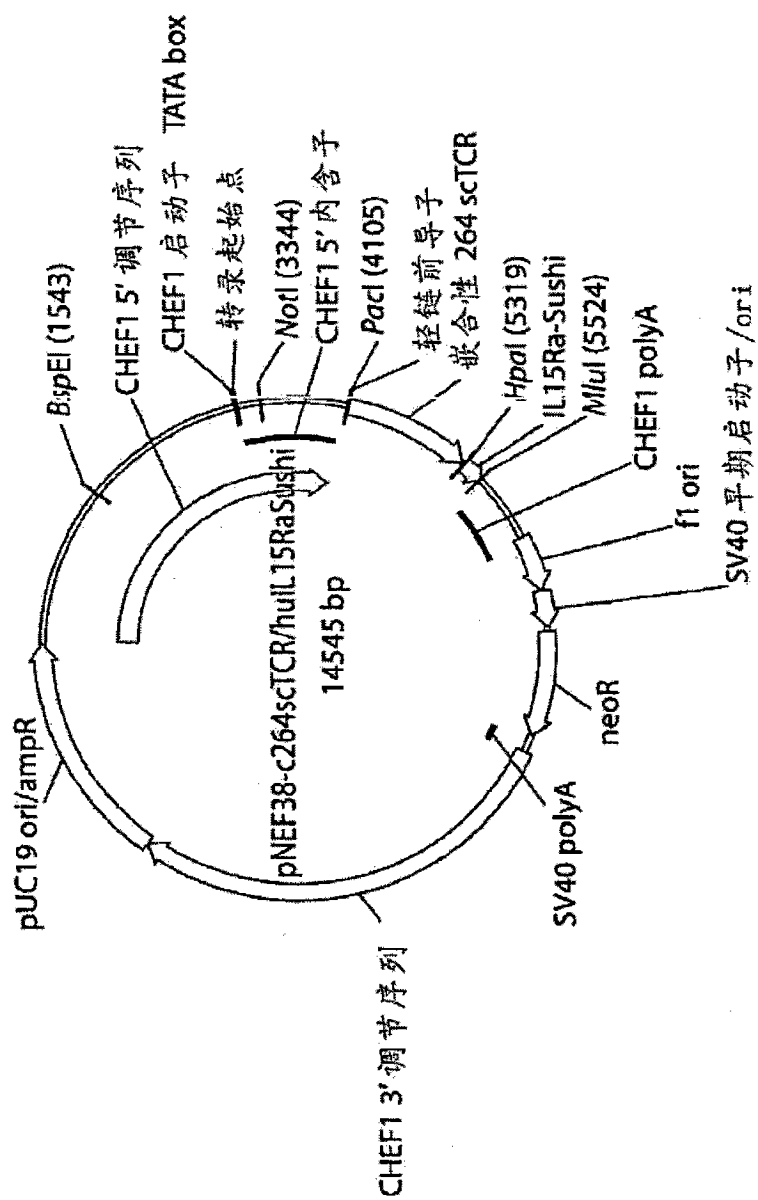


图5A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACATCCTCTGTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACCGGTCACT
 CAGTGACGCAGCCCGATGCTCGGTCACTGCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTCTCTGGTATGTCAGTACCCGGCGAGGGCTGCAGCTGCTCTCAAG
 TACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCARGAGTAACCTCTT
 CCTTCCACCTGGGAAAGCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTGTGAGCGAGGA
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATATAAGCCAGACA CTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGCGGTGGTGGTCCGGTGGCGCGGTCTGGCGGTGGCGGTCTCGAGCAATTCAAAAGTCA
 TTCAGACTCCAAAGATATCTGGGTGAAGGGCAAGGACAAAGCAAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAGGG
 ACATCCAGTTGTATTTCTGGTATCAACAAATATAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGTGATTTACTTTTCAGAAAT
 CAAGAAGTTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAANAACGATTTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGCCAGGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTTCAGG
 GGGCGGCACAGAAAGTTTCTTTGGTAAAGGAACCAAGACTCAGTTGTAGAGGACCTGAAACAAGGTGTTC
 CCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAAGCCATCAGAGCAGAGATCTCCACACCCAAAGGCCACACTGGTGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCCAGTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAG
 TGGGGTCAGCACGGACCCGCAAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGC
 AGCCGCCCTGAGGGTCTCGGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCT
 ACGGGCTCTCGGAGAAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGA
 GGCTGGGGTAGAGCAGACGTAAACATCACGTGCCCTCCCGCCATGTCCGTGGAAACACGCAGACATCTGG
 GTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCA
 CGTCCAGCCTGACGGAGTGGTGTGAACAAGGCCACGAATGTGCGCCCACTGGGACAACCCCGCAGTCTCAA
 ATGCATTAGA-3'

图5B

```

metdtlllwlwllwvpgstgsvtqpdarvtvsegaslqlrckysysgtpylfwyvqyprqqlllkyyys
< 讯息肽 >< TCR Va
gdpvvqgvngfeae fsksnssfhlrkasvhsdsavvfcvlse dsnvqliwsgtgkllikpdtsgggsgg
TCR Va >< 接头
ggsgggsgggssssnskviqtprylvkqggqkakmrcipekghpvfwyqqknnefkflinfqnqevlq
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggterffgkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdppqlkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnpnrnhfrcqvqfygl sendewtqdrakpvtqivsaeawgradv nitc pppmsvehadiwvksyslys
TCR Cβ > < IL-15RaSushi
Reryicnsgfkrkagtssltecvlnkatnvahwttpslkcir
IL-15RaSushi >

```

图5C

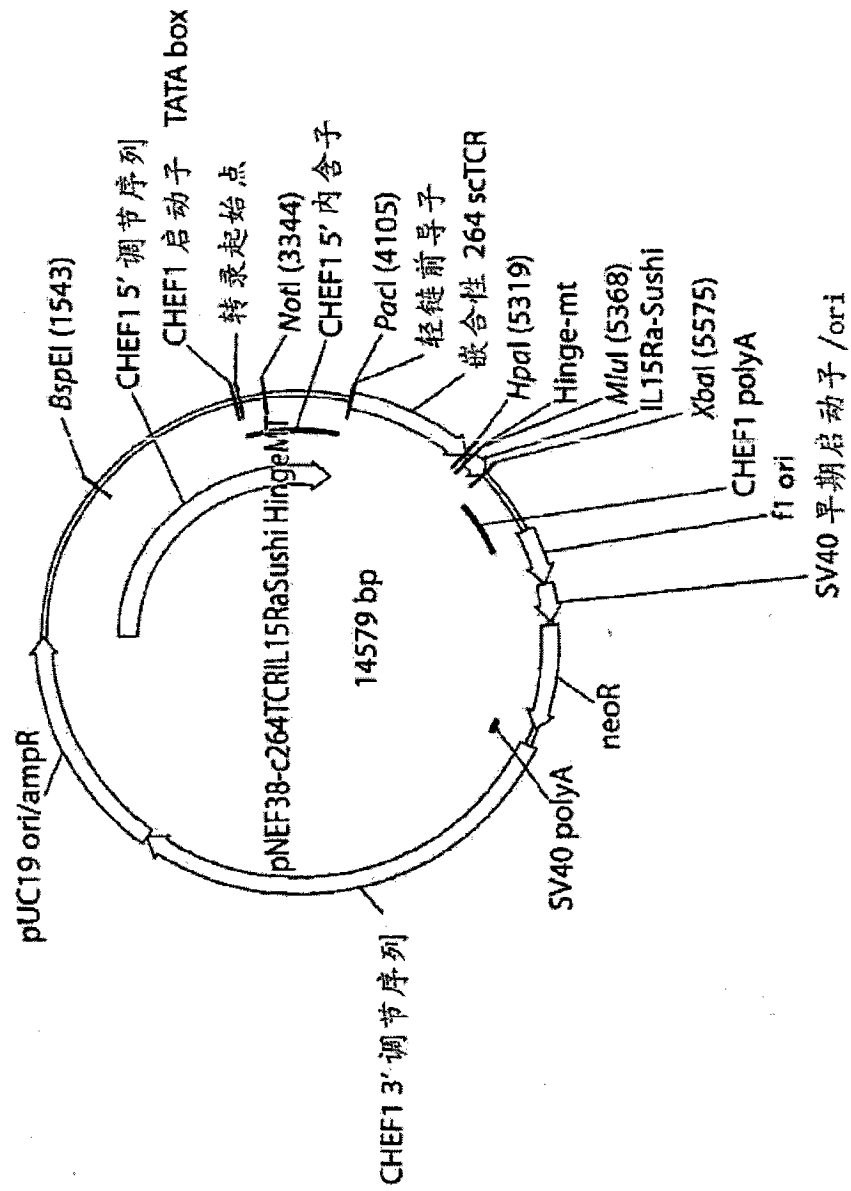


图6A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTATATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAGT
 CAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACCTGCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTCTTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAG
 TACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGATGAAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACCTCTT
 CCTTCCACCTGCGGAAAGCCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTCTGTTTTTGAGCGGAGGA
 TAGCAACTATCATGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGGCGGTGGTTCGGTGGCGGCTCTGGCGGTTCGCGGTTCCTCGAGCAATTCAAAAGTCA
 TTCAGACTCCAAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG
 ACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAATAAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGTATTAATTTTCAGAAAT
 CAAGAGTTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAATAACGATTCCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 GCAGCCTAGAAATTTCAGTCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGTGCCAGCAGTCTGTGCAGG
 GGGCGGCACAGAGTTTCTTTTGGTAAAGGAACCAAGACTCAGCTCAGTTGTAGAGGACCTGMAACAAGGTGTTC
 CCACCCGAGGTGCTGTGTGTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCCAAAGGCCACACTGGTGT
 GCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCCACCTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGAAAGGAGGTGCACAG
 TGGGGTCAGCACGGACCCGAGCCCTCAGGAGCAGCCCGCTCAATGACTCCAGATATCTGCCCTGAGC
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGCAACCACTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCT
 ACGGGCTCTCGGAGAAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCAACCCAGATCTGTACGCGCGA
 GGCTGGGGTAGAGCAGCTTAAAGAGCCCAATCTTCTGACAAACCTCACACATCTCCACCGTCTTCCA
 ACGCGTATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCCGTGAACACGCGAGCATCTGGTCAAGAGCTACAGCTTGT
 ACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGTGTTTCAAGCGTTAAGCCGGCAGCTCCAGCTGACGGAGTG
 CGTGTGTAACAAGGCCACGAATGTCCGCCACTGGACAAACCCAGTCTCAAAATGCATTAGATGATAA - 3'

图6B

```

metdtlllwlwllwpgstgqsvtqpdarvtvsegaslrcrkysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyys
< 讯息肽 >< TCR Va
gdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlseedsnyqliwsgtkllikpdtsgggsgg
TCR Va >< 接头
ggsgggsgggssssskviqtprylvkgggkakmrceipekghpvvfwyqgnknefkflinfqnqevlq
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfqkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdpqplkeqpaldnsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwgnprnhfrcgvqfyglsendewtqdrakpvtqlvsaeawgradvnepkssdkthtsppsptritcPPP
TCR Cβ >< 接头 ><
msvehadiwksyslysryicnsgfkrkagtsstecvlnkatnvahwtptslkcir
IL-15RaSushi >

```

图6C

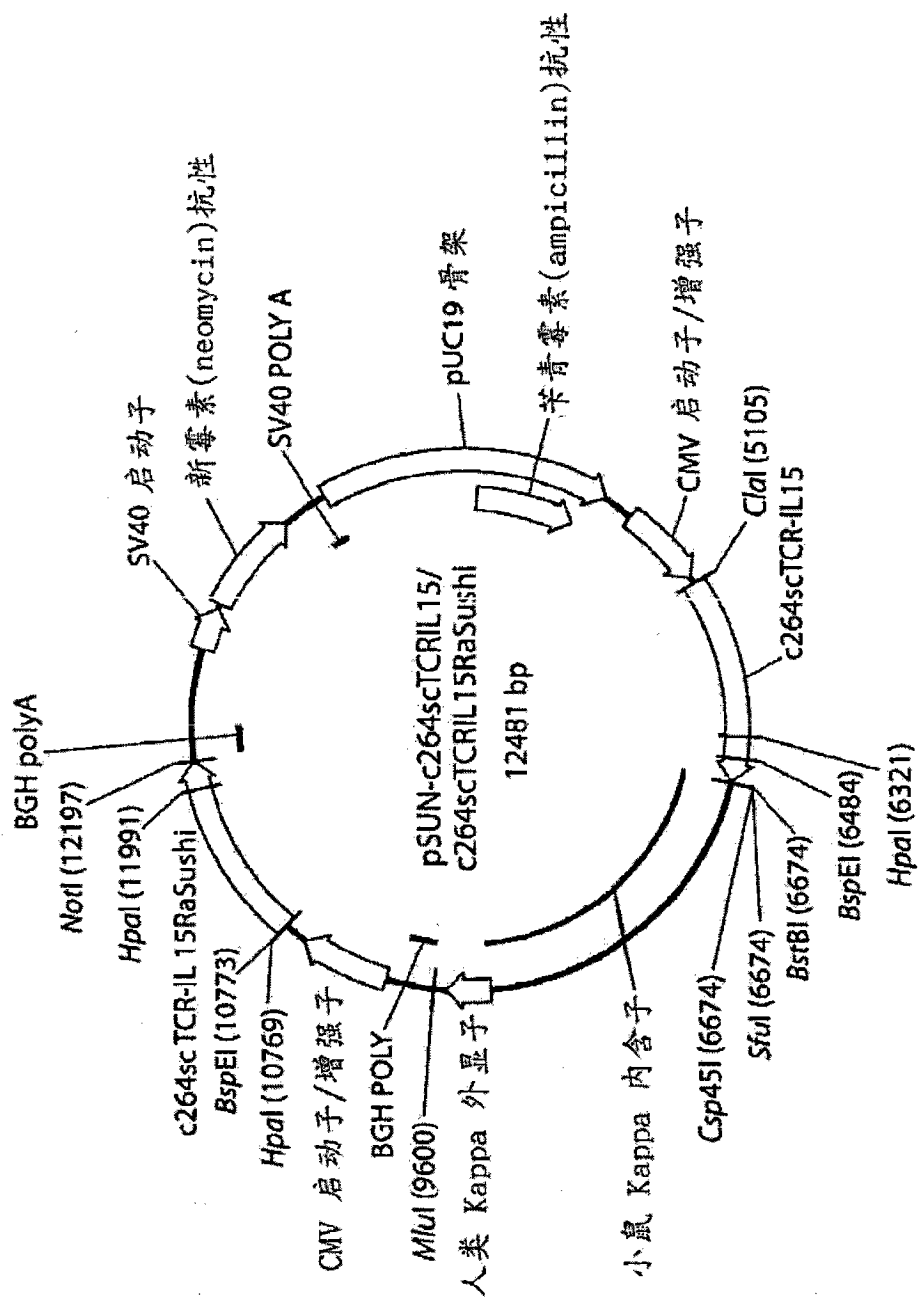


图7

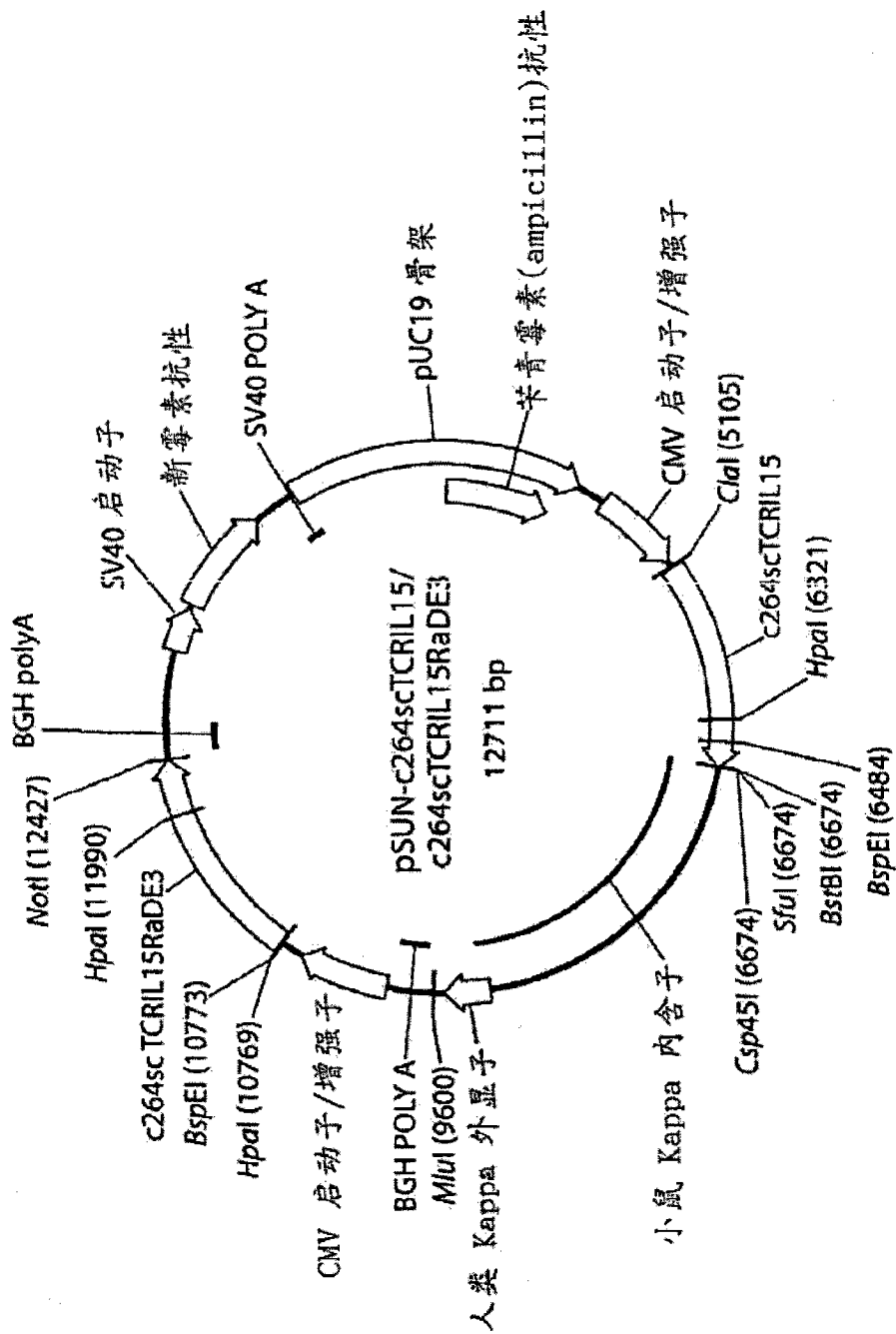


图8

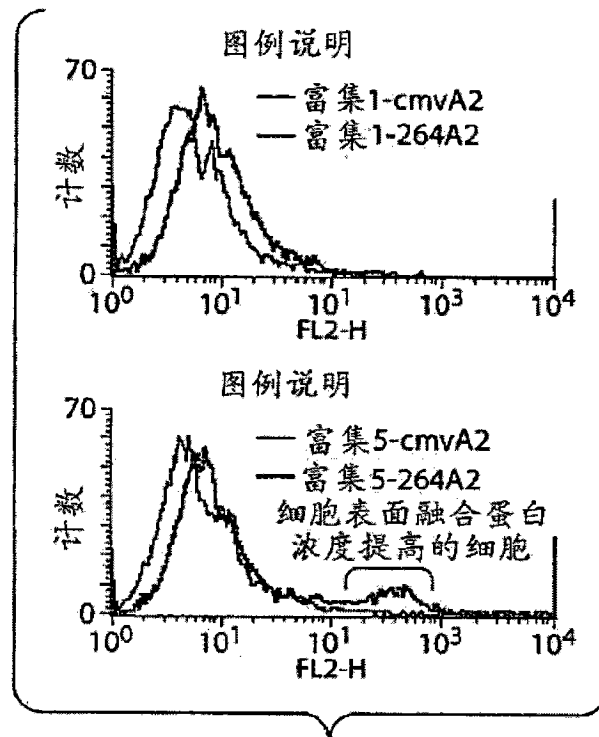


图9A

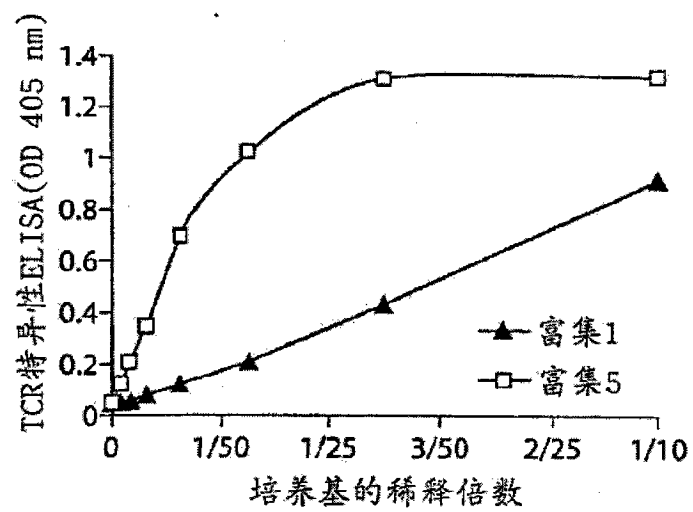


图9B

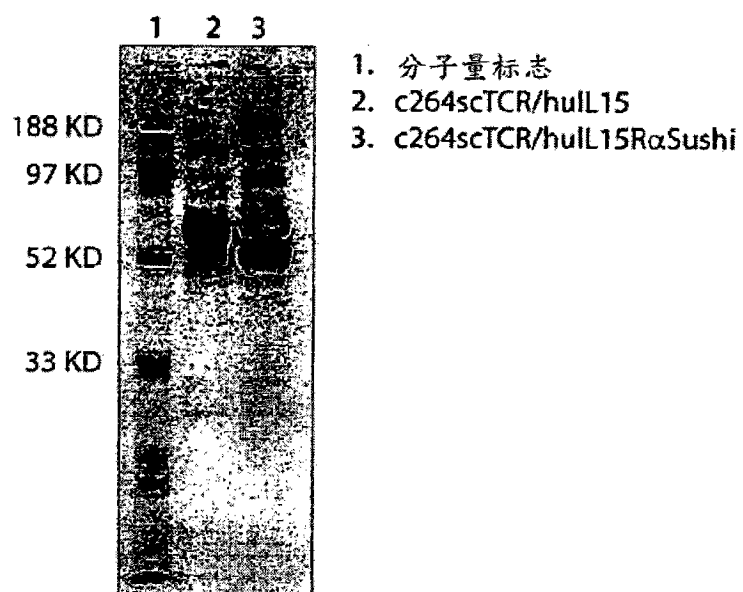


图10A

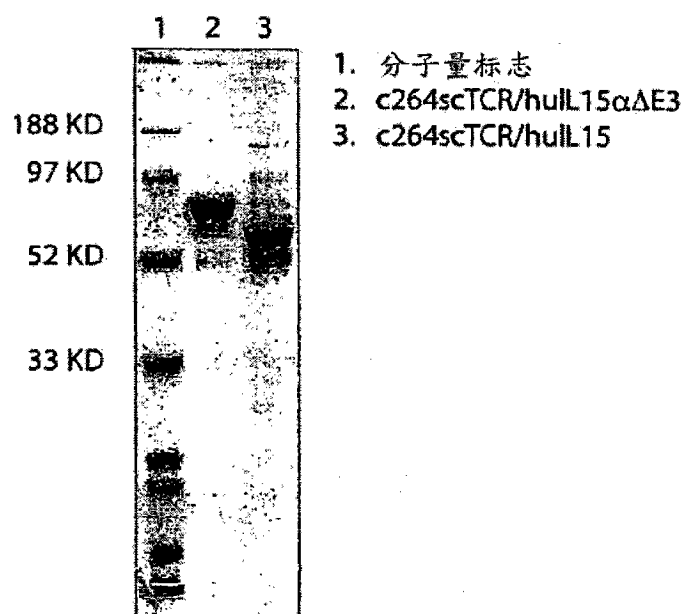


图10B

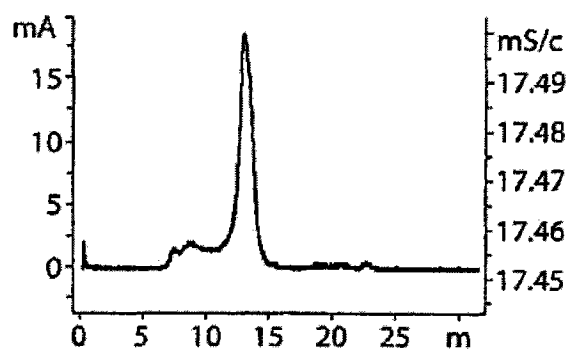


图11A

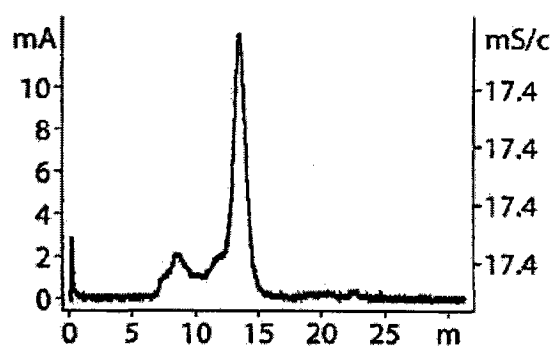


图11B

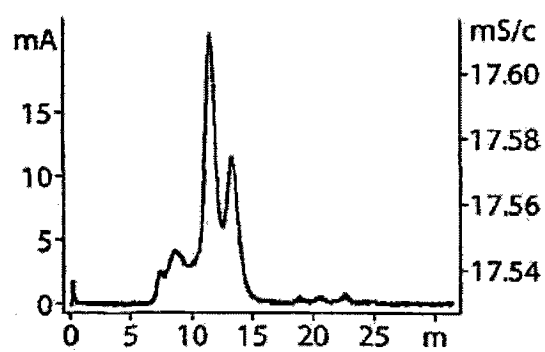


图11C

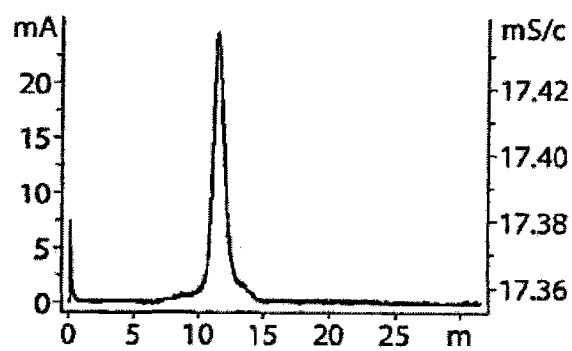


图12A

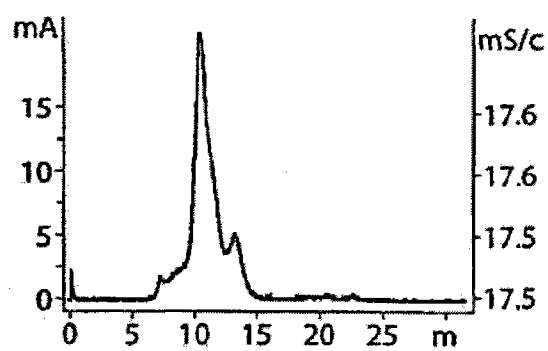


图12B

图例说明

- 经c264scTCR/IL15染色的对照组(无肽)T2
- 经c264scTCR/IL15染色的载入p53肽的T2
- 经c264scTCR/IL15+c264sTCR/IL15 α Sushi染色的对照组(无肽)T2
- 经c264scTCR/IL15+c264scTCR/IL15 α Sushi染色的载入p53肽的T2
- 经c264scTCR/IL15 α Sushi染色的对照组(无肽)T2
- 经c264scTCR/IL15 α Sushi染色的载入p53肽的T2

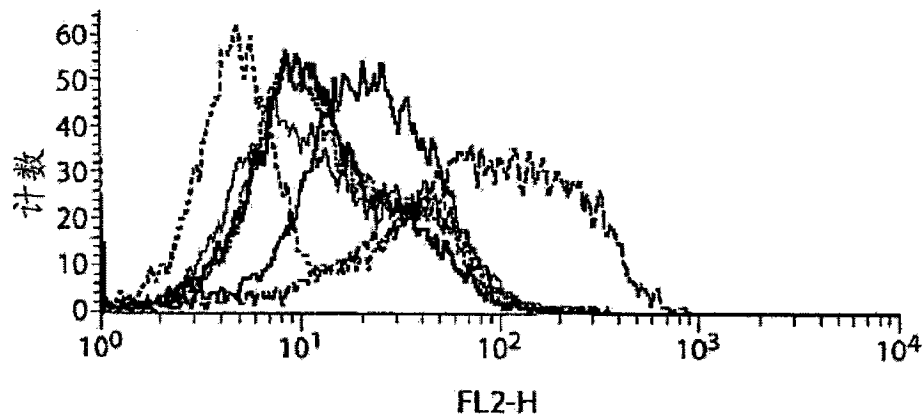


图13

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLEQVISLES GDASI
HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

图14A

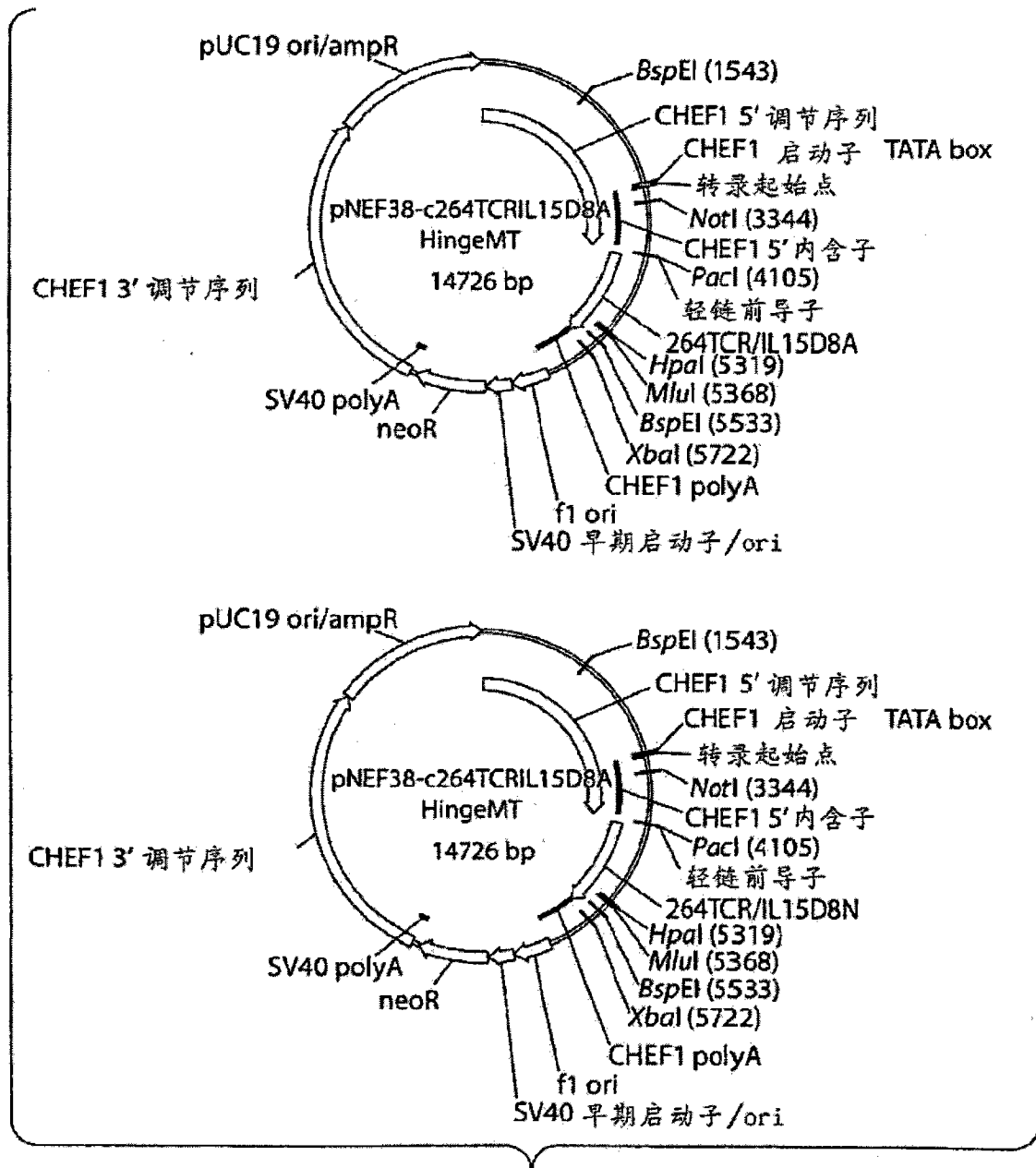


图14B

c264scTCR-hmt-IL15D8A 基因

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTA CTGCTGCTCTGGGTTC
CAGGTTCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC
TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
AGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA
GTTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGG
CGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGCGGTCTGGCGGTGGCGGT
TCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC
AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
ATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTGGATTAACTTT
CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG
CTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTTGACGCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGC
AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTGAGGGGGCGGCACA
GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA
AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTC
CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA
GCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA
CTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGC
AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG
GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT
CCACCGTCTCCAACGCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTGCTTTGAAAAAAA
TTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG
TGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAG
TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAA
TTTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT
AA -3'

图14C-1

c264scTCR-hmt-IL15D8N 基因

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTC
CAGGTTCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC
TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
AGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGGCTGA
GTTTCAGCAAGAGTAACCTCTTCCTTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGG
CGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGCGGTCTGGCGGTGGCGGT
TCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTTCAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC
AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
ATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTGATTAACCTT
CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG
CTGAGTGTCTTCAAACTCACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCCTCTGAGGC
AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTCAGGGGGCGGCACA
GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA
AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTC
CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA
GCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA
CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGC
AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG
GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT
CCACCGTCTCCAACGCGTAAGTGGGTGAATGTAATAAGTAAATTTGAAAAAA
TTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG
TGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAG
TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAA
TTTTTGACAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT
AA -3'

图14C-2

c264scTCR-hmt-IL15D8A 蛋白

```

metdtllllwlllwpgstggsvtqpdarvtvsegaslqrlckysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyys
< 讯息肽 >< TCR Vα
gdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlseedsnyqliwsgtqliikpdtsgggsgg
TCR Vα >< 接头
ggsgggsgggsgssnskvigtprylvkqggqkakmrcipekghpvvfwyggknnefkflnfqngvlg
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnpsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevshgsvtdppplkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqnpnrnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqiysaeawgradvnepkssdkthtspsptrnwvni
TCR Cβ >< 接头 > <
sAlkkiedliqsmhidatlytesdvhpscckvtamkcfllelqlvislesgdasihdtvenliilannslsn
* IL-15 D8A
gnvtesgckeceeleeknikeflqsfvhiqvfmfints
IL-15 D8A >

```

图14D-1

c264scTCR-hmt-IL15D8N 蛋白

```

metdtllllwvlllwpgstgqsvtqpdarvtvsegaslrcrkysgtptylfwyvqyprqglqlllkyys
< 讯息肽 >< TCR Vα
gdpvvgvngfeafsksnssfhlrkasvhwsdsavycvlsedsnyqliwsgtgkllikpdtsgggsgg
TCR Vα >< 接头
ggsgggsgggsgssnskviqtprylvkqggqkakmrcipekghpvvfwyqqknnefkflinfqnqevlq
接头 >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevshgsvtdpgplkegpalndsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwgnprnhfrcgvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradvnepkssdkthtspptnwnvni
TCR Cβ > < 接头 > <
sNlkkiedliqsmhidatlytesdvhpscckvtamkcflllelqvlesgdasihtvenliilannslsn
* IL-15 D8N
gnvtesgckeceeleeknikeflqsfvhiqmfints
IL-15 D8N >

```

图14D-2

图例说明

- 仅经p53肽/HLA-A2试剂染色的CTLL2
- 经c264scTCR/huIL15+p53肽/HLA-A2染色的CTLL2
- 经 c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15 α Sushi +p53 肽/HLA-A2染色的CTLL2
- 经c264scTCR/huIL15 α Sushi+p53肽/HLA-A2染色的CTLL2

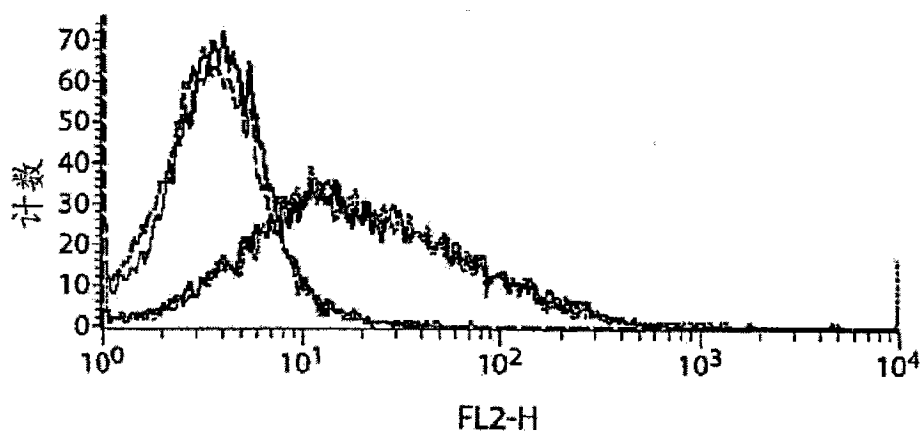


图15

IL15活性的CTLL-2细胞增生分析

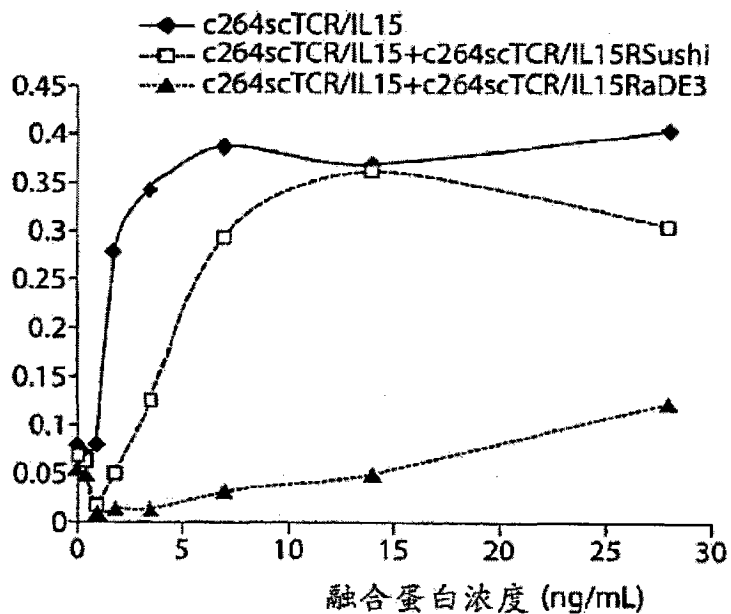


图16

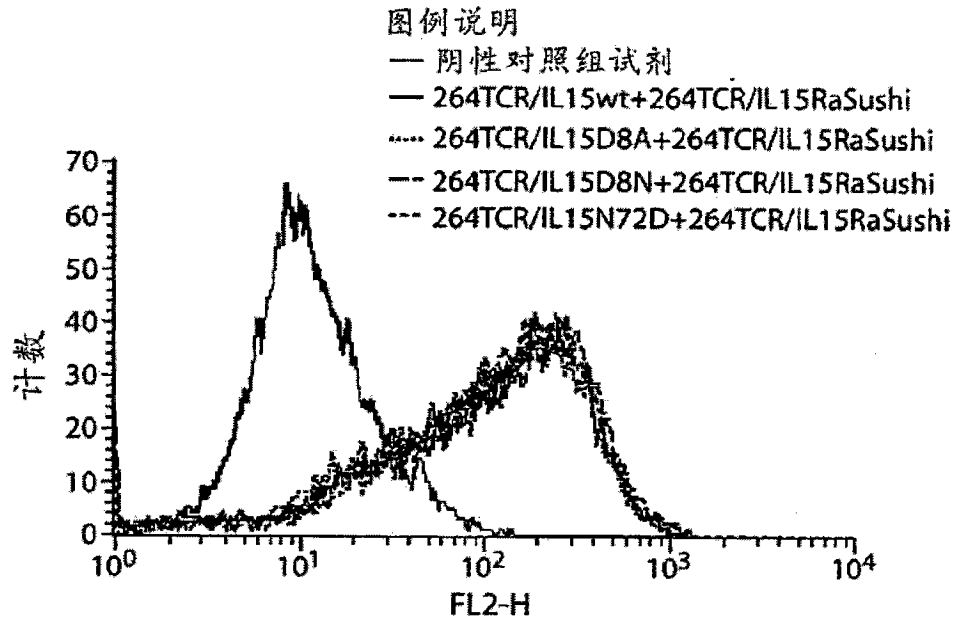


图17A

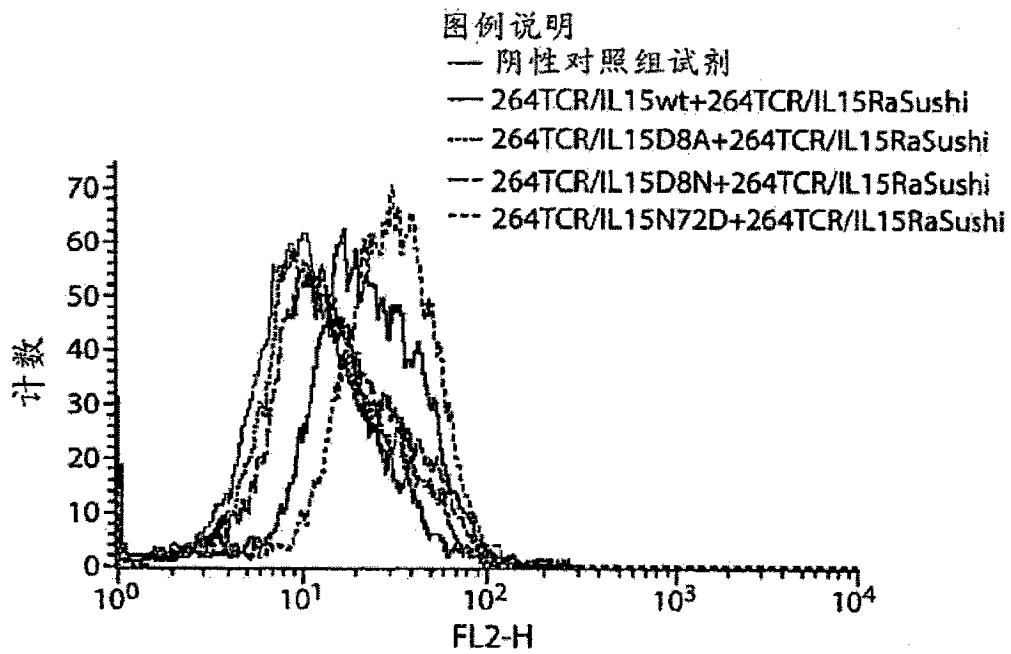


图17B

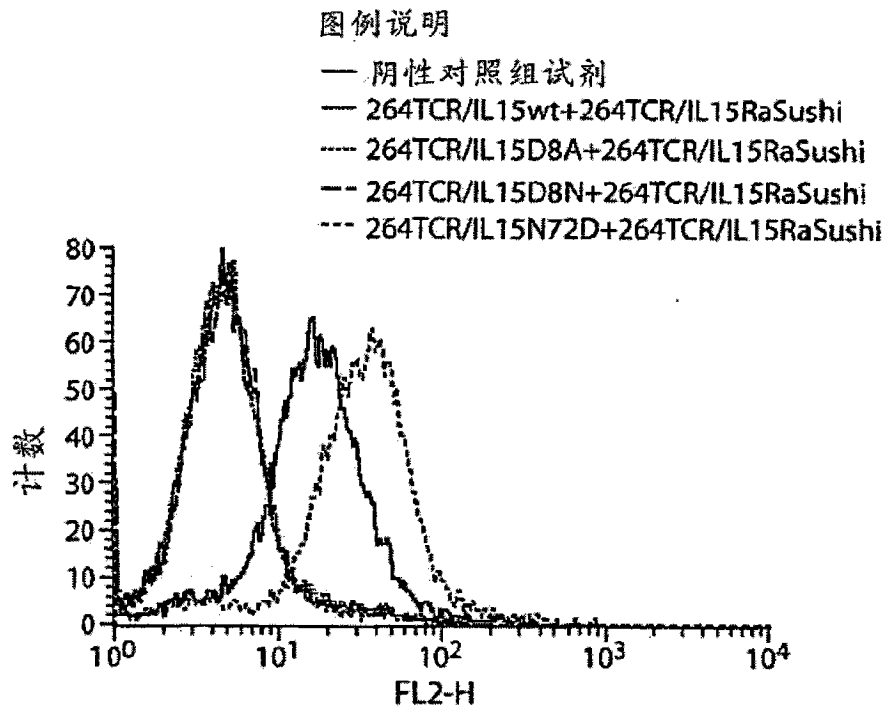


图17C

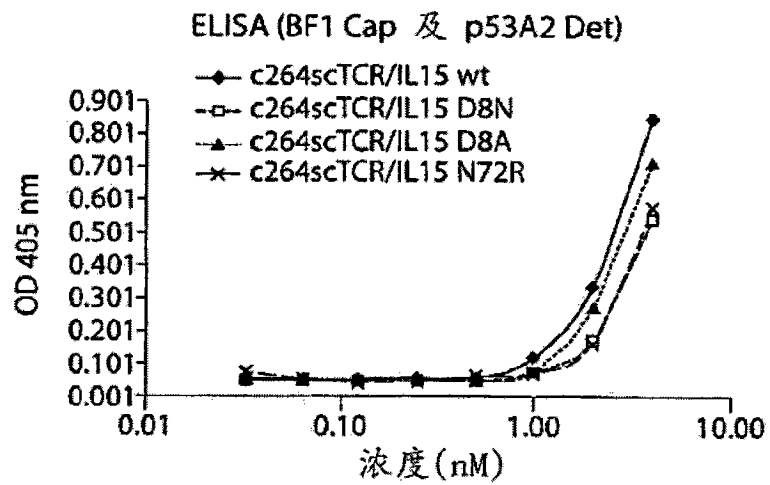


图18A

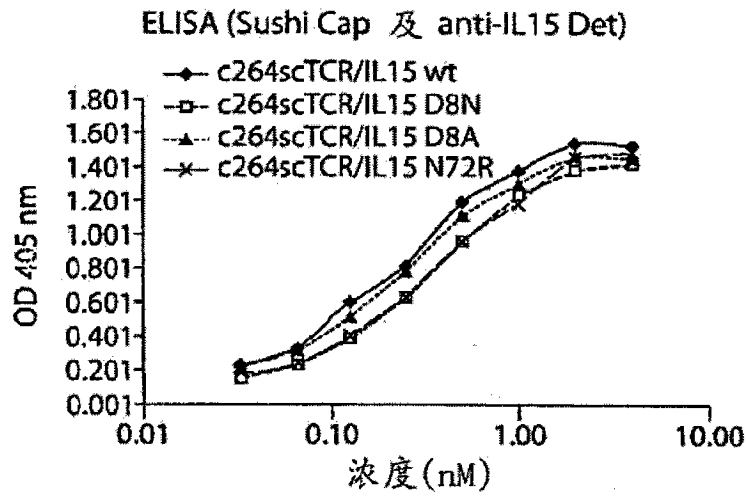


图18B

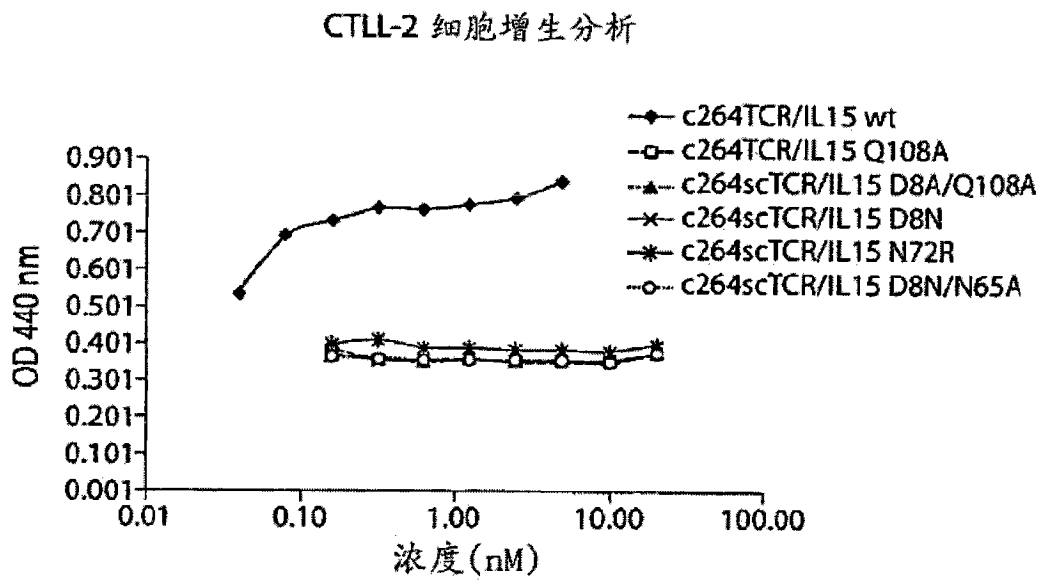


图19A

32Db 细胞增生分析

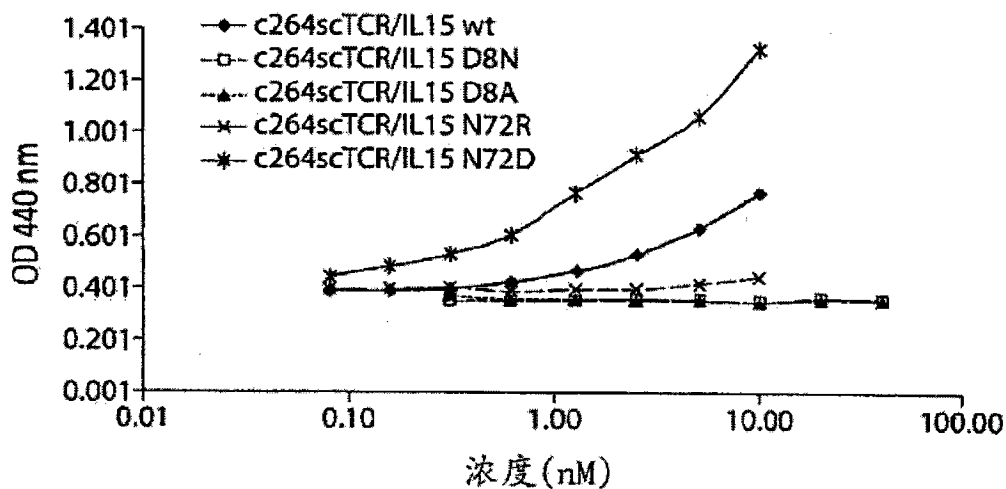


图19B

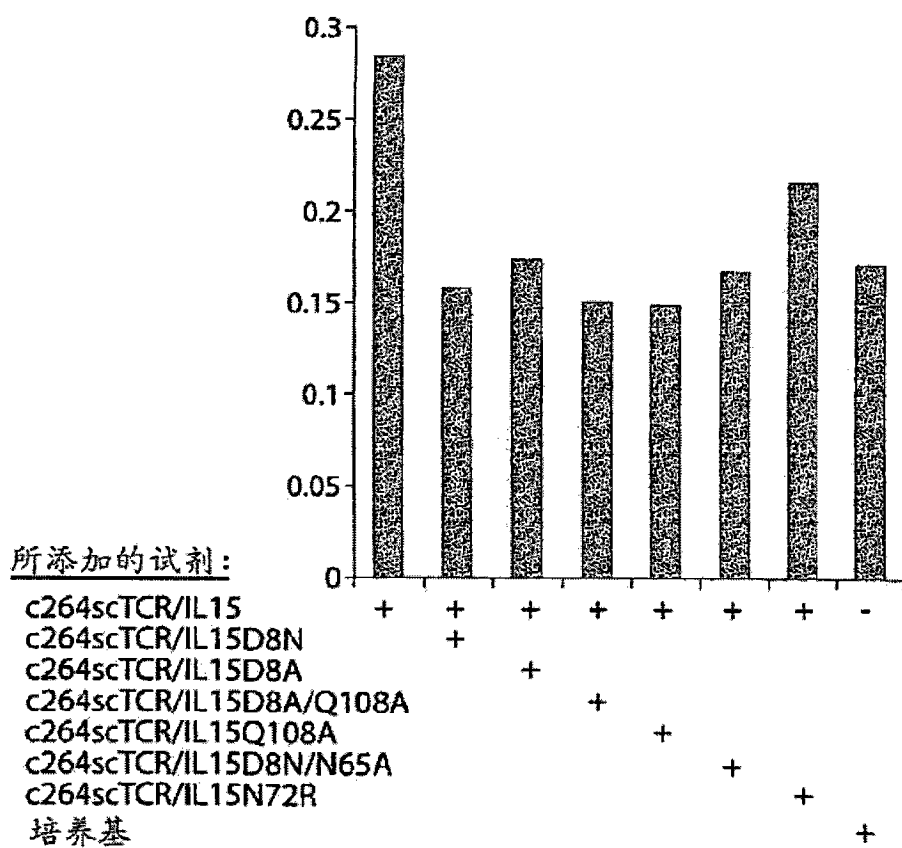


图19C

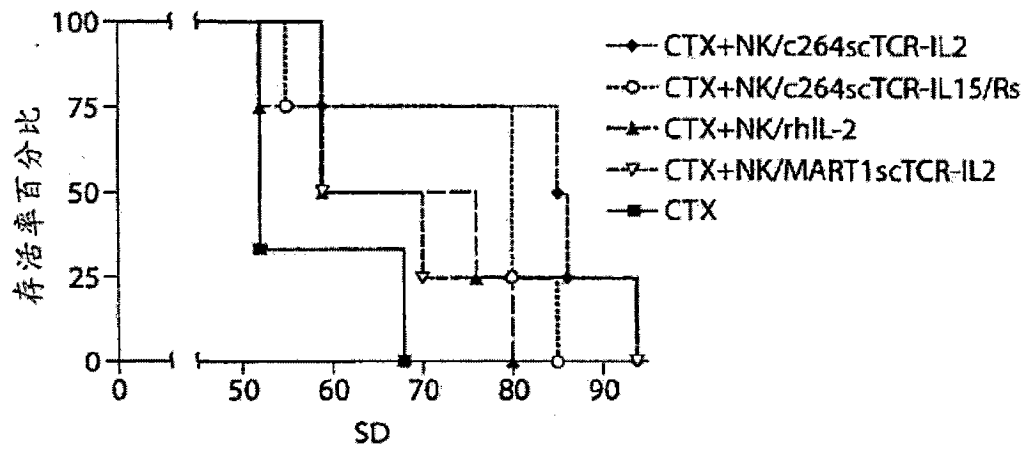


图20

表1

突变体	位置	8	61	65	72	108	IL15R β yc 受体结合性	IL15R α 结合性	增生活性
	野生型氨基酸	D	D	N	N	Q	+	+	+
1	8	N					-	+	-
2	8	A					-	+	-
3	61		A				-	+	-
4	65			D			-	+	-
5	65			A			-	+	-
6	72				D		3+	+	3+
8	72				R		-	+	-
9	108					A	-	+	-
10	8+65	N		A			-	+	-
11	8+108	A				A	-	+	-
12	8+65	S		R			-	+	-

图21

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

图22A

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAT
ATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATG
AAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCAT
GATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTA
ACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTG
CAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA

图22B