



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107001438 A

(43)申请公布日 2017. 08. 01

(21)申请号 201580060954.4

(22)申请日 2015.10.12

(30)优先权数据

62/063,784 2014.10.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/055156 2015.10.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/060996 EN 2016.04.21

(71)申请人 阿尔莫生物科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·麦考利

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理

有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹏

(51)Int.Cl.

C07K 14/54(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

C12N 15/24(2006.01)

A61K 47/60(2017.01)

A61K 38/20(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

A61P 17/06(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

权利要求书6页 说明书51页

序列表13页 附图7页

(54)发明名称

白细胞介素-15组合物及其用途

(57)摘要

描述了白细胞介素-15突变蛋白和其它白细胞介素-15相关分子,以及鉴定白细胞介素-15突变蛋白和其它白细胞介素-15相关分子的方法。本文中还描述了前述物质的修饰,所述修饰可以增强所述突变蛋白或其它分子与人白细胞介素-15相比的特性(例如半衰期)。本文中还描述了药物组合物和使用方法。

SEQ ID NO.1.....

NWVNVISLKEEDLQSMRBDAYTESDVFPSKVYAMQCTLLIQVSLSGDASRDYVEN
LRANNSLSRRNVTHSGCKEELKEENKEPLQSFVHVCQMPNTS

1. 一种肽,其包含:

a) 螺旋A、b) A/B螺旋间接合、c) 螺旋B、d) B/C螺旋间接合、e) 螺旋C、f) C/D螺旋间接合和g) 螺旋D;并且其中所述肽进一步包含对a) -g) 中一项或多项的至少一个氨基酸取代、添加或缺失。

2. 根据权利要求1所述的肽,其包含:

a) 螺旋A、b) A/B螺旋间接合、c) 螺旋B、d) B/C螺旋间接合、e) 螺旋C、f) C/D螺旋间接合和g) 螺旋D;并且其中所述肽进一步包含至少一个氨基酸取代,所述取代包括:

除了氨基酸残基2 (W)、4-12 (NVISDLKKI; SEQ ID NO:37) 或16 (I) 外的螺旋A的至少一个氨基酸残基的取代;或

除了氨基酸残基30 (D) 或31 (V) 外的所述A/B螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或

除了氨基酸残基32 (H)、35 (C)、40 (M)、42-44 (CFL)、47 (L) 或50 (I) 外的螺旋B的至少一个氨基酸残基的取代;或

所述B/C螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或

除了氨基酸残基59 (I)、61-66 (DTVENL; SEQ ID NO:38) 或68-70 (ILA) 外的螺旋C的至少一个氨基酸残基的取代;或

除了氨基酸残基85 (C) 或88 (C) 外的所述C/D螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或

除了氨基酸残基99 (F)、100 (L)、103 (F) 或105-112 (HIVQMFIN; SEQ ID NO:39) 外的螺旋D的至少一个氨基酸残基的取代。

3. 根据权利要求2所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代是保守取代。

4. 根据权利要求2所述的肽,其中所述肽具有至少等于SEQ ID NO:3的生物活性的生物活性,其中在体外测定法或体内测定法中测定所述生物活性。

5. 根据权利要求4所述的肽,其中在选自以下组成的组的体外测定法中测定所述生物活性:TNF α 产生测定法、CTL-2细胞增殖测定法、M07e细胞增殖测定法或T细胞IFN γ 分泌测定法。

6. 根据权利要求2所述的肽,其中至少一个氨基酸取代不会不利地影响免疫原性。

7. 根据权利要求6所述的肽,其中通过筛选T细胞表位或B细胞表位中的至少一种预测所述肽的免疫原性。

8. 根据权利要求7所述的肽,其中所述筛选是计算机筛选系统或离体测定系统中的至少一种。

9. 根据权利要求2所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代在以下区域中的至少一个中:13-15、17-29、36-39、51-58、71-84或89-98。

10. 根据权利要求2所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代在以下区域中的至少一个中:17-28、36-38、51-57、71-84或89-98。

11. 根据权利要求2所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代至少在以下位置之一:1、3、13-15、17-29、33、34、36-39、41、45、46、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。

12. 根据权利要求2所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代至少在以下位置之一:1、

17-28、36-38、41、45、46、48、49、51-57、60、67、71-84、86、87、89-98、101、113或114。

13. 根据权利要求2所述的肽,其中所述肽不包含参与受体结合的氨基酸残基的取代。

14. 根据权利要求2所述的肽,其中所述肽包含至少一个修饰以形成经修饰的肽;

其中所述修饰不改变所述肽的氨基酸序列,并且

其中所述修饰改善所述肽的至少一种性质。

15. 根据权利要求14所述的肽,其中所述经修饰的肽是聚乙二醇化的。

16. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽包含共价连接到所述肽的N-末端的至少一个PEG分子。

17. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽的PEG组分具有5kDa至50kDa的分子量。

18. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽的PEG组分具有20kDa至40kDa的分子量。

19. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽的PEG组分具有大于20kDa的分子量。

20. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽的PEG组分具有至少30kD的分子量。

21. 根据权利要求15所述的肽,其中所述经修饰的肽的PEG组分具有至少40kD的分子量。

22. 根据权利要求14所述的肽,其中所述经修饰的肽是糖基化的。

23. 根据权利要求14所述的肽,其中所述经修饰的肽包含Fc融合分子。

24. 根据权利要求14所述的肽,其中所述经修饰的肽包含血清白蛋白。

25. 根据权利要求14所述的肽,其中所述修饰是位点特异性的。

26. 根据权利要求14所述的肽,其中所述修饰包含接头。

27. 根据权利要求14所述的肽,其中所述修饰改善所述肽的至少一种物理性质。

28. 根据权利要求27所述的肽,其中所述物理性质选自以下组成的组:溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间。

29. 根据权利要求14所述的肽,其中所述经修饰的肽具有至少与成熟人IL-15的活性相当的活性。

30. 根据权利要求2所述的肽,其中所述肽是重组产生的。

31. 一种包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的肽,其中所述肽包含表面暴露的氨基酸残基的至少一个氨基酸取代;

并且其中所述取代具有至少一种以下效果:(a)改善所述肽的至少一种物理性质,(b)不会不利地影响所述肽的免疫原性,或(c)不会不利地影响所述肽的生物活性。

32. 根据权利要求31所述的肽,其中所述肽不包含参与受体结合的氨基酸残基的取代。

33. 根据权利要求31所述的肽,其中所述取代不会破坏所述肽的分子内二硫键。

34. 根据权利要求31所述的肽,其中所述至少一个氨基酸取代是保守取代。

35. 根据权利要求31所述的肽,其中至少一个氨基酸取代不是氨基酸残基35、42、85和88中的一个或多个的取代。

36. 一种包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列的至少90%序列同一性的肽,其中所述肽具

有至少一种以下特征：(a) 不是比SEQ ID NO:3的肽更具免疫原性的，(b) 具有至少等于SEQ ID NO:3的肽的生物活性的生物活性，(c) 具有SEQ ID NO:3的肽的至少一种物理性质的改善。

37. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少95%氨基酸序列同一性。
38. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少97%氨基酸序列同一性。
39. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少98%氨基酸序列同一性。
40. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少99%氨基酸序列同一性。
41. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少90个氨基酸残基。
42. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少100个氨基酸残基。
43. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少105个氨基酸残基。
44. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽具有至少110个氨基酸残基。
45. 根据权利要求36所述的肽，其中所述肽包含相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的至少一个氨基酸取代、缺失或添加。
46. 根据权利要求45所述的肽，其中所述肽不包含参与受体结合的氨基酸残基的取代。
47. 根据权利要求45所述的肽，其中所述肽包含表面暴露的氨基酸残基的至少一个氨基酸取代。
48. 根据权利要求45所述的肽，其中所述至少一个添加、缺失或取代不破坏所述肽的分子内二硫键。
49. 根据权利要求45所述的肽，其中所述至少一个氨基酸取代是保守取代。
50. 根据权利要求45所述的肽，其中所述至少一个氨基酸取代不是氨基酸残基35、42、85和88中的一个或多个的取代。
51. 根据权利要求31或36所述的肽，其中所述物理性质选自由以下组成的组：溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间。
52. 根据权利要求31或36所述的肽，其中所述肽具有至少等于SEQ ID NO:3的生物活性的生物活性，其中在体外测定法或体内测定法中测定所述生物活性。
53. 根据权利要求52所述的肽，其中所述体外活性是下列至少一种：TNF α 产生测定法、CTLL-2细胞增殖测定法、M07e细胞增殖测定法或T细胞IFN γ 分泌测定法。
54. 根据权利要求31或36所述的肽，其中通过筛选T细胞表位或B细胞表位中的至少一种预测所述肽的免疫原性。
55. 根据权利要求54所述的肽，其中所述筛选是计算机筛选系统或离体测定系统中的至少一种。
56. 根据权利要求31或36所述的肽，其中所述肽包含至少一个修饰以形成经修饰的肽；其中所述修饰不改变所述经修饰的肽的氨基酸序列，并且其中所述经修饰的肽具有至少与成熟人IL-15的活性相当的活性。
57. 根据权利要求56所述的肽，其中所述经修饰的肽是聚乙二醇化的。
58. 根据权利要求57所述的肽，其中所述经修饰的肽包含共价连接到所述肽的N-末端的至少一个PEG分子。
59. 根据权利要求57所述的肽，其中所述经修饰的肽的PEG组分具有5kDa至50kDa的分子量。

60. 根据权利要求57所述的肽, 其中所述经修饰的肽的PEG组分具有20kDa至40kDa的分子量。

61. 根据权利要求57所述的肽, 其中所述经修饰的肽的PEG组分具有大于20kDa的分子量。

62. 根据权利要求57所述的肽, 其中所述经修饰的肽的PEG组分具有至少30kD的分子量。

63. 根据权利要求57所述的肽, 其中所述经修饰的肽的PEG组分具有至少40kD的分子量。

64. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述经修饰的肽是糖基化的。

65. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述经修饰的肽包含Fc融合分子。

66. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述经修饰的肽包含血清白蛋白。

67. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述修饰是位点特异性的。

68. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述修饰包含接头。

69. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述修饰改善所述肽的至少一种物理性质。

70. 根据权利要求69所述的肽, 其中所述物理性质选自以下组成的组: 溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间。

71. 根据权利要求56所述的肽, 其中所述经修饰的肽具有至少与成熟人IL-15的活性相当的活性。

72. 根据权利要求2所述的肽, 其中所述肽是重组产生的。

73. 根据权利要求31或36所述的肽, 其中所述肽是重组产生的。

74. 一种核酸分子, 其编码根据权利要求1、2、31或36所述的肽。

75. 根据权利要求74所述的核酸分子, 其中所述核酸分子可操作地连接于表达控制元件, 所述表达控制元件赋予编码所述肽的核酸分子在体外、在细胞中或在体内的表达。

76. 一种载体, 其包含根据权利要求75所述的核酸分子。

77. 根据权利要求76所述的载体, 其中所述载体包含病毒载体。

78. 一种经转化的细胞或宿主细胞, 所述细胞表达根据权利要求1、2、31或36所述的肽。

79. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1、2、31或36所述的肽, 以及药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

80. 根据权利要求79所述的药物组合物, 其中所述赋形剂是等渗注射溶液。

81. 根据权利要求79所述的药物组合物, 其中所述药物组合物适合于人施用。

82. 根据权利要求79所述的药物组合物, 其还包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

83. 一种无菌容器, 其包含根据权利要求79所述的药物组合物。

84. 根据权利要求83所述的无菌容器, 其中所述无菌容器是注射器。

85. 一种试剂盒, 其包含根据权利要求84所述的无菌容器。

86. 根据权利要求86所述的试剂盒, 其还包含第二无菌容器, 所述第二无菌容器包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

87. 一种抗体, 其特异性结合根据权利要求1、2、31或36所述的肽。

88. 根据权利要求87所述的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

89. 根据权利要求87所述的抗体, 其中所述抗体包含存在于不同多肽中的轻链可变区

和重链可变区。

90. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体包含存在于单个多肽中的轻链可变区和重链可变区。

91. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,并且其中所述重链恒定区是同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。

92. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体是可检测标记的。

93. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'。

94. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体是人抗体。

95. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体以约 10^7M^{-1} 至约 10^{12}M^{-1} 的亲和力结合所述肽。

96. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体包含选自脂质部分、脂肪酸部分、多糖部分和碳水化合物部分的共价连接的部分。

97. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体包含亲和结构域。

98. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体固定在固体支持物上。

99. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

100. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体是单链Fv(scFv)抗体。

101. 根据权利要求100所述的抗体,其中所述scFv是多聚化的。

102. 根据权利要求87所述的抗体,其中所述抗体包含共价连接的非肽聚合物。

103. 根据权利要求102所述的抗体,其中所述聚合物是聚(乙二醇)聚合物。

104. 一种药物组合物,其包含根据权利要求87所述的抗体和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

105. 根据权利要求104所述的药物组合物,其中赋形剂是等渗注射溶液。

106. 根据权利要求104所述的药物组合物,其中所述药物组合物适合于人施用。

107. 根据权利要求104所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

108. 一种无菌容器,其包含根据权利要求104所述的药物组合物。

109. 根据权利要求108所述的无菌容器,其中所述无菌容器是注射器。

110. 一种试剂盒,其包含根据权利要求109所述的无菌容器。

111. 根据权利要求110所述的试剂盒,其还包含含有第二治疗剂的第二无菌容器。

112. 一种治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求2、31或36所述的肽。

113. 根据权利要求112所述的方法,其中所述疾病、病症或病况是增殖性病症。

114. 根据权利要求113所述的方法,其中增殖性病症是癌症。

115. 根据权利要求114所述的方法,其中所述癌症是实体瘤或血液病症。

116. 根据权利要求112所述的方法,其中所述疾病、病症或病况是免疫性或炎性病症。

117. 根据权利要求116所述的方法,其中免疫性或炎性病症选自由以下组成的组:炎性肠病、银屑病、类风湿性关节炎、多发性硬化和阿尔茨海默氏病。

118. 根据权利要求112所述的方法,其中所述疾病、病症或病况是病毒性病症。

119. 根据权利要求118所述的方法,其中所述病毒性疾病选自由以下组成的组:人免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和巨细胞病毒。

120. 根据权利要求112所述的方法,其中所述受试者是人。

121. 根据权利要求112所述的方法,其中所述施用是通过胃肠外注射。

122. 根据权利要求121所述的方法,其中所述胃肠外注射是皮下的。

123. 根据权利要求112所述的方法,其还包括施用至少一种另外的预防剂或治疗剂。

124. 一种包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的肽,其中所述肽包含在以下位置之一的至少一个氨基酸取代:1、3、13-15、17-29、33、34、36-39、41、45、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。

125. 根据权利要求124所述的肽,其中所述肽包含用酪氨酸取代在以下位置的至少一个氨基酸残基:1、3、13-15、17-25、27-29、33、34、36-39、41、45、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。

126. 根据权利要求124所述的肽,其中所述肽包含用半胱氨酸取代在以下位置的至少一个氨基酸残基:1、3、13-15、17-25、27-29、33、34、36-39、45、48、49、51-56、58、60、67、72-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。

127. 根据权利要求124所述的肽,其中所述肽包含用N-X-S糖基化基序取代在以下位置的至少一个氨基酸残基:1、13-15、17-22、27-29、34、36、48、49、51-58、60、72-82、84、87、89-98、102或104,

其中所述N-X-S糖基化基序的天冬酰胺代表氨基酸位置。

128. 根据权利要求124所述的肽,其中所述肽包含用N-X-T糖基化基序取代在以下位置的至少一个氨基酸残基:1、13-15、17-22、29、34、36、48、49、51-58、60、71-78、80-82、84、87、89-98或102,

其中所述N-X-T糖基化基序的天冬酰胺代表氨基酸位置。

129. 一种药物组合物,其包含根据权利要求124-128中任一项所述的肽,以及药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

130. 一种无菌容器,其包含根据权利要求129所述的药物组合物。

131. 一种试剂盒,其包含根据权利要求130所述的无菌容器。

132. 一种治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求124-128中任一项所述的肽。

白细胞介素-15组合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年10月14日提交的美国临时申请序列号62/063,784的优先权权益,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及白细胞介素-15突变蛋白和白细胞介素-15相关分子、前述物质的修饰及其相关用途,等等。

背景技术

[0004] 白细胞介素-15 (IL-15) 是参与刺激NK细胞、CD8+记忆T细胞和幼稚CD8+细胞的细胞溶解活性、细胞因子分泌、增殖和存活的细胞因子(参见Fehniger等人,J Immunol 162:4511-20 (1999))。作为多效细胞因子,其在先天性和适应性免疫中起重要作用(参见Lodolce等人,Cytokine Growth Factor Rev 13(6):429-39 (2002年12月))和Alves等人,Blood 102:2541-46 (2003))。

[0005] IL-15由大量细胞类型(包括巨噬细胞、单核细胞、树突细胞和成纤维细胞)组成性表达(Grabstein等人,Science264(5161):965-68 (1994年5月))。IL-15的表达可以通过例如细胞因子(例如,GM-CSF)、双链mRNA、非甲基化CpG寡核苷酸、经由Toll样受体的脂多糖,以及干扰素(例如IFN- γ),或者在例如单核细胞被疱疹病毒、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)的感染后刺激(Bamford等人,J Immunol 160(9):4418-26 (1998年5月))。

[0006] IL-15结合T细胞和NK细胞上的特定受体复合物。IL-15和IL-15R α 在活化的树突细胞和单核细胞上共表达,并且IL-15在与IL-15R α 的复合物中发挥功能(Bergamaschi等人,J Biol Chem283:4189-99 (2008))。IL-15/IL-15 α 作为异二聚体结合到T细胞和NK细胞上的两条链-IL-2R β (也称为IL-15R β ;CD122)和 γ c(也称为IL-2RG;CD132; γ -c;普通 γ 链)分子。 β 和 γ c链在IL-2和IL-15之间共享,并且对于这些细胞因子的信号传导是必需的(Giri等人,EMBO J.13:2822-30 (1994)和Giri等人,EMBO J.14:3654-3663 (1995))。

[0007] 与IL-2/IL-15 β γ c受体复合物的共享一致,已经显示IL-15在体外介导与IL-2的功能相似的许多功能。它们共享许多生物活性,并且对T淋巴细胞的存活表现出相似的贡献(参见Waldmann等人,Annu Rev Immunol 17:19-49 (1999))。据信,IL-2和IL-15之间的生物学差异可能是由于例如其不同的产生位点、其与膜受体蛋白(分别称为IL-2 α 和IL-15R α)的结合强度,以及这些额外的受体分子的调节。IL-2和IL-15在调节CD8+记忆细胞数目方面发挥作用。

[0008] 尽管事实上IL-15涉及许多疾病、病症和病况,包括例如某些病毒性疾病和癌性病况,但目前没有IL-15相关药剂是可商购的。因此,安全有效的IL-15药剂将解决迄今未满足的医学需求。

发明内容

[0009] 本公开涉及IL-15组合物及其用途。术语“IL-15”、“IL-15多肽”、“IL-15剂”、“IL-15分子”等旨在广义地解释,并且包括例如人和非人IL-15相关多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如信号肽)的IL-15多肽。具体实施方案涉及前述各项的修饰。在具体实施方案中,与其肽的未修饰形式相比,修饰改善了肽的至少一种性质或其它特征(例如半衰期或功效)。在某些实施方案中,修饰导致生物活性的降低,条件是增强了另一种特征(例如,药代动力学参数,如半衰期),导致从治疗角度至少有益,并且通常更为有益的经修饰的IL-15分子。

[0010] 本公开的其它实施方案涉及用于鉴定可根据本文所述方法修饰的IL-15的特定氨基酸残基或结构域的方法和其它技术。使用(例如,治疗或预防病症或其症状)、鉴定和/或产生本文所述的肽的方法也是本公开的方面。其它方面包括例如包含肽的药物组合物。

[0011] 成熟人IL-15是114个氨基酸的单体多肽。已经报道了两种转录物,一种具有48个氨基酸的信号肽(长信号肽;LSP)(图1A;SEQ ID NO:1),以及另一种具有21个氨基酸的信号肽(短信号肽;SSP)(图1B;SEQ ID NO:2),两者都产生相同的成熟蛋白(图1C;SEQ ID NO:3)。如本文阐述,成熟人IL-15描述为包括通过三种截然不同的氨基酸区段(A/B环;B/C转角;和C/D环)连接的四个螺旋(A-D)。这些氨基酸区段也称为一个或多个螺旋间接合。

[0012] 在下文中讨论了可以或不可以突变和/或修饰的IL-15螺旋和螺旋间接合的氨基酸残基和区域。举例来说,被埋在IL-15的三维核心内或参与受体结合的氨基酸残基和区域通常不是修饰的候选物。

[0013] 本公开考虑包含会有利于将PEG或其它部分(例如血清白蛋白)对至少一个氨基酸残基的连接取代的肽。在下文中详细描述了此类肽的实例。

[0014] 本文描述了用于评估本文所述的IL-15肽的免疫原性的方法。在另外的实施方案中,经修饰的肽在至少一种性质(例如物理性质,包括溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间)方面具有改善。在下文进一步描述了此类特性。在本公开的具体实施方案中,与相应的未修饰的IL-15肽相比,突变体IL-15或经修饰的IL-15肽的免疫原性更小(即,刺激更少的免疫应答)。在其它实施方案中,经修饰的IL-15肽与相应的未修饰的IL-15肽相比是免疫原性-中性的(即不以治疗相关方式改变免疫原性)。

[0015] 本公开考虑包含图1C的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)的肽,其中肽包含至少一个氨基酸取代、缺失或添加,并且其中取代、缺失或添加不会例如不利地影响溶解度或免疫原性。本公开还考虑具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列的至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的肽,其中肽a)具有与SEQ ID NO:3的肽相比改善的至少一种性质(例如物理性质,包括溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间),和/或b)不比SEQ ID NO:3的肽具有更多的免疫原性,和/或c)具有至少等于SEQ ID NO:3的肽的生物活性的生物活性。

[0016] 对于本领域技术人员将显而易见的是,利用不同的方法(例如,量化IL-15的确切浓度的不同方法和/或产生IL-15的不同方法)可能由于计算蛋白质浓度或实际活性的差异而在表观活性中有或多或少的活性的IL-15剂。通过利用他们的技能和经验,熟练技术人员将能够在确定IL-15分子相对于hIL-15的相对生物活性方面考虑到这些差异。在一些实施

方案中,此类IL-15分子具有至少60、至少70、至少80、至少90、至少95、至少100、至少101、至少102、至少103、至少104、至少105、至少106、至少107、至少108、至少109、至少110、至少111、至少112或至少113个氨基酸残基。

[0017] 在一些实施方案中,上述肽的氨基酸残基添加、缺失或取代不会破坏肽的分子内二硫键。然而,应当注意,此类添加、缺失或取代可能会破坏一个或多个分子间非共价键(例如,氢键),但是此类破坏不应该对蛋白质功能具有治疗相关作用。根据本公开的教导,在一些具体实施方案中,氨基酸取代可以是保守取代,并且在其它具体实施方案中,氨基酸取代可以是非保守取代。

[0018] 在具体实施方案中,本公开考虑具有至少等于SEQ ID NO:3的生物活性的生物活性的肽。生物活性可以通过本领域已知的任何方法测定,包括趋化因子释放测定法、TNF α 产生测定法、CTLL-2细胞增殖测定法、M07e细胞增殖测定法或T细胞IFN γ 分泌测定法。可以使用CD4 $^{+}$ 细胞、CD8 $^{+}$ 细胞或NK细胞进行T细胞筛选。本领域技术人员熟悉此类测定,并且本文描述了其中几个的示例性方案。同样,可以通过本领域技术人员已知的任何方法预测或测定肽的免疫原性,包括通过筛选T细胞表位或B细胞表位中的至少一种进行预测。在一个方面,通过计算机系统和/或离体测定系统预测免疫原性。

[0019] 本公开还考虑包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的肽,其中所述肽包含表面暴露的氨基酸残基的至少一个氨基酸取代,并且其中所述取代不会不利地影响生物活性、免疫原性和/或其它性质或特征。在某些实施方案中,这些肽也不包含参与受体结合的任何氨基酸残基的取代。然而,应当理解,本公开考虑了可以容许的IL-15受体结合区内或与其极其接近的一个或多个氨基酸残基的取代、缺失和/或添加。

[0020] 如本文中别处详细描述和图3中描绘,成熟的hIL-15包含a)螺旋A(氨基酸残基1-17);b)A/B螺旋间接合(A/B环)(氨基酸残基18-31);c)螺旋B(氨基酸残基32-53);d)B/C螺旋间接合(B/C转角)(氨基酸残基54-57);e)螺旋C(氨基酸残基58-77);f)C/D螺旋间接合(C/D环)(氨基酸残基78-96);和g)螺旋D(氨基酸残基97-114)。在一些实施方案中,本公开考虑肽,其包含a)螺旋A;b)A/B螺旋间接合;c)螺旋B;d)B/C螺旋间接合;e)螺旋C;f)C/D螺旋间接合;和g)螺旋D;其中此类肽还包含下列至少一项:i)除了氨基酸残基2(W)、4-12(NVISDLKKI;SEQ ID NO:37)或16(I)外的螺旋A的至少一个氨基酸残基的取代;或ii)除了氨基酸残基30(D)或31(V)外的A/B螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或iii)除了氨基酸残基32(H)、35(C)、40(M)、42-44(CFL)、47(L)或50(I)外的螺旋B的至少一个氨基酸残基的取代;或iv)B/C螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或v)除了氨基酸残基59(I)、61-66(DTVENL;SEQ ID NO:38)或68-70(ILA)外的螺旋C的至少一个氨基酸残基的取代;或vi)除了氨基酸残基85(C)或88(C)外的C/D螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或vii)除了氨基酸残基99(F)、100(L)、103(F)或105-112(HIVQMFIN;SEQ ID NO:39)外的螺旋D的至少一个氨基酸残基的取代。

[0021] 参考前面段落中描述的肽,在具体实施方案中,本公开考虑肽,其中至少一个氨基酸取代在以下区域中的至少一个中:13-15、17-29、36-39、51-58、71-84或89-98。在其它实施方案中,至少一个氨基酸取代在以下区域中的至少一个中:17-28、36-38、51-57、71-84或89-98。在另外的实施方案中,至少一个氨基酸取代至少在以下位置之一:1、3、13-15、17-29、33、34、36-39、41、45、46、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或

114。在某些实施方案中,至少一个氨基酸取代至少在以下位置之一:1、17-28、36-38、41、45、46、48、49、51-57、60、67、71-84、86、87、89-98、101、113或114。

[0022] 使用系统方法,将上文鉴定的残基取代,以便引入能够为PEG提供锚定和/或其它修饰的氨基酸。在本公开的具体实施方案中,用半胱氨酸、酪氨酸和N-糖基化位点(N-X-S和N-X-T基序)取代先前鉴定为此类取代的候选物的每个残基。下文详细描述并在图6中概述的结果为熟练技术人员提供了关于产生有利的IL-15突变蛋白的具体指导。

[0023] 本公开的具体实施方案考虑本文所述的肽的修饰,其中修饰不改变肽的氨基酸序列(即,不将氨基酸取代、添加或缺失引入IL-15一级氨基酸序列中),并且与肽的未修饰形式相比,修饰改善或以其它方式增强肽的至少一种性质或其它特征(例如,药代动力学参数或功效)。

[0024] 本公开考虑引入可能有利的任何修饰。因此,在具体实施方案中,修饰改善了肽的至少一种物理性质(例如溶解度、生物利用度、血清半衰期和循环时间)。其它修饰包括引入用于阻断受体切割和增加对IL-15受体的亲和力的手段(或修饰解离速率,使得IL-15分子将与受体对接更长持续时间)。在另外的实施方案中,IL-15肽的修饰不会对治疗相关的水平的免疫原性造成有害影响,并且在另外的实施方案中,经修饰的IL-15比未修饰的IL-15具有更小的免疫原性。

[0025] 在一些实施方案中,修饰是聚乙二醇化,并且经修饰的肽是PEG-IL-15。聚乙二醇化的肽可以包含共价连接到IL-15的至少一个氨基酸残基的至少一种PEG分子(例如,N-末端或C-末端聚乙二醇化)。可以经由接头将PEG分子与IL-15缀合;在下文中详细描述接头。在一些实施方案中,可以如下修饰(例如聚乙二醇化)IL-15上的两个或更多个不同位点:通过引入多于一个突变,然后修饰它们中的每个。在另外的实施方案中,可以与在IL-15蛋白内的其它地方引入一种或多种突变,以及其修饰(例如,聚乙二醇化)组合修饰(例如聚乙二醇化)N-末端。在另外的实施方案中,可以与在IL-15蛋白内的其它地方引入一种或多种突变,以及其修饰(例如,聚乙二醇化)组合修饰(例如聚乙二醇化)C-末端。可以与N-末端的聚乙二醇化组合修饰(例如聚乙二醇化)IL-15的酪氨酸26。在另外的实施方案中,IL-15肽可以在N-末端和C-末端包含修饰(例如聚乙二醇化)。在本文中描述示例性聚乙二醇化条件。在另外的实施方案中,可以与在IL-15蛋白内的其它地方引入一种或多种突变,以及其修饰(例如,聚乙二醇化)组合修饰(例如聚乙二醇化)N-末端。PEG组分可以是肽容许的任何PEG。由于IL-15的相对较小的尺寸,PEG的分子量大于用于许多其它蛋白质治疗剂的PEG的分子量。举例来说,经修饰的肽的PEG组分在一些实施方案中具有5kDa至20kD的分子量,在其它实施方案中分子量大于20kDa,在某些实施方案中分子量大于25kDa,在其它实施方案中分子量大于30kDa,在其它实施方案中分子量大于35kDa,或在其它实施方案中分子量至少为40kD。在具体实施方案中,PEG具有20至40kDa的分子量。本文描述了具有其它分子量值的PEG。

[0026] 本公开考虑对肽的任何修饰,其赋予期望的性质,包括改善(例如,掩蔽)未修饰的肽的性质。在一些实施方案中,经修饰的肽包含Fc融合分子;血清白蛋白(例如HSA或BSA),其可以为HSA融合分子或白蛋白缀合物形式;或白蛋白结合结构域。经修饰的肽可以是糖基化的或HES化的(hesylated)。在本公开内的别处描述前述各项的详细描述。

[0027] 在具体实施方案中,修饰是位点特异性的。在另外的实施方案中,修饰包括接头。

一些经修饰的IL-15分子可以包含多于一种类型的修饰。对本文所述的IL-15肽的修饰类型和引入此类修饰的方法不是限制性的,并且熟练技术人员可以设想其它此类修饰和方法。

[0028] 可以重组产生本文所述的肽。本公开考虑编码肽的核酸分子,其中核酸分子可以可操作地连接到表达控制元件,所述表达控制元件赋予编码肽的核酸分子在体外、在细胞中或在体内的表达。载体(例如,病毒载体)可以包含此类核酸分子。另外的实施方案需要表达本文所述的肽的转化细胞或宿主细胞。

[0029] 本公开还考虑结合本文的教导使用基因疗法。对于基因疗法用途和方法,可以用编码如本文阐述的IL-15相关多肽的核酸在体内转化受试者中的细胞。或者,可以用转基因或多核苷酸在体外转化细胞,然后移植到受试者的组织中以实现治疗。此外,可以用编码IL-15相关多肽的转基因或多核苷酸转化原代细胞分离物或建立的细胞系,然后任选地移植到受试者的组织中。

[0030] 如本文中所述,本公开的肽可以包含通过引入至少一个突变产生的至少一个独特的表位。在一些实施方案中,至少一个独特的表位结合(特异性或非特异性)抗体(例如,激动性抗体)。在另外的实施方案中,抗体(例如,激动性抗体)的作用模拟通过IL-15受体的IL-15活化。

[0031] 抗体可以是单克隆或多克隆的,并且可以是例如人或人源化的。实施方案包括包含存在于不同多肽或单个多肽中的轻链可变区和重链可变区的抗体,或包含重链恒定区的抗体,所述重链恒定区例如是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。例如,抗体可以是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂或Fab'抗体,或者它可以是单链Fv(scFv)抗体(其可以是多聚化的)。

[0032] 在另外的实施方案中,本公开的抗体以约10E7M⁻¹至约10E12M⁻¹的亲和力结合肽。抗体可以包含选自脂质部分、脂肪酸部分、多糖部分和碳水化合物部分的共价连接的部分。也考虑实施方案,其中抗体包含亲和结构域,可以固定在固体支持物上,包含共价连接的非肽聚合物(例如,聚(乙二醇)聚合物)或者是可检测标记的。

[0033] 本公开包括药物组合物,其包含本文所述的肽或抗体和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂是等渗注射溶液。药物组合物可适合于对受试者(例如人)施用,并且可包含一种或多种另外的预防剂或治疗剂。在某些实施方案中,药物组合物包含在无菌容器(例如,单次或多次使用的小瓶或注射器)中。试剂盒可以包含无菌容器,并且试剂盒还可以含有一种或多种另外的无菌容器,其包含至少一种另外的预防剂或治疗剂或可用于药理学疗法的任何其它药剂。本文中阐述了这些方面的实例。

[0034] 本公开的另外的实施方案包括治疗或预防受试者(例如人)中的疾病、病症或病况的方法,包括施用治疗有效量的本文所述的肽。其它实施方案包括治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,包括施用治疗有效量的本文所述的抗体。在本公开的各种实施方案中,疾病、病症或病况是增殖性疾病,包括癌症或癌症相关疾病(例如,实体瘤或血液病症);免疫性或炎症性疾病(例如炎症肠病、银屑病、类风湿性关节炎、结节病、多发性硬化和阿尔茨海默氏病);病毒性疾病(例如人免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和巨细胞病毒)。

[0035] 在治疗或预防疾病、病症或病况的方法中,施用治疗有效量的本文所述的肽(或抗体)可以通过适合于肽(或抗体)的任何途径,包括胃肠外注射(例如,皮下)。一种或多种另外的预防剂或治疗剂可以与肽(或抗体)一起(例如,之前、同时或之后)施用,和/或它可以

与肽(或抗体)分开或组合施用。

[0036] 本公开的另外的实施方案包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中肽包含以下位置之一的至少一个氨基酸取代:1、3、13-15、17-29、33、34、36-39、41、45、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。在一些实施方案中,肽包含用酪氨酸取代以下位置的至少一个氨基酸残基:1、3、13-15、17-25、27-29、33、34、36-39、41、45、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。在其它实施方案中,肽包含用半胱氨酸取代以下位置的至少一个氨基酸残基:1、3、13-15、17-25、27-29、33、34、36-39、45、48、49、51-56、58、60、67、72-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。在另外的实施方案中,肽包括用N-X-S糖基化基序取代以下位置的至少一个氨基酸残基:1、13-15、17-22、27-29、34、36、48、49、51-58、60、72-82、84、87、89-98、102或104,其中N-X-S糖基化基序的天冬酰胺代表氨基酸位置。在另外的实施方案中,肽包括用N-X-T糖基化基序取代以下位置的至少一个氨基酸残基:1、13-15、17-22、29、34、36、48、49、51-58、60、71-78、80-82、84、87、89-98或102,其中N-X-T糖基化基序的天冬酰胺代表氨基酸位置。

[0037] 本公开考虑前述段落中描述的肽与本文中公开的所有实施方案一起使用,用作本文中公开的所有实施方案的组分,等等。举例来说,在具体实施方案中,本公开考虑药物组合物、无菌容器和试剂盒,其包含前述段落中描述的肽。在其它实施方案中,可以对受试者施用治疗有效量的前述段落中描述的肽以治疗或预防如本文中所述的疾病、病症或病况。

[0038] 在审阅本文中阐述的教导后,本公开的其它方面对于熟练技术人员将是显而易见的。

附图说明

[0039] 图1A描绘了IL-15长信号肽(LSP)蛋白(162个氨基酸残基;SEQ ID NO:1)。信号肽(下划线)包含残基1-48。

[0040] 图1B描绘了IL-15短信号肽(SSP)蛋白(135个氨基酸残基;SEQ ID NO:2)。信号肽(下划线)包括残基1-21。

[0041] 图1C描绘了成熟人IL-15蛋白(114个氨基酸残基)(SEQ ID NO:3)。

[0042] 图2A描绘了长信号肽(LSP) cDNA开放阅读框(ORF)(489个碱基对(SEQ ID NO:4),编码162个氨基酸残基)。信号肽(下划线)包含编码前48个氨基酸的碱基对1-144。

[0043] 图2B描绘了短信号肽(SSP) cDNA开放阅读框(ORF)(408个碱基对(SEQ ID NO:5),编码135个氨基酸残基)。信号肽(下划线)包含编码前21个氨基酸的碱基对1-63。

[0044] 图2C描绘了编码成熟人IL-15蛋白的核酸序列(345个碱基对(SEQ ID NO:6),编码114个氨基酸残基)。

[0045] 图3描绘了成熟人IL-15氨基酸序列(SEQ ID NO:3),指示对应于螺旋A-D的区域和螺旋间接合。

[0046] 图4A是IL-15受体信号传导复合物(PDB 4GS7)的蛋白质晶体结构带状表示;顶视图:IL2/15R β , IL15R α , 普通 γ 链和IL-15(螺旋和螺旋内的特征是标记的)。

[0047] 图4B是IL-15受体信号传导复合物(PDB 4GS7)的蛋白质晶体结构带状表示;侧视图:IL2/15R β , IL15R α , 普通 γ 链和IL-15(螺旋和螺旋内的特征是标记的)。

[0048] 图5描绘了成熟人IL-15氨基酸序列(SEQ ID NO:3),指示哪些残基代表聚乙二醇

化的潜在位点。“+”指示残基是潜在位点，“-”指示残基不是潜在位点，“+/-”表示残基可能是潜在位点。

[0049] 图6A-6B描绘了成熟人IL-15氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)，指示哪些氨基酸残基代表通过用酪氨酸或半胱氨酸取代，或通过产生N-糖基化基序 (N-X-S或N-X-T) 得到的用于聚乙二醇化的潜在位点。浅灰色小室表示图5中鉴定为潜在的聚乙二醇化位点的残基，并且“+”表示在该位置插入的突变体在活性测定法中是有活性的，而空的浅灰色小室表示在该位置插入的突变体没有表现出活性或不能以可检测的水平表达。

具体实施方案

[0050] 在进一步描述本公开之前，应当理解，本公开不限于本文阐述的具体实施方案，并且还应当理解，本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的，并且不意图是限制性的。

[0051] 在提供数值范围的情况下，应当理解，除非背景另有明确规定，否则本发明内涵盖所述范围的上限和下限之间的每个居间数值 (至下限单位的十分之一)，以及所述规定范围内的任何其它规定或居间数值。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内，并且还包括在本发明内，在规定范围内受到任何明确排除的限制。在规定范围包括一个或两个限制的情况下，排除那些包括的限制之一或两者的范围也包括在本发明中。除非另有定义，本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0052] 必须指出，如本文和所附权利要求中所使用，单数形式“一个”、“一种”和“所述/该”包括复数指示物，除非背景另有明确规定。还应注意，可以撰写权利要求以排除任何可选要素。因此，本叙述旨在充当与叙述权利要求要素或使用“否定”限制结合使用如“仅仅”，“仅”等排他性术语的先行基础。

[0053] 本文所讨论的出版物仅提供其在本申请的申请日之前的公开。此外，提供的出版物的日期可能与实际出版日期不同，这可能需要独立确认。

[0054] 概述

[0055] 本公开考虑突变体IL-15分子 (例如，突变蛋白) 和其它IL-15相关分子，以及其鉴定方法及其用途。如本文所述，可以修饰IL-15分子以例如增强天然人IL-15的性质，包括半衰期延长。修饰包括聚乙二醇化和与白蛋白 (例如HSA) 和Fc的融合。特定的IL-15分子具有与人IL-15相当的免疫原性，和/或至少与人IL-15相当的生物活性，和/或至少一种性质的改善 (例如，物理性质，包括溶解性、生物利用度、血清半衰期和循环时间)。熟练技术人员将认识到，由于例如非常长的半衰期，此类分子可能是可行的治疗剂。本文所述的IL-15分子及其组合物 (例如，药物组合物) 可用于治疗和/或预防各种疾病、病症和病况，和/或其症状，包括例如炎性病症和免疫相关病症，以及癌症和癌症相关病症。

[0056] 应当注意，与本公开的多肽和核酸分子相关的对“人”的任何提及并不意味着对于获得多肽或核酸的方式或来源而言是限制性的，而是仅参考序列，因为它可以对应于天然存在的人多肽或核酸分子的序列。除了人多肽和编码它们的核酸分子之外，本公开还考虑来自其它物种的IL-15相关多肽和相应的核酸分子。

[0057] 定义

[0058] 除非另有指示，以下术语旨在具有以下阐述的含义。在贯穿本说明书的其它地方

定义了其它术语。

[0059] 术语“患者”或“受试者”可互换使用,指人或非人动物(例如哺乳动物)。

[0060] 术语“施用”等当它们应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时指例如 IL-15 或 PEG-IL-15、核酸(例如,编码天然人 IL-15 的核酸)、包含前述物质的药物组合物或诊断剂;与受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。在细胞的背景中,施用包括试剂与细胞接触(例如体外或离体),以及试剂与流体接触,其中使流体与细胞接触。

[0061] 短语“治疗”、“处理”等指在已经诊断、观察到疾病、病症或病况或其症状之后启动,从而暂时或永久地消除、减少、抑制、减轻或改善至少一种折磨受试者的疾病、病症或病况的主要原因,或者与折磨受试者的疾病、病症或病况有关的至少一种症状的作用过程(如施用 IL-15 或包含 IL-15 的药物组合物)。因此,治疗包括抑制(例如,阻止疾病、病症或病况或与其有关的临床症状的发展或进一步发展)活动性疾病。术语也可以用于其它情况,如 IL-15 或 PEG-IL-15 在例如流体相或胶体相中接触 IL-15 受体的情况。

[0062] 如本文中所用,术语“需要治疗”是指由内科医生或其他护理人员作出的受试者需要或将受益于治疗的判断。这种判断是基于内科医生或护理人员专业领域的各种因素。

[0063] 术语“预防”等指以某种方式(例如,在疾病、病症、病况或其症状发作前)启动,以便暂时或永久地预防、阻抑、抑制或减少受试者发生疾病、病症、病况等的风险(如通过例如临床症状的缺乏确定)或延迟其发作(通常在倾向于具有特定疾病、病症或病况的受试者的背景中)的作用过程(如施用 IL-15 或包含 IL-15 的药物组合物)。在某些情况下,术语还指减缓疾病、病症或病况的进展或抑制其进展成有害或其它不期望的状态。

[0064] 如本文中所用,术语“需要预防”是指内科医生或其他护理人员作出的关于受试者需要或将受益于预防性护理的判断。基于内科医生或护理人员专业领域的各种因素做出这种判断。

[0065] 术语“治疗有效量”是指单独或作为药物组合物的一部分且以单一剂量或作为一系列剂量的一部分,以在对受试者施用时能够对疾病、病症或病况的任何症状、方面或特征具有任何可检测、积极影响的量对受试者施用药剂。可以通过测量相关的生理效应来确定治疗有效量,并且它可以结合给药方案和受试者的病况的诊断分析等来调整。举例来说,在施用后产生的炎症细胞因子的量的测量可以指示是否已经使用治疗有效量。

[0066] 短语“以足以实现变化的量”是指在施用特定疗法之前(例如,基线水平)和之后测量的指标水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,IL-15 的血清浓度)或主观参数(例如受试者的幸福感)。

[0067] 术语“小分子”是指具有小于约 10kDa、小于约 2kDa 或小于约 1kDa 的分子量的化学化合物。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子和合成分子。在治疗上,小分子可能比大分子更易透过细胞,不易降解,并且不太可能引发免疫应答。

[0068] 术语“配体”是指例如可以起受体的激动剂或拮抗剂作用的肽、多肽、膜缔和或膜结合的分子或其复合物。“配体”涵盖天然配体和合成配体,例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和源自抗体的结合组合物,以及例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。术语还涵盖既不是激动剂也不是拮抗剂,但是可以结合受体而不显著影响其生物学特性(例如信号传导或粘附)的药剂。此外,术语包括已经例如通过化学或重组方法改变为

膜结合配体的可溶形式的膜结合配体。配体或受体可以完全是细胞内的,也就是说,其可以驻留在胞质溶胶、细胞核或其它细胞内区室中。配体和受体的复合物称为“配体-受体复合物”。

[0069] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”,或“活化因子”和“激动剂”分别指抑制性或活化性分子,例如用于活化例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织。抑制剂是减少、阻断、阻止、延迟激活、失活、脱敏或下调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。活化因子是增加、激活、促进、增强激活、敏化或上调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。抑制剂也可以定义为降低、阻断或失活组成性活性的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促进靶标激活的增加的分子。“拮抗剂”是与激动剂的作用相反分子。拮抗剂预防、减少、抑制或中和激动剂的活性,并且拮抗剂也可以预防、抑制或降低靶标(例如靶受体)的组成性活性,即使在没有鉴定的激动剂的情况下。

[0070] 术语“调节”等是指分子(例如,活化因子或抑制剂)直接或间接地增加或降低IL-15分子(或编码它们的核酸分子)的功能或活性的能力;或增强分子产生与IL-15分子相当的效果的能力。术语“调节剂”意图广泛地指可以影响上文所述活性的分子。举例来说,例如基因、受体、配体或细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或细胞的活性的分子,其中活性可以受激活、抑制或在其调节性质上改变。调节剂可以单独起作用,或者它可以使用辅因子,例如蛋白质、金属离子或小分子。术语“调节剂”包括经由与IL-15相同的作用机制起作用(即,与IL-15以类似于其的方式调节相同的信号传导途径的药剂)并且能够引发相当于(或大于)IL-15的生物应答的生物应答的药剂。

[0071] 调节剂的实例包括小分子化合物和其它生物有机分子。许多小分子化合物的文库(例如,组合文库)是可商购的,并且可以充当用于鉴定调节剂的起点。熟练技术人员能够开发一种或多种测定法(例如,生物化学或基于细胞的测定法),其中可以筛选此类化合物文库以鉴定一种或多种具有期望性质的化合物;此后,熟练的药物化学家能够通过例如合成和评估其类似物和衍生物来优化此类一种或多种化合物。合成和/或分子建模研究也可用于鉴定上文所述的分子。

[0072] 分子的“活性”可以描述或指分子与配体或受体的结合;催化活性;刺激基因表达或细胞信号传导、分化或成熟的能力;抗原性活性;其它分子的活性的调节等。术语还可以指在调节或维持细胞与细胞相互作用(例如粘附)中的活性,或在维持细胞(例如细胞膜)结构中的活性。“活性”也可以意指比活性,例如[催化活性]/[mg蛋白]或[免疫活性]/[mg蛋白]、生物区室中的浓度等。术语“增殖活性”涵盖促进,例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生,对于例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生必需,或者与例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生明确相关的活性。

[0073] 如本文中所用,“相当”、“相当的活性”、“与…相当的活性”、“相当的效果”、“与…相当的效果”等是可以定量和/或定性观察的相对术语。术语的含义往往取决于使用它们的背景。举例来说,两种都激活受体的药剂可以从定性角度看作具有相当的效果,但是如果根据公认的测定法(例如剂量-响应测定法)中或在公认的动物模型中测定,一种药剂只能达到另一种药剂的活性的20%,那么这两种药剂可以从定量角度看作缺乏相当的效果。当将一个结果与另一个结果(例如,一个结果与参考标准)进行比较时,“相当的”经常(尽管不总

是)意味着一个结果与参考标准偏离小于35%、小于30%、少于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。在具体实施方案中,如果一个结果与参考标准偏离小于15%、小于10%或小于5%,则它与参考标准是相当的。举例来说而非限制,活性或效果可以指功效、稳定性、溶解度或免疫原性。如前指示,熟练技术人员认识到,使用不同的方法可能导致IL-15由于计算蛋白质浓度或实际活性的差异而在表观活性中比hIL-15参考标准具有或多或少的活性。熟练技术人员将能够在确定IL-15分子相对于hIL-15的相对生物活性方面考虑到这些差异。

[0074] 例如,细胞、组织、器官或生物体的术语“应答”包括生物化学或生理行为的变化,例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移,基因表达速率或分化状态,其中变化与激活、刺激或治疗相关,或与内部机制如遗传编程相关。在某些情况下,术语“激活”,“刺激”等指如由内部机制以及外部或环境因素调节的细胞活化;而术语“抑制”,“下调”等指相反的效果。

[0075] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸、化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸和具有经修饰的多肽主链的多肽。术语包括融合蛋白,包括但不限于与异源氨基酸序列的融合蛋白、与具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的异源和同源前导序列的融合蛋白;免疫标记的蛋白质等。

[0076] 如本文中所用,术语“变体”和“同源物”可互换使用以分别指与参考氨基酸或核酸序列相似的氨基酸或DNA序列。术语涵盖天然存在的变体和非天然存在的变体。天然存在的变体包括同源物(从一种物种到另一种物种分别在氨基酸或核苷酸序列上不同的多肽和核酸)和等位变体(从一种物种内的一个个体到另一个分别在氨基酸或核苷酸序列上不同的多肽和核酸)。因此,变体和同源物涵盖天然存在的DNA序列和由其编码的蛋白质及其同种型,以及蛋白质或基因的剪接变体。术语还涵盖在一个或多个碱基中与天然存在的DNA序列存在变化,但是由于遗传密码的简并性仍然翻译为对应于天然存在的蛋白质的氨基酸序列的核酸序列。非天然存在的变体和同源物包括分别包含氨基酸或核苷酸序列变化的多肽和核酸,其中人工引入序列的变化(例如,突变蛋白);例如,在实验室中通过人干预(“人为”)产生变化。因此,非天然存在的变体和同源物也可以指与天然存在的序列相差一个或多个保守取代和/或标签和/或缀合物的那些。

[0077] 如本文中所用,术语“突变蛋白”广泛地指突变的重组蛋白。这些蛋白质通常携带单个或多个氨基酸取代,并且经常源自已进行定点或随机诱变的克隆基因或完全合成的基因。除非另有指示,使用如“IL-15突变体”等术语是指IL-15突变蛋白。

[0078] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等在本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物)的聚合形式。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等。

[0079] 应当理解,贯穿本公开,根据单字母或三字母代码提及氨基酸。为了方便读者,下文提供了单字母和三字母氨基酸代码:

[0080]	G	甘氨酸	Gly	P	脯氨酸	Pro
	A	丙氨酸	Ala	V	缬氨酸	Val
	L	亮氨酸	Leu	I	异亮氨酸	Ile
	M	甲硫氨酸	Met	C	半胱氨酸	Cys
	F	苯丙氨酸	Phe	Y	酪氨酸	Tyr
	W	色氨酸	Trp	H	组氨酸	His
	K	赖氨酸	Lys	R	精氨酸	Arg
	Q	谷氨酰胺	Gln	N	天冬酰胺	Asn
	E	谷氨酸	Glu	D	天冬氨酸	Asp
	S	丝氨酸	Ser	T	苏氨酸	Thr

[0081] 如本文中关于天然人IL-15或IL-15突变蛋白所使用,术语“经修饰的”,“修饰”等指增强人IL-15或IL-15突变蛋白的期望性质的一种或多种变化。这些期望的性质包括例如延长循环半衰期、增加稳定性、减少清除、改变免疫原性或变应原性,以及使特定抗体(例如通过引入独特表位)能够用于检测测定法。如下文中详细讨论,可以进行的对人IL-15或IL-15突变蛋白的修饰包括但不限于聚乙二醇化(共价连接一个或多个聚乙二醇(PEG)分子或其衍生物);糖基化(例如,N-糖基化)、聚唾液酸化和HES化;白蛋白融合;经由例如缀合的脂肪酸链(酰化)的白蛋白结合;Fc-融合;和与PEG模拟物的融合。在一些实施方案中,在此类修饰中使用接头并在下文中描述。

[0082] 如本文中在多肽结构的背景中所使用,“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)是指多肽的极端氨基和羧基末端,而术语“N-末端”和“C-末端”分别指多肽的氨基酸序列相对于N-末端和C-末端的相对位置,并且可以包括N-末端和C-末端的残基。“直接N-末端”或“直接C-末端”是指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一和第二氨基酸残基共价结合以提供连续的氨基酸序列。

[0083] 在氨基酸序列或多核苷酸序列(例如,源自“IL-15多肽”的氨基酸序列)的背景中,“源自”意在指示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸(例如,天然存在的IL-15多肽或编码IL-15的核酸)序列的序列,并不意味着就制备蛋白质或核酸的来源或方法而言是限制性的。举例来说,术语“源自”包括参考氨基酸或DNA序列的同源物或变体。

[0084] 在多肽的背景中,术语“分离的”是指若天然存在的话在与其可以天然存在的环境不同的环境中所关注的多肽。“分离的”意在包括在基本上富集所关注的多肽和/或部分或基本上纯化所关注的多肽的样品内的多肽。当多肽不是天然存在时,“分离的”指示多肽已经从通过合成或重组手段制备它的环境中分离出来。

[0085] “富集”意味着样品被非天然操作(例如由科学家进行),以便以下述浓度存在所关注的多肽:a)比起始样品,如生物样品(例如,多肽天然存在或它在施用后存在的样品)中的多肽浓度大的浓度(例如,大至少3倍、大至少4倍、大至少8倍,大至少64倍或更多)或b)比制备多肽的环境(例如,与在细菌细胞中一样)更大的浓度。

[0086] “基本上纯的”指示组分(例如多肽)占组合物总含量的大于约50%,并且通常总多肽含量的大于约60%。更典型地,“基本上纯的”是指其中总组合物中至少75%、至少85%、

至少90%或更多是所关注组分的组合物。在一些情况下,多肽将占组合物总含量的大于约90%,或大于约95%。

[0087] 当提到配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时,术语“特异性结合”或“选择性结合”指示结合反应,其决定蛋白质在异质蛋白质群体及其它生物制剂中的存在。因此,在指定条件下,规定的配体结合特定受体,并且不以显著量结合样品中存在的其它蛋白质。考虑的方法的抗体或源自抗体的抗原结合位点的结合组合物以下述亲和力结合其抗原或其变体或突变蛋白,所述亲和力比任何其它抗体或自其衍生的结合组合物的亲和力大至少2倍、大至少10倍、大至少20倍或大至少100倍。在一个具体的实施方案中,抗体将具有大于约 10^9 升/摩尔的亲和力,如通过例如Scatchard分析(Munsen等人,1980Analyt.Biochem.107:220-239)测定。

[0088] IL-15

[0089] IL-15,也称为MGC9721,预测是由染色体4q31上的34kb区编码的12.8kDa单体糖蛋白。IL-15属于四 α -螺旋束家族,其中的其它成员包括IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。人IL-15的基因组结构包含9个外显子(1-8和4A)和8个内含子。人和小鼠共享相似的内含子/外显子结构。编码成熟蛋白的IL-15基因部分的整体内含子/外显子结构类似于IL-2基因和其它4种 α -螺旋束细胞因子的结构。

[0090] 本领域技术人员将理解IL-15核酸和氨基酸序列在基因数据库(例如,GenBank)中是可公开获得的。如图1C(SEQ ID NO:3)中描绘,成熟人IL-15蛋白包含114个氨基酸残基(12.8kDa)。在大肠杆菌中产生的重组人IL-15是单个非糖基化多肽链(115个氨基酸残基,包括N-末端甲硫氨酸,具有12.9kD的分子量)。已经报道了两种转录物,据报道两者都产生相同的成熟蛋白质。参考图1A(SEQ ID NO:1),IL-15长信号肽(LSP)蛋白(登录号BC018149.2)包含162个氨基酸残基,包括48个残基信号肽(下划线)。参考图1B(SEQ ID NO:2),IL-15短信号肽(SSP)蛋白(登录号BC100962.1)包含135个氨基酸残基,包括21个残基的信号肽(下划线)。已将LSP描述为分泌性蛋白质,并且已将SSP描述为剩余的细胞内的。

[0091] 图2A描绘了长信号肽(LSP) cDNA ORF(489个碱基对(SEQ ID NO:4),编码162个氨基酸残基)(登录号BC018149.2);信号肽(下划线)包括碱基对1-144,编码前48个氨基酸。图2B描绘了短信号肽(SSP) cDNA ORF(408个碱基对(SEQ ID NO:5),编码135个氨基酸残基)(登录号BC100962.1);信号肽(下划线)包括碱基对1-63,编码前21个氨基酸。图2C描绘了编码成熟人IL-15蛋白的核酸序列(345个碱基对(SEQ ID NO:6),编码114个氨基酸残基)。

[0092] 非人示例性哺乳动物IL-15核酸或氨基酸序列可来自例如灵长类、犬、猫、猪、马、牛、绵羊、啮齿动物、鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠。示例性非人哺乳动物IL-15核酸序列的登录号包括U19843(猕猴);DQ021912(猕猴);AB000555(猕猴);NM_214390(猪);DQ152967(绵羊);NM_174090(牛);NM_008357(鼠);NM_013129(鼠属);DQ083522(水牛);XM_844053(犬);DQ157452(兔形目);和NM_001009207(猫)。示例性非人哺乳动物IL-15氨基酸序列的登录号包括AAB60398(牛);AAY45895(猕猴);NP_999555(猪);NP_776515(牛);AAY83832(水牛);ABB02300(绵羊);XP_849146(犬);NP_001009207(猫);NP_037261(鼠属);和NP_032383(鼠)。与人IL-15(“hIL-15”)相比成熟猕猴IL-15(“cIL-15”)的同一性是96%,而成熟小鼠IL-15(“mIL-15”)和成熟hIL-15的同一性是75%。

[0093] 人IL-15在C42-C88和C35-C85位置含有两个二硫键,前者与IL-2内的C-C同源。在N79和N112处有两个N-连接的糖基化位点(取决于所使用的分析方法,N71可视为第三个糖基化位点)。已经预测成熟的IL-15蛋白在氨基酸残基1至15、18至57、65至78和97至114具有强螺旋矩,支持其4个 α -螺旋束结构(Fehniger等人,Blood97(1)(2001年1月1日))。

[0094] 如先前指示,IL-15和IL-2之间存在联系。基于IL-15和IL-15R α 表达的复杂调节和差异模式,这种受体/配体对的关键体内功能可能与IL-2和IL-2R α 的体内功能不同。IL-15表现出几个关键的非冗余作用,包括其在自然杀伤(NK)细胞、NK-T细胞和肠上皮内淋巴细胞发育和功能中的重要性。由于据报道IL-15在自身免疫过程(例如类风湿性关节炎)和恶性肿瘤(例如T细胞白血病)中起作用,正常IL-15功能的破坏已经与受试者中的不利影响联系起来。

[0095] 虽然两者都经由受体亚基IL-2R β 和普通 γ 链(γ (c))发出信号,但IL-15和IL-2不共享全部相同的生物学功能。在IL-15-IL-15R α -IL-2R β - γ (c)四级复合物的结构中,IL-15结合异二聚体中的IL-2R β 和 γ (c),所述异二聚体类似于IL-2-IL-2R α -IL-2R β - γ (c)复合物的异二聚体。已经显示了IL-15R α 实质性增加IL-15对IL-2R β 的亲合力,这继而是IL-15反式信号传导所必需的。IL-15和IL-2诱导相似的信号,并且已显示IL-2R α 相对于IL-15R α 的特异性确定细胞响应性。(参见Ring等人,Nat.Immunol.13(12):1187-95(2012年12月13日))。

[0096] IL-15主要作为膜结合形式存在,尽管它也作为可溶性分子存在(Jakobisiak等人,Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109(2011年4月)),并且它与两种不同的信号传导机制有关。主要机制是由膜结合复合物IL-15/IL-15R α 介导的反式呈递。在这种信号传导机制中,IL-15结合IL-15R α 受体,随后呈递给在其细胞表面上具有IL-15R β γ c复合物的周围细胞。第二种机制是顺式呈递,其中IL-15由IL-15R α 呈递给同一细胞上的15R β γ c信号传导复合物。参考主要信号传导机制,IL-15与IL-15R α 受体结合后,随后呈现给携带IL-15R β γ c复合物的周围细胞,IL-15 β 亚基激活Janus激酶1(Jak1),并且 γ c亚基激活Janus激酶2(Jak2),其导致信号传导物和转录活化因子3(STAT3)和STAT5的磷酸化和激活。由于IL-15和IL-2共享受体亚基,它们具有相似的下流效应,包括B细胞淋巴瘤(Bcl-2)的诱导;丝裂原活化蛋白激酶(MAP)途径和淋巴细胞激活蛋白磷酸化酪氨酸激酶(Lck)和脾酪氨酸激酶(Syk)的磷酸化,其导致细胞增殖和成熟(Schluns等人,Int J Biochem Cell Biol37(8):1567-71(2005年8月))。

[0097] 相比之下,肥大细胞中的IL-15R信号传导途径包括Jak2和STAT5代替Jak1/3和STAT3/5。磷酸化STAT形成转录因子并激活适当基因的转录。IL-15R的 β 链募集并且还激活Src家族的蛋白酪氨酸激酶,包括Lck、Fyn和Lyn激酶。 β 链也激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和AKT信号传导途径,并诱导各种转录因子的表达,包括c-Fos、c-Jun、c-Myc和NF- κ B(Jakobisiak等人,Cytokine Growth Factor Ref 22(2)99-109(2011年4月))。

[0098] 如先前指示,本公开还考虑结合本文中的教导在体内、体外和离体使用基因疗法。基因疗法通过将通常包装在载体中的遗传物质递送到受试者内的内源细胞来实现,以引入新基因、引入预先存在的基因的额外拷贝、损害现有基因的功能发挥或修复现有的但是不发挥功能的基因。一旦在细胞内,核酸由细胞机器表达,导致产生所关注的蛋白质。在本公开的背景中,基因疗法用作治疗剂以递送编码用于治疗或预防本文中所述的疾病、病症或

病况的IL-15剂的核酸。如本文中所用,基因疗法还描述了从受试者中取出细胞,用编码IL-15的核酸分子转染细胞,并将细胞返回到受试者。

[0099] 如上文提到,对于基因疗法用途和方法,可以用编码如本文中阐述的IL-15相关多肽的核酸在体内转化受试者中的细胞。或者,可以用转基因或多核苷酸在体外转化细胞,然后移植到受试者的组织中以实现治疗。此外,可以用编码IL-15相关多肽的转基因或多核苷酸转化原代细胞分离物或建立的细胞系,然后任选地移植到受试者的组织中。

[0100] 聚乙二醇化IL-15

[0101] 重组人IL-15的用途通常受到其相对短的血清半衰期的限制,这可能是由于例如肾清除或蛋白水解降解。因此,已经探索了各种方法来改善IL-15的药代动力学谱,而不会不利地破坏其结构并因此对活性具有不想要的影响。如在例如CN102145178中报道,IL-15的聚乙二醇化导致某些药代动力学参数(例如,血清半衰期)的改善。然而,CN102145178着重于N-末端的聚乙二醇化。还报道了包含IL-15和Fc的融合分子以改善半衰期(参见例如CN200410067182)。

[0102] 如熟练技术人员将显而易见的是,可以将多于一个聚乙二醇分子可以连接于多于一个氨基酸残基。因此,如本文中所用,术语“聚乙二醇化的IL-15”和“PEG-IL-15”是指具有共价连接到IL-15蛋白的至少一个氨基酸残基(通常通过接头),使得连接稳定的一个或多个聚乙二醇分子的IL-15分子。术语“单聚乙二醇化的IL-15”和“单PEG-IL-15”可用于指示将一个聚乙二醇分子通常通过接头共价连接到IL-15的单个氨基酸残基。术语“二聚乙二醇化的IL-15”和“二-PEG-IL-15”可用于描述IL-15蛋白,其中将一个聚乙二醇分子共价连接到一个氨基酸残基,并且将另一个聚乙二醇分子共价连接到不同的氨基酸残基。例如,一个聚乙二醇分子可以与成熟IL-15的N-末端氨基酸残基共价结合,并且另一个聚乙二醇分子可以与C-末端残基共价连接。还可以产生蛋白质,其中聚乙烯分子共价连接到多于两个氨基酸残基;本领域普通技术人员熟悉产生此类分子的手段。

[0103] 在具体实施方案中,本公开中使用的PEG-IL-15是单PEG-IL-15,其中经由接头将1至9个PEG分子共价连接到N-末端的氨基酸残基的 α 氨基基团或赖氨酸残基侧链上的 ϵ 氨基基团。下文进一步描述了接头。为了在成熟IL-15内通常可能不适于聚乙二醇化的位点实现聚乙二醇化,可以通过引入多于一个突变,然后修饰(即,聚乙二醇化)它们中的每个修饰IL-15上的一个或多个不同位点。在本文中其它地方描述了示例性的聚乙二醇化条件。

[0104] 在具体实施方案中,PEG部分的平均分子量为约5kDa至约50kDa。例如,PEG部分可以具有大于约5kDa、大于约10kDa、大于约15kDa、大于约20kDa、大于约25kDa、大于约30kDa、大于约35kDa,大于约40kDa、大于约45kDa或大于约50kDa的分子量。在一些实施方案中,分子量是约5kDa至约10kDa、约5kDa至约15kDa、约5kDa至约20kDa、约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa或约10kDa至约30kDa。在其它实施方案中,分子量是约15kDa至约20kDa、约15kDa至约25kDa、约15kDa至约30kDa、约15kDa至约35kDa、约15kDa至约40kDa或约15kDa至约45kDa。

[0105] 由于IL-15的大小,在特定实施方案中考虑了大于20kDa的PEG(例如,在20-40kDa范围内)。在一些实施方案中,分子量为约20kDa至约25kDa、约20kDa至约30kDa、约20kDa至约35kDa、约20kDa至约40kDa、约20kDa至约45kDa或约20kDa至约50kDa。在一些另外的实施方案中,分子量是约25kDa至约30kDa、约25kDa至约35kDa、约25kDa至约40kDa、约25kDa至约

45kDa或约25kDa至约50kDa。在其它实施方案中,分子量是约30kDa至约35kDa、约30kDa至约40kDa、约30kDa至约45kDa或约30kDa至约50kDa。在其它实施方案中,分子量是约35kDa至约40kDa、约35kDa至约45kDa、约35kDa至约50kDa、约40kDa至约45kDa、约40kDa至约50kDa或约45kDa至约50kDa。本公开考虑了以5kDa增量具有大于50kDa的分子量(例如,55kDa、60kDa、65kDa等)的PEG。

[0106] 虽然本公开不需要使用将PEG连接到IL-15的特定方法或位点,但聚乙二醇化改善、不改变或仅仅名义上降低IL-15分子的活性通常是有利的。在某些实施方案中,任何半衰期增加的影响都大于生物活性的任何降低的影响。经常通过评估用细菌抗原(脂多糖(LPS))攻击并用PEG-IL-15处理的受试者的血清中的炎性细胞因子(例如IFN- γ)的水平测量PEG-IL-15的生物活性。在本文其它地方描述了用于测量生物活性的其它手段。

[0107] IL-15变体

[0108] IL-15变体可以考虑到各种目标制备,包括在治疗用途期间增加血清半衰期、减少针对IL-15的免疫应答、促进纯化或制备、降低降解、改善治疗功效和减轻副作用的严重性或发生。氨基酸序列变体通常是自然界中未发现的预定变体,尽管有些可能是翻译后变体,例如糖基化变体。可以使用IL-15的任何变体,只要它保持适当水平的IL-15活性。在本文中其它地方描述了IL-15活性(例如,T细胞和天然杀伤(NK)细胞活化和增殖的调节)。

[0109] 短语“保守氨基酸取代”是指通过用具有相似酸度、碱性、电荷、极性 or 侧链尺寸的侧链的氨基酸替换蛋白质中的氨基酸来保持蛋白质的活性的取代。保守氨基酸取代通常需要在以下组内氨基酸残基的取代:1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 和 6) D、E。关于取代、插入或缺失的指导可以基于不同变体蛋白或来自不同物种的蛋白质的氨基酸序列的比对。因此,除了任何天然存在的IL-15多肽之外,本公开考虑具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,通常不超过20、10或5个氨基酸取代,其中取代通常是保守的氨基酸取代。应该注意到,可以将一种或多种非天然氨基酸引入IL-15中作为促进位点特异性缀合的手段。

[0110] 本公开还考虑含有源自成熟IL-15的连续氨基酸残基的成熟IL-15的活性片段(例如亚序列)。肽或多肽亚序列的连续氨基酸残基的长度随衍生亚序列的特定天然存在的氨基酸序列而变化。通常,肽和多肽可以是约20个氨基酸至约40个氨基酸、约41个氨基酸至约50个氨基酸、约51个氨基酸至约60个氨基酸、约61个氨基酸至约70个氨基酸、约71个氨基酸至约80个氨基酸、约81个氨基酸至约90个氨基酸、约91个氨基酸至约100个氨基酸、约101个氨基酸至约105个氨基酸、约106个氨基酸至约110个氨基酸或约111、112或113个氨基酸,直到全长肽或多肽。

[0111] 另外,IL-15多肽可以在定义长度的连续氨基酸(例如“比较窗口”)上与参考序列相比具有定义的序列同一性。用于比较的序列的比对方法是本领域中公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman、Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部同源性算法、通过Needleman&Wunsch、J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同源性比对算法、通过Pearson&Lipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的搜索相似性法、通过这些算法的计算机化执行(Wisconsin Genetics Software Package、Madison、Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA) 或通过手动比对和目视检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编,1995增补)) 进行。

[0112] 举例来说,合适的IL-15多肽可以包含氨基酸序列,其具有与约20个氨基酸至约40个氨基酸、约41个氨基酸至约50个氨基酸、约51个氨基酸至约60个氨基酸、约61个氨基酸至约70个氨基酸、约71个氨基酸至约80个氨基酸、约81个氨基酸至约90个氨基酸、约91个氨基酸至约100个氨基酸、约101个氨基酸至约105个氨基酸、约106个氨基酸至约110个氨基酸或约111、112或113个氨基酸的连续区段,直至全长肽或多肽的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性。

[0113] 如下文进一步讨论,IL-15多肽可以从天然来源(例如,除了其天然存在的环境以外的环境)中分离,并且也可以重组制备(例如,在经遗传修饰的宿主细胞,如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等中),其中用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸修饰经遗传修饰的宿主细胞。也可以合成制备IL-15多肽(例如通过无细胞化学合成)。

[0114] 本公开考虑编码IL-15分子的核酸分子,包括其天然存在和非天然存在的同种型、等位变体和剪接变体。本公开还涵盖在一个或多个碱基中与天然存在的DNA序列存在变化但由于遗传密码的简并性而仍然翻译为对应于IL-15多肽的氨基酸序列的核酸序列。

[0115] IL-15突变体(例如突变蛋白)和经修饰的IL-15分子

[0116] 本公开部分涉及经由对IL-15的诱变和其它修饰来操作蛋白质功能。在一些实施方案中,本公开考虑经修饰的IL-15分子,其中一种或多种有利特征已经被添加到IL-15(在未修饰的IL-15中不存在特征的情况下)和/或得到增强(在未修饰的IL-15中存在特征的情况下,尽管为小于最佳的量)。如下文进一步讨论,可以经由包括例如在人IL-15中产生一系列点突变的合理药物设计方法来鉴定和合成此类分子。可以评估该系列的点突变以确定该系列中成员的特性(例如,功效)的性质和程度。

[0117] 在一些实施方案中,使用点突变促进例如经修饰的IL-15肽的合成,其中肽包含共价或非共价修饰(例如聚乙二醇化、Fc融合和HSA融合)。继而,可以进行经修饰的肽的系统评估,以限定IL-15一级氨基酸序列的位置,其中可以实现修饰,同时a)保留蛋白质生物活性;b)增强某些蛋白质功能;c)降低某些IL-15功能的重要性,同时维持其它功能;或d) a) - c)的某些组合。

[0118] 本文中考虑的合理药物设计方法的一个目标是鉴定可以在不会对生物活性产生有害影响,同时允许添加或增强其它属性的情况下修饰的IL-15的那些氨基酸残基和区域。这些合理的药物设计方法的另一个目标是定义IL-15的氨基酸残基和区域,其中可以使用修饰来选择性地降低某些IL-15功能的功能性,同时保持或增强其它功能。因此,在某些实施方案中,IL-15分子(例如,突变蛋白)或经修饰的IL-15分子突出了IL-15的一种或多种作用,同时降低一种或多种不同的作用的重要性;强调了IL-15的一种或多种作用,同时不影响其它功能(例如维持正常水平的IL-15活性);或降低IL-15的一种或多种作用的重要性,而不影响其它作用。在某些实施方案中,修饰物可以导致生物活性的降低,条件是另一个特征(例如药代动力学参数如半衰期)得到增强,导致修饰的IL-15分子,其从治疗角度看是至少有益的且通常更加有益的。

[0119] 在具体实施方案中,与其肽的未修饰形式相比,本文中所述的修饰改善了肽的至少一种性质或其它特征(例如溶解度)。本公开的其它实施方案涉及用于鉴定可根据本文所述方法修饰的IL-15的特定氨基酸残基或结构域的方法和其它技术。使用(例如,在治疗或预防病症或其症状中)并鉴定和/或产生本文所述的肽的方法也是本公开的方面。在本文中

其它地方讨论此类方面。其它方面包括例如包含肽的药物组合物。

[0120] 尽管已经描述了某些IL-15功能结构域的鉴定和特定类型的IL-15缀合物的产生,但是文献缺乏本文所述的IL-15分子的类型以及用于鉴定和/或产生它们的方法和使用它们的方法的任何公开。

[0121] 在具体实施方案中,本公开考虑产生人IL-15中的一系列点突变和在例如哺乳动物或细菌系统中表达那些突变的IL-15蛋白(例如,突变蛋白)。本公开考虑使用与本文所述的突变体IL-15分子相容的任何表达系统。在具体实施方案中考虑哺乳动物蛋白质表达系统,而在其它实施方案中,候选蛋白质表达系统包括源自细菌(例如大肠杆菌(*E.coli*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)和枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*))、酵母(例如酿酒酵母)和杆状病毒感染的昆虫细胞的蛋白质表达系统。可以使用基于细胞或无细胞的表达系统。在细菌包含体中产生大多数重组细胞因子,然后纯化并重折叠。

[0122] 经常采用细菌细胞表达细胞因子,一种通常涉及蛋白质重折叠的方法。然而,最初使用哺乳动物表达系统以确定突变的蛋白质是否将得到表达是有利的。如果哺乳动物细胞可以表达突变的蛋白质,则蛋白质折叠可能不会被突变破坏。哺乳动物细胞系折叠和分泌突变体分子的能力和作为用于进一步评价的候选物的所述分子的活力之间经常存在密切的关联。相反,如果在细菌中进行初始表达,并且突变的蛋白质不能被正确重折叠,那么不会清楚的是突变是否是破坏性的或蛋白质重折叠方案是否为次最佳的。

[0123] 在表达系统(例如基于哺乳动物细胞系的表达系统)中不显著破坏蛋白质折叠和分泌的突变体IL-15分子可能是用于进一步评价的候选物。例如,可以充分纯化此类突变体IL-15分子,以在一种或多种体内或体外/离体测定法中实现生物活性分析,包括本文所述的CTLL-2细胞增殖测定法。作为进一步的实例,可以在提供IL-15/IL-15结合配偶体亲和力测量的体外测定法中评价此类突变体IL-15分子。此外,已经描述了体内模型并且可以用于本文所述的IL-15分子的评估。

[0124] 在具体实施方案中,通过例如聚乙二醇化修饰突变体IL-15多肽分子(例如,突变蛋白)。然后,可以评估这些经修饰的IL-15分子以确定它们对蛋白质功能的影响。表现出有利特征(例如,对蛋白质功能的名义影响或没有影响)的经修饰的IL-15分子可以是进一步修饰(例如更大或分支的PEG)和评价(例如溶解度)的候选物。在本文其它地方详细描述了聚乙二醇化和其它类型的修饰。

[0125] 此外,本公开考虑使用一种或多种用于测定免疫原性的测定法来评估突变体IL-15肽和经修饰的IL-15肽,如本文所述的体外、离体或计算机免疫原性测定法。表现出特定的有利特征(例如,增强的功效而没有免疫原性的增加,如在计算机中测定)的经修饰的IL-15分子可以是进一步评价的候选物,包括体内免疫原性分析和/或在体内背景中的额外分析。在具体实施方案中,这些经修饰的IL-15分子不比相应的未修饰的IL-15分子更具免疫原性。

[0126] 本文中涵盖其它IL-15分子,包括IL-15片段;包含与异源蛋白质复合的IL-15多肽的分子;以及IL-15融合蛋白,其包含在核酸水平上融合到一种或多种治疗剂(例如,抗炎生物制剂)的IL-15。可以使用本文所述的方法或熟练技术人员已知的任何其它方法修饰此类分子。

[0127] 本公开的合理药物设计方法可以利用来自多个来源的晶体学数据和类似数据。举例来说,描述了与IL-15R α 的寿司结构域复合的IL-15的晶体结构。Olsen等人, J. Biol. Chem. 282 (51): 37191-204 (2007年12月21日)。此外, Pettit等人, J. Biol. Chem. 272: 2312-18 (1997) 描述了使用位点特异性诱变、聚乙二醇缀合和同源性建模的IL-15的结构-功能研究。此类来源中描述的信息和数据虽然本身不足且不完整,但也可以代表可用于鉴定可修饰的IL-15氨基酸残基和结构域的组分。作为利用此类信息和数据的结果,鉴定出突变体IL-15分子(例如,突变蛋白)和经修饰的突变体IL-15分子(以及在一些实施方案中,经修饰的天然hIL-15)为具有本文所述的有利和/或期望的特征。

[0128] 如本文中描述和图3中描绘,成熟的hIL-15包含a) 螺旋A(氨基酸残基1-17); b) A/B螺旋间接合(A/B环)(氨基酸残基18-31); c) 螺旋B(氨基酸残基32-53); d) B/C螺旋间接合(B/C转角)(氨基酸残基54-57); e) 螺旋C(氨基酸残基58-77); f) C/D螺旋间接合(C/D环)(氨基酸残基78-96); 和g) 螺旋D(氨基酸残基97-114)。在一些实施方案中,本公开考虑肽,其包含a) 螺旋A; b) A/B螺旋间接合; c) 螺旋B; d) B/C螺旋间接合; e) 螺旋C; f) C/D螺旋间接合; 和g) 螺旋D; 其中此类肽还包含下列至少一项: i) 除了氨基酸残基2(W)、4-12(NVISDLKKI; SEQ ID NO: 37)或16(I)外的螺旋A的至少一个氨基酸残基的取代;或ii) 除了氨基酸残基30(D)或31(V)外的A/B螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或iii) 除了氨基酸残基32(H)、35(C)、40(M)、42-44(CFL)、47(L)或50(I)外的螺旋B的至少一个氨基酸残基的取代;或iv) B/C螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或v) 除了氨基酸残基59(I)、61-66(DTVENL; SEQ ID NO: 38)或68-70(ILA)外的螺旋C的至少一个氨基酸残基的取代;或vi) 除了氨基酸残基85(C)或88(C)外的C/D螺旋间接合的至少一个氨基酸残基的取代;或vii) 除了氨基酸残基99(F)、100(L)、103(F)或105-112(HIVQMFIN; SEQ ID NO: 39)外的螺旋D的至少一个氨基酸残基的取代。图3中阐述了这些区域的边界。

[0129] 尽管图3中阐述的螺旋和螺旋间接合的边界在本领域中公认为定义那些特定区域,但普通技术人员将认识到,在定义此类区域的特定氨基酸残基中可能存在某些偏差。熟练技术人员在实施本公开时能够考虑到这些偏差。

[0130] 虽然IL-15受体结合和信号传导的机制尚未得到充分的阐明,但已经显示了IL-15在与IL-15R α 的复合物中发挥功能。此复合物与IL-2/IL-15R β 和 γ c协同起作用以实现IL-15信号传导。图4A是人IL-15的蛋白质晶体结构带状表示(俯视图),其中某些螺旋和螺旋间接合是标记的。还描绘了某些IL-15结合配偶体(例如IL-15R α)。图4B是人IL-15的蛋白质晶体结构带状表示(侧视图),其中某些螺旋和螺旋间接合是标记的。还描绘了某些IL-15结合配偶体(例如IL-15R α)。

[0131] 对于修饰(例如聚乙二醇化)可能是较差的候选物的氨基酸残基包括:疏水核心区域中的残基,其可能不能接近修饰;与结合界面接触或极其接近的残基(例如,参与IL-15 β / γ 受体结合的残基);和参与二硫键的半胱氨酸残基,其通常与基于半胱氨酸的聚乙二醇化化学物质不反应(尽管二硫键的半胱氨酸聚乙二醇化已经使用定义的聚乙二醇化条件完成)。相比之下,可能是潜在修饰(例如聚乙二醇化)的良好候选物的氨基酸残基包括不参与蛋白质-蛋白质相互作用的表面暴露的残基或形成螺旋间接合的残基。值得注意的是,当不受IL-15R α 结合时,已经观察到IL-15是构象“塑性”的(Ring等人, Nat. Immunol. 13 (12): 1187-95 (2012年12月13日))。

[0132] 目前存在化学物质用于例如多肽的N-末端、赖氨酸残基、半胱氨酸残基、组氨酸残基、精氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、酪氨酸残基和C-末端的聚乙二醇化。如上文指示,本公开考虑引入非天然氨基酸残基,其继而可以被聚乙二醇化。然而,以位点特异性的方式仅使这些氨基酸残基中的一些常规地聚乙二醇化。其它氨基酸的聚乙二醇化只能在复杂条件下以位点特异性方式实现,而其它氨基酸(如谷氨酸和丝氨酸残基)的聚乙二醇化通常导致太多的位置异构体以致于无用。

[0133] 可能适合于聚乙二醇化的成熟IL-15内可能的残基(例如,组氨酸和苏氨酸)的评估如下:发现N-末端是可用于聚乙二醇化的位点;发现C-末端是可能的可用于聚乙二醇化的位点;赖氨酸(K)-7个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;半胱氨酸(C)-4个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;组氨酸(H)-4个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;天冬氨酸(D)-6个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;谷氨酸(E)-12个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;丝氨酸(S)-13个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点;和苏氨酸(T)-6个残基存在于成熟IL-15中,但发现无一是可用于聚乙二醇化的位点。在一个实施方案中,成熟IL-15中唯一的酪氨酸(Y)残基代表用于聚乙二醇化的可能位点。

[0134] 尽管每个上述残基在合适的条件下可以适合于聚乙二醇化,但从商业角度来看用于聚乙二醇化的实际候选物的残基数目是上文阐述的那些残基的一部分。举例来说,目前基于赖氨酸的聚乙二醇化策略不允许特定赖氨酸(来自野生型IL-15分子内的7个赖氨酸残基之间)的聚乙二醇化而不产生位置异构体。此类位置异构体在治疗剂中通常是不能容忍的。此外,它们经常在制造过程中引入额外的复杂性。最后,如果那些残基与“靶标”残基具有相似的键或环结构,则某些聚乙二醇化策略将导致“非靶标”残基的聚乙二醇化。

[0135] 根据本文所阐述的教导,在成熟IL-15的114氨基酸残基中,预测经由诱变和位点特异性化学的组合修饰氨基酸残基对44个残基是无用(参见图5)。在44个残基中,4个可能参与二硫键。剩余的40个残基可能与受体信号传导复合体接触,被埋在三级IL-15结构的疏水核心区域内,或两者。为了实施本公开,不需要了解IL-15/IL-2受体信号传导复合体的各种组分如何相互作用以及如何实现信号传导。然而,在三个IL-15R亚基(α 、 β 和 γ c)中,认为信号传导包含IL-15与 β 和 γ c亚基的结合。因此,在一些实施方案中,本公开考虑了结合IL-15R α 的IL-15的一个或多个氨基酸残基的聚乙二醇化,因为此类聚乙二醇化应当仅对IL-15信号传导具有名义的影响(如果有的话)。相反,基于本文阐述的教导,预测经由诱变和位点特异性化学的组合修饰氨基酸残基对59个残基是可行的,所述残基可能是表面暴露的并且不整体参与IL-15受体复合物或二硫键键合。认为11个残基具有作为潜在的聚乙二醇化位点的潜力(例如,侧翼有参与受体结合和不参与受体结合的另一个表面暴露的残基的残基),如图5中的“+/-”指示。应当理解,根据所使用的方法和其它参数,熟练技术人员可以得出结论,认为不是潜在的聚乙二醇化位点的一个或多个残基,认为是潜在的聚乙二醇化位点的一个或多个残基和/或认为可能是潜在的聚乙二醇化位点的一个或多个残基可能落入不同的类别(例如,可以推断可能是潜在的聚乙二醇化位点的残基是潜在的聚乙二醇化位点)。

[0136] 如上文阐述,59个氨基酸残基代表潜在容许通过取代将充当PEG锚定的氨基酸的突变的位点。在这59个可能的位点中,由于各种原因,在特定位置消除某些突变体:残基26

(Y)不能突变为酪氨酸,因为人IL-15在该位置已经含有酪氨酸;残基71(N)已经含有N-X-S N-糖基化基序,因此只能引入N-X-T基序;残基79(N)已经含有N-X-T N-糖基化基序,因此只能引入N-X-S基序;并且残基112(N)已经含有N-X-S N-糖基化基序,因此只能引入N-X-T基序。残基113(T)和114(S)分别是倒数第二个残基和最后一个残基,因此不能添加3个氨基酸的N-糖基化基序。由于跨越三个氨基酸的用于N-糖基化位点的基序(N-X-S或N-X-T,其中X $\neq$ P),有时必需使N-糖基化突变侧翼的残基突变;然而,此类突变设计为使得N-糖基化将发生在所关注的特定残基。使用本文所述的方法产生突变体,并在CTLL-2增殖测定法中进行评价以测定生物活性。

[0137] 图6阐述了特定取代的CTLL-2增殖数据。对数据的回顾得出几个一般观察。首先,螺旋之间的环通常是突变的良好位置。然而,A/B环内的一些残基是对于修饰较差的候选物。第二,尽管半胱氨酸突变体通常是非常破坏性的,但仅残基6(I)和70(A)的突变是无活性的。下文阐述了可以为了引入将充当用于聚乙二醇化的位点的氨基酸而做出的精确取代的详细讨论。然而,在保留一些生物活性的情况下,最适合于取代的几个残基总结如下:a)氨基酸残基1(N)的全部四种取代(即酪氨酸(Y)、半胱氨酸(C)、N-X-S和N-X-T)产生活性蛋白,并且可以容易地采用标准N-末端的聚乙二醇化策略;b)氨基酸残基13(E)至15(L)的取代产生有利的结果;c)氨基酸残基17(Q)至23(A)的取代产生有利的结果;d)氨基酸残基48(Q)、49(V)、51(S)至58(S)和60(H)的取代产生活性蛋白;e)氨基酸残基71(N)至84(G)产生有利的结果,除了在该13个残基跨度间的两个突变外;f)氨基酸残基89(E)至98(E)的取代产生有利的结果;以及g)在C-末端的氨基酸残基113(T)和114(S)产生有利的结果,并且可以容易地采用标准的C-末端的聚乙二醇化策略。

[0138] 本公开的一些实施方案考虑在至少一个以下区域中包含至少一个氨基酸取代的肽:17-28、36-38、51-57、71-84或89-98。在其它实施方案中,肽包含至少在以下位置之一的至少一个氨基酸取代:1、17-28、36-38、41、45、46、48、49、51-57、60、67、71-84、86、87、89-98、101、113或114。在另外的实施方案中,肽包含至少在以下位置之一的至少一个氨基酸取代:1、3、13-15、17-29、33、34、36-39、41、45、46、48、49、51-58、60、67、71-84、86、87、89-98、101、102、104、113或114。

[0139] 鉴定表明生物活性的突变体

[0140] 使用本文所述的方法,进行评估以确定成熟人IL-15蛋白的114个氨基酸残基中的哪个将容许用有助于形成PEG部分的锚定位点的残基的取代。进一步分析使用此评估鉴定的残基,以确定取代是否会导致展现出生物活性的突变体(突变蛋白)。熟练技术人员将认识到,并非所有在体外测定法中有活性的突变体都将在体内环境中具有活性,反之亦然。

[0141] 如上文和在图5中指示,114个残基的成熟人IL-15多肽的44个氨基酸残基(由“-”表示)不是用于聚乙二醇化的候选物。这44个残基中的4个是形成二硫键的半胱氨酸(残基35 $\rightarrow$ 85和残基42 $\rightarrow$ 88),因此不可用于突变。剩余的40个残基可能与受体信号传导复合体接触,被埋在三级IL-15结构的疏水核心区域内,或两者。因此,70个残基(在图5中,其中59个与“+”相关,并且其中11个与“+/-”相关)代表可以容许突变的位点,所述突变通过将充当PEG的锚定的氨基酸的取代进行。然后,使用如本文所述的CTLL-2细胞增殖测定法评估这些潜在位点的突变。

[0142] 评估结果总结在图6A-6B中。图6A-6B的第一行定义了IL-15的每个区域的边界:a)

螺旋A;b) A/B环(即A/B螺旋间接合);c) 螺旋B;d) B/C转角(即B/C螺旋间接合);e) 螺旋C;f) CD环(即C/D螺旋间接合);和g) 螺旋D。第二行阐述了114个残基的成熟IL-15多肽的每个氨基酸残基。图6的下四行涉及在每个残基处引入的突变类型:半胱氨酸、酪氨酸和N-X-S和N-X-T N-糖基化基序。

[0143] 参考图6A-6B中的阴影法,除了下面描述的具有“x”的深灰色框之外,深灰色框中的残基既不突变也不是分析的一部分,因为认为它们不是用于引入可充当PEG锚定的氨基酸的良好候选物;如上文指示,此类残基可能与受体信号传导复合物接触,被埋在三级IL-15结构的疏水核心区域内,或两者。然而,应当注意,这些残基中的一些在引入N-糖基化位点的情况下是突变的。浅灰色框中剩余的70个残基表示更可能在同二聚体上表面暴露,并且不太可能干扰受体结合的残基。应当理解,熟练技术人员可以得出结论,可以不同地分类一个或多个残基(即,可以将深灰色框中的残基置于浅灰色框中)。

[0144] 使用本文所述的方法产生突变体(例如半胱氨酸或酪氨酸),并且在实验部分中描述并且与Soman等人(J Immunol Methods348(1-2):83-94(2009年8月31日))描述的测定法基本相似的CTLL-2细胞增殖测定法中评估它们的生物活性。如果突变体得到表达并表现出生物活性,则将“+”置于适用的盒中(例如,提到氨基酸残基41,酪氨酸突变体表现出活性,而半胱氨酸突变体不然)。为评估目的,测量任何生物活性导致“+”符号的分配。在没有“+”的浅灰色框(即,空白灰色框)中的突变体指示突变体不表达或在CTLL-2测定法中无活性。

[0145] 在图6A-6B中与特定氨基酸残基相关的一些浅灰色列中,一些框(浅灰色)可以是空白的或含有“+”,而其它框是深灰色并含有“x”。在这些情况下,由于各种原因,不能突变深灰色的“x”盒。不能将残基26(Y)突变为酪氨酸,因为人IL-15在该位置已经含有酪氨酸。对于残基71(N),不能引入N-X-S N-糖基化基序,因为蛋白已经含有N-X-S N-糖基化基序。对于残基79(N),不能引入N-X-T N-糖基化基序,因为蛋白质已经含有N-X-T N-糖基化基序。对于残基113(T),由于N-糖基化基序长三个氨基酸(N-X-S或N-X-T),不能在蛋白质的倒数第二个残基引入N-糖基化位点。对于残基114(S),由于N-糖基化基序长三个氨基酸,不能在蛋白质的最后一个残基处引入N-糖基化位点。

[0146] 鉴于图6A-6B中描绘并在本文中别处描述的教导,熟练技术人员将认识到以下内容:1)存在有70个潜在残基,其中为了锚定PEG部分的目的,可以引入突变(即,存在有70个浅灰色列)。2)在70个潜在残基中,进一步的评估指示69个残基拥有使其成为锚定PEG部分的可行候选物的性质,因为残基46(E)不产生具有任何测试突变的活性蛋白质。3)除了已经是酪氨酸的残基26外,可以用酪氨酸取代69个残基中的每个,并产生生物活性蛋白。4)除了残基26(Y)、41(K)、57(A)和71(N)之外,可以用半胱氨酸取代69个残基中的每个,并产生生物活性蛋白。5)除了3(V)、23(A)至26(Y)、33(P)、37(V)至39(A)、41(K)、45(L)、67(I)、83(S)、86(K)和101(Q)外,可以在69个残基中的每个产生N-X-S糖基化基序,并产生生物活性蛋白。残基113(T)和114(S)不能容纳糖基化位点,因为如上文指示,它们代表天然人IL-15的最后两个残基。残基71(N)已经表示N-X-S糖基化基序的天冬酰胺。6)除残基3(V)、23(A)至28(E)、33(P)、37(V)至39(A)、41(K)、45(L)、67(I)、83(S)、86(K)、101(Q)和104(V)以外,可以在69个残基中的每个产生N-X-T糖基化基序。残基113(T)和114(S)不能容纳糖基化位点,因为如上文指示,它们代表天然人IL-15的最后两个残基。残基79(N)已经表示N-X-T糖基化基序的天冬酰胺。

[0147] IL-15的经修饰的形式的免疫原性考虑

[0148] 免疫原性(抗原在受试者中引发体液(B细胞)和/或细胞介导的(T细胞)免疫应答的能力)可被归类为“期望的”或“不期望的”。期望的免疫原性通常是指通过疫苗注射引起的受试者针对病原体(例如病毒或细菌)引发的免疫应答。在这种情况下,免疫应答是有利的。相反地,不期望的免疫原性通常是指受试者针对如治疗性蛋白质(例如IL-15)等抗原而引发的免疫应答;免疫应答可以例如导致不利影响治疗性蛋白质的有效性或其药代动力学参数的抗药物抗体(ADA),和/或有助于其它不良反应。在这种情况下,免疫反应是不利的。

[0149] 存在有影响受试者对蛋白质治疗剂的免疫反应的许多受试者特异性和产品特异性因素。受试者特异性因素包括受试者的免疫状态和能力;在先致敏/变态反应史;施用途径;施用的剂量和频率;受试者的遗传状况;受试者对内源蛋白的免疫耐受性状态。影响免疫原性的产品特异性因素包括产品起源(外源或内源);产品的主要分子结构/翻译后修饰、三级和四级结构等;产物聚集体的存在;缀合/修饰(例如糖基化和聚乙二醇化);具有佐剂活性的杂质;产品的免疫调节特性;以及配制剂。

[0150] 已证明自体或人样的多肽治疗剂令人惊讶地在某些应用中是免疫原性的,并且在其它应用中令人惊讶地是非免疫原性的。特定的IL-15突变蛋白和IL-15的其它修饰形式(例如,聚乙二醇化的IL-15和IL和IL-15结构域)可能引起大量的体液和细胞介导的免疫应答。如本文进一步讨论,T细胞表位和/或B细胞表位的除去或修饰可以降低免疫原性。实际上,在某些情况下,一个或多个氨基酸残基与“掩蔽剂”(例如,PEG)的缀合和/或对氨基酸残基本身的变化(例如通过取代)可以显著降低否则高度免疫原性蛋白质的免疫原性。

[0151] T细胞表位。如下面进一步讨论,与经常依赖于二级和三级蛋白质结构的复杂三维B细胞表位相反,CD4+T细胞表位是长度通常范围从约11至约20个氨基酸残基的线性肽序列。存在临床免疫原性数据的一系列蛋白质的比较分析显示T细胞表位的存在和效力与相应蛋白质的免疫原性之间的强关系。

[0152] 计算机筛选工具经常用作综合T细胞表位评估的初始步骤。对肽的辅助CD4+T细胞应答的诱导需要肽结合MHC II类。可以在治疗性蛋白质的开发过程中利用这种肽结合数据的分析。举例而言,Antitope Ltd (Cambridge,UK)具有专有的计算机分子建模技术(iTope™),其可以对肽与34种MHC II类等位基因的结合建模。可以为每种等位基因确定单个氨基酸残基对肽结合的贡献,然后在“去免疫”序列变体的设计中使用这些数据,其中突变T细胞表位以破坏结合。

[0153] 此外,用于鉴定T细胞表位的“免疫信息学”算法和其它技术可用于将蛋白质治疗剂分类为较高风险和较低风险的类别。为了阐明,可以将蛋白质序列解析为重叠的9聚体肽框,然后评估对“覆盖”大多数人的遗传背景的8种常见II类HLA等位基因中的每个的结合潜力。通过计算蛋白质内高得分框的密度,可以估计蛋白质的总体“免疫原性评分”。此外,可以鉴定密集堆积、高评分框的亚区域或潜在免疫原性的“簇”,并且可以计算和编译簇得分。然后,可以使用蛋白质的“免疫原性得分”以及免疫原性的其它决定因素测定蛋白质将会引发免疫应答的可能性。

[0154] 可以采用降低治疗性蛋白质免疫原性的其它方法。技术(例如Antitope的专有EpiScreen™人离体T细胞测定系统)可用于测定辅助CD4+T细胞对蛋白质、肽、配制剂等应答。从使用这些技术产生的数据可用于在起始蛋白的序列内定位辅助CD4+T细胞表位,然后

通过以下一项或多项从蛋白质中除去T细胞表位：设计突变以减少/消除与人MHC II类的结合；靶向T细胞受体接触残基以破坏肽/MHC II类复合物的识别；进行结构和同源性分析以指导关键氨基酸残基的靶向和取代，以便保持期望的蛋白质活性；以及基于效力优先化T细胞表位以除去。

[0155] B细胞表位。可以将B细胞表位置于两种类别之一。在第一类中，表位由蛋白质的特定区域的一级氨基酸序列定义，并且表位的组分依次位于蛋白质上。这些线性B细胞表位的长度通常为约5至约20个氨基酸残基。在第二类中，表位由蛋白质的构象结构定义，并且表位的组分位于蛋白质的不同部分中，所述部分在天然蛋白质的折叠的二级或三级结构中彼此接近。因为大多数B细胞表位是基于蛋白质的构象结构，所以B细胞表位比T细胞表位（其由它们的一级氨基酸序列确定）更难以鉴定。

[0156] 先前使用的基于序列的B细胞表位预测器的实例包括由Saha S和Raghava GP (“ABCPred技术”) (Proteins (2006) 65:40-48)；Chen等人 (Amino Acids (2007) 33:423-28)；El-Manzalawy Y等人 (“BCPred”技术) (J Mol Recognit (2008) 21:243-55)；Sweredoski MJ和Baldi P (“COBEpro”技术) (Protein Eng Des Sel (2009) 22:113-20)；Wee LJ等人 (“BayesB”技术) (BMC Genomics (2010) 11:S21)；以及Ansari HR和Raghava GP (“CBTOPE”技术) (Immunome Res (2010) 6:6) 描述的技术。

[0157] 使用支持向量机工具 (“BEST”) 的B细胞表位预测是一种有希望的新型B细胞表位技术 (Gao J等人 (2012) PLoS ONE 7 (6) :e40104. doi:10.1371/journal.pone.0040104)。与仅从短序列片段预测的许多先前的方法相反，BEST方法从抗原序列预测表位，通过支持向量机 (SVM) 使用基于从滑动20聚体产生的平均选定得分进行。SVM预测器利用通过组合源自链的信息、序列保守、与已知 (训练) 表位的相似性和预测的二级结构和相对溶剂可及性产生的综合和定制设计的一组输入。此外，几个商业实体利用专有技术来评估B细胞表位 (例如ProImmune的B细胞ELISpot技术；ProImmune Ltd.; Oxford, UK)。

[0158] 为了评估免疫原性，着重于潜在的T细胞表位是有用的，所述T细胞表位通常虽然不总是驱动抗原特异性B细胞应答。

[0159] IL-15的生产方法

[0160] 可以通过任何合适的方法产生本公开的多肽，所述方法包括非重组 (例如，化学合成) 和重组方法。

[0161] 化学合成

[0162] 在化学合成多肽的情况下，可以经由液相或固相进行合成。固相肽合成 (SPPS) 允许引入非天然氨基酸和/或肽/蛋白质主链修饰。各种形式的SPPS，如9-苄基甲氧基羰基 (Fmoc) 和叔丁氧基羰基 (Boc) 可用于合成本公开的多肽。化学合成的详情是本领域中已知的 (例如，Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10；和Camarero J.A. 等人 (2005) Protein Pept Lett. 12:723-8)。

[0163] 如下文描述，可以进行固相肽合成。 α 功能 (Na) 和任何反应性侧链均受酸不稳定或碱不稳定基团的保护。保护基在连接酰胺键的条件下是稳定的，但是可以容易地切割而不损害已经形成的肽链。适用于 α -氨基功能的保护基包括但不限于下列各项：Boc、苄氧基羰基 (Z)、0-氯苄氧基羰基、双苄基异丙氧基羰基、叔戊氧基羰基 (Amoc)、 α , α -二甲基-3, 5-二甲氧基-苄基氧基羰基、邻-硝基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧-羰基、Fmoc、1-(4, 4-二甲基-2, 6-

二氧化环亚己-1-基)乙基(Dde),等等。

[0164] 合适的侧链保护基包括但不限于:乙酰基、烯丙基(A11)、烯丙基氧基羰基(Alloc)、苄基(Bzl)、苄基氧基羰基(Z)、叔丁基氧基羰基(Boc)、苄基氧基甲基(Bom)、邻-溴苄基氧基羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基甲硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄基氧基羰基、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化环亚己-1-基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苄基磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、新戊酰基、四氢吡喃-2-基,甲苯磺酰基(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基甲硅烷基和三苯甲基(Trt)。在固相合成中,将C-末端氨基酸与合适的支持物材料缀合。合适的支持物材料是对用于合成过程的逐步缩合和切割反应的试剂和反应条件是惰性的并且不溶于所用反应介质的那些材料。可商购的支持物材料的实例包括已经用反应性基团和/或聚乙二醇改性的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;氯甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;羟甲基化或氨甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物等。

[0165] 当期望制备肽酸时,可以使用用4-苄基氧基苄基醇(Wang-锚定)或2-氯三苯甲基氯化物衍生化的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苯氧基)戊酸(PAL-锚定)或对-(2,4-二甲氧基苯基-氨基甲基)-苯氧基基团(Rink酰胺锚定)衍生化的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。

[0166] 通过在室温或升高的温度(例如,40℃至60℃)在乙醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似溶剂中加入活化剂使C-末端Fmoc-保护的氨基酸与支持物材料起反应并且例如以2至72小时反应时间实现与聚合支持物的连接。

[0167] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚定的缀合可以例如在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑存在或不存在下借助缀合试剂,如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或其它碳二亚胺、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)或其它脲盐、O-酰基脲、苯并三唑-1-基-三-吡咯烷基-六氟磷酸磷(PyBOP)或其它磷盐、N-羟基琥珀酰亚胺、其它N-羟基酰亚胺或酐,例如借助于TBTU通过加入HOBt,在添加或不添加碱,如例如二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉,例如二异丙基乙胺的情况下,以反应时间2至72小时(例如3小时,在1.5至3倍过量的氨基酸和缀合试剂中,例如以2倍过量和约10℃至50℃之间的温度,例如在溶剂如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,例如二甲基甲酰胺中25℃)进行。

[0168] 也可以在上文描述的条件下使用活性酯(例如五氟苯基、对硝基苯基等),Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐、其酰基氯或酰基氟代替缀合试剂。

[0169] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)可通过加入DIEA与二氯甲烷中的2-氯三苯甲基树脂缀合,反应时间为10至120分钟,例如20分钟,但不限于使用此溶剂和此碱。

[0170] 受保护的氨基酸的连续缀合可以根据肽合成中的常规方法进行,通常在自动肽合成仪中进行。在通过用例如二甲基甲酰胺中的哌啶(10%至50%)处理5至20分钟,例如,用DMF中的50%哌啶的2x 2分钟和用DMF中的20%哌啶的1x 15分钟切割固相上的缀合氨基酸的Na-Fmoc保护基后,将3至10倍过量,例如10倍过量的接着的受保护的氨基酸与惰性非水性极性溶剂,如二氯甲烷、DMF或两种的混合物中的先前的氨基酸并且在约10℃至50℃的温度,例如在25℃缀合。先前提及的用于将第一Na-Fmoc氨基酸缀合到PAL,Wang或Rink锚定的

试剂适合作为缀合试剂。也可以使用受保护的氨基酸的活性酯,或其氯化物或氟化物或其对称酸酐作为备选。

[0171] 在固相合成结束时,从支持物材料中切割肽,同时切断侧链保护基。可以用三氟乙酸或其它强酸性介质进行切割,加入5%-20%V/V的清除剂如二甲基硫醚、乙基甲基硫醚、苯甲硫醚、硫代甲酚、间甲酚、苯甲醚乙二硫醇、酚或水,例如15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲酚1:1:1,在0.5至3小时内,例如2小时。通过用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6切割2-氯三苯甲基锚定得到具有完全保护的侧链的肽。可以通过硅胶上的层析纯化受保护的肽。如果通过Wang锚将肽连接到固相,并且如果意图获得具有C-末端烷基酰胺化的肽,则可以用烷基胺或氟代烷基胺进行氨解来进行切割。氨解在约-10℃至50℃(例如约25℃)之间的温度下进行,并且反应时间在约12至24小时(例如约18小时)。此外,可以通过例如用甲醇再酯化从支持物切割肽。

[0172] 可以将获得的酸性溶液与3至20倍量的冷乙醚或正己烷(例如10倍过量的乙醚)混合,以便使肽沉淀,因此分离仍然在乙醚中的清除剂和切割的保护基团。可以通过从冰醋酸将肽再沉淀数次进行进一步纯化。可以将获得的沉淀物溶于水或叔丁醇或两种溶剂的混合物,例如叔丁醇/水的1:1混合物中,并冷冻干燥。

[0173] 可以通过各种层析法纯化获得的肽,包括以乙酸形式在弱碱性树脂上的离子交换;非衍生化的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物(例如,Amberlite®XAD)上的疏水吸附层析;硅胶上的吸附层析;离子交换层析,例如在羧甲基纤维素上;分配层析,例如,在Sephadex®G-25上;反流分配层析;或高压液相层析(HPLC),例如在辛基或十八烷基甲硅烷基二氧化硅(ODS)相上的反相HPLC。

[0174] 重组生产

[0175] 可以使用本领域中已知的标准技术,如本文所述的那些技术,以多种方式合成IL-15(例如鼠和人IL-15)。IL-15可为病毒来源,Moore等人,(1990)Science 248:1230中公开了来自埃巴病毒的病毒IL-15(BCRF1蛋白)的克隆和表达。此外,重组IL-15可以从许多来源商购(例如Life Technologies,Grand Island,NY和BioLegend, San Diego,CA)。

[0176] 可以使用位点特异性诱变(也称为定点诱变和寡核苷酸定向诱变)来产生DNA中的特定突变以产生具有改善或期望的性质的本公开的合理设计的蛋白质(例如,特定的IL-15突变蛋白和其它修饰形式的IL-15,包括其结构域)。用于位点特异性诱变的技术是本领域中公知的。早期的位点特异性诱变方法(例如Kunkel方法;盒式诱变;PCR定点诱变;和全质粒诱变,包括SPRINP)已被更精确且有效的方法替换,如各种体内方法,包括Delitto perfetto(参见Storici F.and Resnick MA,(2006)Methods in Enzymology 409:329-45);置换型“突进突出”(“pop-in pop-out”);用PCR和一个可循环标志物的直接基因缺失和位点特异性诱变;使用长同源区域用PCR和一个可循环标志物的直接基因缺失和位点特异性诱变;以及用合成寡核苷酸进行体内定点诱变(参见例如于Vitro Mutagenesis Protocols(Methods in Molecular Biology),第2版ISBN 978-0896039100)。此外,用于实现位点特异性诱变的工具是可商购的(例如Stratagene Corp.,La Jolla,CA)。

[0177] 在使用重组技术产生多肽的情况下,可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞作为细胞内蛋白或分泌性蛋白产生多肽,所述宿主细胞可以分别是原核或真核细胞,如细菌(例如,大肠杆菌)或酵母宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞的其它实例包括

昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,它们可以包括人细胞(例如HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如,NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类细胞(例如Cos 1、Cos 7和CV1);和仓鼠细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0178] 可以根据本领域中已知的标准方法使用适合于多肽表达的多种宿主载体系统。参见例如Sambrook等人,1989Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York;及Ausubel等人1995Current Protocols in Molecular Biology, Wiley和Sons编。用于将遗传物质导入宿主细胞中的方法包括例如转化、电穿孔、接合、磷酸钙方法等。可以选择用于转移的方法,以提供导入的多肽编码核酸的稳定表达。编码多肽的核酸可以作为可遗传的附加体元件(例如,质粒)提供,或可以是基因组整合的。用于生产所关注多肽的多种合适的载体是可商购的。

[0179] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维持,或可以提供对宿主细胞基因组的整合。表达载体提供转录和翻译调控序列,并且可以提供诱导型或组成性表达,其中编码区在转录启动区,以及转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接。通常,转录和翻译调节序列可以包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列,以及增强子或活化因子序列。启动子可以是组成性或诱导型,并且可以是强的组成性启动子(例如T7)。

[0180] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点,以提供编码所关注蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中操作的选择标志物,以便于选择含有载体的细胞。此外,表达构建体可以包括额外的元素。例如,表达载体可以具有一个或两个复制系统,因此允许其保持在生物体中,例如在哺乳动物或昆虫细胞中用于表达和在原核宿主中用于克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有选择标志物基因以允许选择经转化的宿主细胞。可选择的基因是本领域中公知的,并且将随所用的宿主细胞而变化。

[0181] 可以根据本领域已知的方法实现蛋白质的分离和纯化。例如,可以从遗传修饰为组成性和/或在诱导时表达蛋白质的细胞的裂解物中,或从合成反应混合物中通过免疫亲和纯化分离出蛋白质,所述免疫亲和纯化通常包括使样品与抗蛋白质抗体接触,清洗以除去非特异性结合的材料,并且洗脱特异性结合的蛋白质。可以通过透析和通常用于蛋白质纯化的其它方法进一步纯化分离的蛋白质。在一个实施方案中,可以使用金属螯合层析法分离蛋白质。蛋白质可含有修饰以促进分离。

[0182] 可以以基本上纯的或分离的形式(例如,不含其它多肽)制备多肽。多肽可以存在于相对于可能存在的其它成分(例如其它多肽或其它宿主细胞成分)富集多肽的组合物中。例如,可以提供纯化的多肽,使得多肽存在于基本上不含其它表达蛋白质的组合物中,例如小于约90%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或小于约1%。

[0183] 可以使用重组技术产生IL-15多肽来操作本领域已知的不同的IL-15相关核酸以提供能够编码IL-15多肽的构建体。应当理解,当提供特定的氨基酸序列时,普通熟练技术人员鉴于她在例如分子生物学方面的背景和经验将认识到编码此类氨基酸序列的多种不同核酸分子。

[0184] 酰胺键取代

[0185] 在一些情况下,IL-15包含除肽键之外的一种或多种键,例如至少两个相邻的氨基

酸通过除酰胺键之外的键连接。例如,为了减少或消除不期望的蛋白水解或其它降解手段,和/或提高血清稳定性,和/或限制或增加构象柔性,可以取代IL-15骨架内的一个或多个酰胺键。

[0186] 在另一个实例中,IL-15中的一个或多个酰胺键(-CO-NH-)可以用作为酰胺键的电子等排体的键替换,如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH- (顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-。IL-15中的一个或多个酰胺键也可以用例如还原的电子等排体假肽键替换。参见Couder等人(1993) Int.J.Peptide Protein Res.41:181-184。此类替换以及如何实现它们是本领域普通技术人员已知的。

[0187] 氨基酸取代

[0188] 可以在IL-15多肽中进行一个或多个氨基酸取代。以下是非限制性实例:

[0189] a) 取代烷基取代的疏水性氨基酸,包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸, (S)-2-氨基丁酸、(S)-环己基丙氨酸或由C₁-C₁₀碳的脂肪族侧链取代的其它简单的 α -氨基酸,包括支链、环状和直链烷基、烯基或炔基取代;

[0190] b) 取代芳香族取代的疏水性氨基酸,包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、联苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩丙氨酸、3-苯并噻吩丙氨酸、组氨酸,包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤代(氟、氯、溴或碘)或烷氧基(C₁-C₄)-取代形式的上文列出的芳香族氨基酸,其示例性实例是:2-、3-或4-氨基苯丙氨酸、2-、3-或4-氯苯丙氨酸、2-、3-或4-甲基苯丙氨酸、2-、3-或4-甲氧基苯丙氨酸、5-氨基-、5-氯-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸、2'-、3'-或4'-氨基-、2'-、3'-或4'-氯-、2、3或4-联苯基丙氨酸、2'-、3'-或4'-甲基-、2-、3-或4-联苯基丙氨酸,以及2-或3-吡啶基丙氨酸;

[0191] c) 取代含有碱性侧链的氨基酸,包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙氨酸、高精氨酸,包括先前氨基酸的烷基、烯基或芳基取代的(C₁-C₁₀支链、直链或环状)衍生物,无论取代基是在杂原子(如 α 氮,或一个或多个远端氮)上,或在 α 碳上,例如在前-R位上。充当阐述性实例的化合物包括:N- ϵ -异丙基赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N- γ , γ' -二乙基-高精氨酸。还包括化合物,如 α -甲基-精氨酸、 α -甲基-2,3-二氨基丙氨酸、 α -甲基-组氨酸、 α -甲基-鸟氨酸,其中烷基占据 α -碳的前R位。还包括由烷基、芳香族、杂芳香族(其中杂芳香族基团单独或组合具有一个或多个氮、氧或硫原子)、羧酸或许多公知的活化衍生物如酰基氯、活性酯、活性杂环酰胺(azolides)和相关衍生物以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙氨酸中的任一种形成的酰胺;

[0192] d) 取代酸性氨基酸,包括天冬氨酸、谷氨酸、高谷氨酸、酪氨酸、2,4-二氨基丙氨酸的烷基、芳基、芳烷基和杂芳基磺酰胺、鸟氨酸或赖氨酸和四唑取代的烷基氨基酸;

[0193] e) 取代侧链酰胺残基,包括天冬酰胺、谷氨酰胺和天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳香族取代的衍生物;和

[0194] f) 取代含羟基的氨基酸,包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙氨酸和丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳香族取代的衍生物。

[0195] 在某些实施方案中,IL-15包含一种或多种天然存在的非遗传编码的L-氨基酸、合成的L-氨基酸或氨基酸的D-对映异构体。在一些实施方案中,IL-15仅包含D-氨基酸。例如,IL-15多肽可以包含一个或多个以下残基:羟脯氨酸、 β -丙氨酸、邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基甲基苯甲酸、2,3-二氨基丙氨酸、 α -氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌

氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸3-苯并噻吩丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉胺、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、 β -2-噻吩丙氨酸、甲硫氨酸亚砷、高精氨酸、N-乙酰赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、 p -氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、 ϵ -氨基己酸、 ω -氨基己酸、 ω -氨基庚酸、 ω -氨基辛酸、 ω -氨基十二烷酸、 ω -氨基十四烷酸、环己基丙氨酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、 δ -氨基戊酸和2,3-二氨基丁酸。

[0196] 另外的修饰

[0197] 可以将半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物引入IL-15多肽中提供经由二硫键与另一个肽的连接或提供IL-15多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法是本领域已知的(参见例如美国专利号8,067,532)。其它环化手段包括引入肽接头或羊毛硫氨酸接头;参见例如美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的氨基酸(或非氨基酸部分)的任意组合。可以用氨基酸(或氨基酸和 $-(CH_2)_n-CO-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$)与允许引入桥的官能团的任意组合产生环化键。一些实例是二硫化物、二硫化物模拟物,如 $-(CH_2)_n$ -碳桥、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)和含有酯和醚的桥。在这些实例中, n 可以是任何整数,但是通常小于10。

[0198] 其它修饰包括例如N-烷基(或芳基)取代($\psi[CONR]$)或主链交联以构建内酰胺和其它环状结构。其它衍生物包括C-末端羟甲基衍生物, α -修饰的衍生物(例如C-末端羟甲基苄基醚)、N-末端修饰的衍生物,包括取代的酰胺,如烷基酰胺和酰肼。

[0199] 在一些情况下,用一种或多种D-氨基酸取代IL-15多肽中的一种或多种L-氨基酸。

[0200] 在一些情况下,IL-15多肽是颠倒位(retroinverso)类似物(参见例如Sela和Zisman(1997)FASEB J.11:449)。颠倒位肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向为反向(反),并且其中一个或多个氨基酸的手性D-或L-是倒置的(倒位),例如使用D-氨基酸而不是L-氨基酸。[参见例如Jameson等人(1994)Nature368:744;及Brady等人(1994)Nature 368:692]。

[0201] IL-15多肽可以包括“蛋白转导结构域”(PTD),其指促进穿过脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或有机或无机分子。连接到另一个分子的PTD有助于分子穿过膜,例如从细胞外空间到细胞内空间或胞质溶胶到细胞器内。在一些实施方案中,PTD与IL-15多肽的氨基末端共价连接,而在其它实施方案中,PTD与IL-15多肽的羧基末端共价连接。示例性的蛋白质转导结构域包括但不限于最小的十一肽蛋白转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR的HIV-1TAT的残基47-57;SEQ ID NO:11);包含足以直接进入细胞中的精氨酸残基数目(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等人(2002)Cancer Gene Ther.9(6):489-96);果蝇Antennapedia蛋白转导结构域(Noguchi等人(2003)Diabetes 52(7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等人(2004)Pharm.Research21:1248-1256);多赖氨酸(Wender等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR(SEQ ID NO:7);转运蛋白GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:8);KALAWKALAKALAKALAKHLAKALAKKCEA(SEQ ID NO:9);和RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:10)。示例性PTD包括但不限于YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:11)、RKRRQRRR(SEQ ID NO:12);3个精氨酸残基至50个精氨酸残

基的氨基酸均聚物；示例性的PTD结构域氨基酸序列包括但不限于以下任何一种：YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:13)；RKKRRQRR (SEQ ID NO:14)；YARAAARQARA (SEQ ID NO:15)；THRLPRRRRRR (SEQ ID NO:16)；和GGRRARRRRRR (SEQ ID NO:17)。

[0202] IL-15多肽的C-末端末端的氨基酸的羧基COR₃以游离形式(R₃=OH)或以生理学容许的碱性或碱土金属盐(例如,钠、钾或钙盐)的形式存在。羧基也可以用伯、仲或叔醇,如例如甲醇、支链或非支链的C₁-C₆烷基醇,例如乙醇或叔丁醇进行酯化。羧基也可以用伯胺或仲胺,如氨、支链或非支链C₁-C₆烷基胺或C₁-C₆二烷基胺,如甲胺或二甲胺进行酰胺化。

[0203] IL-15多肽的N-末端的氨基酸NR₁R₂的氨基以游离形式存在(R₁=H和R₂=H)或以生理学容许的盐(如例如氯化物或乙酸盐)的形式存在。氨基也可以用酸乙酰化,使得R₁=H和R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以以通过通常用于肽化学中的氨基保护基,如上文提供的那些(例如Fmoc、苄氧基-羰基(Z)、Boc和Alloc)保护的形式存在。氨基可以是N-烷基化的,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烯基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链、支链或环状的(例如分别是乙基、异丙基和环己基)。

[0204] 增强和/或模拟IL-15功能的特定修饰

[0205] 改善本文公开的治疗方式(例如IL-15突变蛋白)的一种或多种物理性质和/或施用它们的方式通常是有益的,有时是必要的。物理性质的改善包括例如调节免疫原性;增加水溶性、生物利用度、血清半衰期和/或治疗半衰期;和/或调节生物活性的方法。某些修饰也可用于例如产生用于检测测定法(例如,表位标签)的抗体并提供蛋白质纯化的容易性。通常必须赋予此类改善,而不会不利影响(或名义上影响)治疗方式的生物活性和/或增加其免疫原性。

[0206] IL-15的聚乙二醇化是本公开考虑的一个具体修饰,而其它修饰包括但不限于糖基化(N和O连接);聚唾液酸化;包含血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白或牛血清白蛋白(BSA))的白蛋白融合分子;通过例如缀合的脂肪酸链的白蛋白结合(酰化);和Fc-融合蛋白。此外,PEG模拟物代表本文考虑的其它药物。

[0207] **聚乙二醇化**:蛋白质治疗剂的临床有效性通常受到短血浆半衰期和对蛋白酶降解的易感性的限制。各种治疗性蛋白质的研究已经显示了,可以通过各种修饰来克服此类困难,所述修饰包括将多肽序列与多种非蛋白性聚合物中的任一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯缀合或连接。这通常通过与蛋白质和非蛋白质聚合物(例如PEG)共价结合的连接部分来实现。已经显示了此类PEG缀合的生物分子拥有临床上有用的性质,包括更好的物理和热稳定性、针对对酶降解的易感性的保护、增加的溶解性、更长的体内循环半衰期和降低的清除、降低的免疫原性和抗原性以及降低的毒性。

[0208] 适合于与多肽序列缀合的PEG通常在室温下可溶于水,并且具有通式R(O-CH₂-CH₂)_nO-R,其中R是氢或保护基,如烷基或烷醇基(alkanol),并且其中n是1至1000的整数。当R是保护基时,它通常具有1至8个碳。与多肽序列缀合的PEG可以是直链或支链的。本公开考虑支链PEG衍生物、“星形PEG”和多臂PEG。本公开中使用的PEG的分子量(分子质量)不限于任何特定的范围。某些实施方案具有5kDa至20kDa的分子量,而其它实施方案具有4kDa至10kDa的分子量。在本文其它地方描述了描述具有额外分子量的PEG的其它实施方案。

[0209] 本公开还考虑了缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包含缀合物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物

中, $n=1$ 的缀合物的百分比是 18-25%, $n=2$ 的缀合物的百分比是 50-66%, $n=3$ 的缀合物的百分比是 12-16%, $n=4$ 的缀合物的百分比高达 5%。可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法产生此类组合物。在整个说明书中描述了示例性反应条件。可以使用阳离子交换层析分离缀合物, 然后鉴定含有缀合物的级份, 所述缀合物具有例如期望数目的连接的 PEG, 经纯化而不含未修饰的蛋白质序列和具有其它数目的连接的 PEG 的缀合物。

[0210] 聚乙二醇化最常发生在多肽的 N-末端的 α 氨基、赖氨酸残基的侧链上的 ϵ 氨基和组氨酸残基的侧链上的咪唑基。由于大多数重组多肽拥有单个 α 和多个 ϵ 氨基和咪唑基团, 根据接头化学, 可以产生许多位置异构体。可以在本文中应用本领域已知的通用聚乙二醇化策略。可以经由介导一种或多种多肽序列的游离氨基或羧基和聚乙二醇之间的键的末端反应性基团 (“间隔物”) 将 PEG 与本公开的多肽结合。具有可以与游离氨基结合的间隔物的 PEG 包括 N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇, 其可以通过用 N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。可以与游离氨基结合的另一种活化的聚乙二醇是 2,4-双 (0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪, 其可以通过聚乙二醇单甲醚与氰尿酸氯反应来制备。与游离羧基结合的活化聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0211] 可以通过各种常规方法进行本公开的一种或多种多肽序列与具有间隔物的 PEG 的缀合。例如, 利用试剂与蛋白质的摩尔比 4:1 到 30:1, 可以在 5 至 10 的 pH, 在 4°C 至室温的温度在溶液中进行缀合反应 30 分钟至 20 小时。可以选择反应条件以指导反应向主要产生期望的取代度。一般来说, 低温、低 pH (例如 pH=5) 和短反应时间趋于减少连接的 PEG 数目, 而高温、中性至高 pH (例如 pH $\geq$ 7)、较长的反应时间趋于增加连接的 PEG 的数目。可以使用本领域已知的各种手段终止反应。在一些实施方案中, 通过酸化反应混合物并在例如 -20°C 冷冻来终止反应。在例如美国专利号 5,252,714; 5,643,575; 5,919,455; 5,932,462 和 5,985,263 中讨论了各种分子的聚乙二醇化。

[0212] 如上文指示, 聚乙二醇化最常发生在 N-末端、赖氨酸残基的侧链和组氨酸残基的侧链上的咪唑基团。通过例如优化反应条件和改善纯化方法的改进增强了此类聚乙二醇化的有用性。最近的残留特异性化学已经实现精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸以及羧基末端的聚乙二醇化。可以特异性聚乙二醇化这些氨基酸残基中的一些, 而其它氨基酸残基更混杂, 或者仅在某些条件下导致位点特异性聚乙二醇化。

[0213] 目前允许额外的氨基酸残基的聚乙二醇化的方法包括桥联聚乙二醇化 (二硫桥)、酶促聚乙二醇化 (谷氨酰胺和 C-末端) 和糖基化 (O-和 N-糖基化位点或糖蛋白的聚糖) 和异双功能聚乙二醇化。进一步的方法涉及含有非天然氨基酸的蛋白质的聚乙二醇化、C-末端聚乙二醇化的内含蛋白融合蛋白、转谷氨酰胺酶介导的聚乙二醇化、分选酶 (sortase) A-介导的聚乙二醇化, 以及可释放的且非共价的聚乙二醇化。此外, 特异性聚乙二醇化方法与基因工程技术的组合使得聚乙烯聚糖聚合物能够在蛋白质表面上的任何位置处实质性缀合, 这是由于例如用携带正交反应性基团的天然或非天然氨基酸取代多肽中的特定氨基酸残基。一般来说, 参见例如 Pasut, G. 和 Veronese, F.M., (2012) J.Controlled Release 161: 461-72; Roberts, M.J. 等人, (2012) Advanced Drug Delivery Rev.64:116-27; Jevsevar, S. 等人, (2010) Biotechnol.J.5:113-28; 及 Yoshioka, Y. (2011) Chem.Central J.5:25。

[0214] 聚乙二醇化分子的治疗价值得到完全验证。以前和/或目前的药物产品包括: OMONTYS (Affymax/Takeda); PEGLOTICASE (Savient); CIMZIA (Nektar/UCB Pharma);

MACUGEN (Pfizer); NEULASTA (Amgen); SOMAVERT (Pfizer); PEGASYS (Roche); DOXIL (Ortho Biotech) 和 PEGINTRON (Schering-Plough)。

[0215] 本公开还考虑使用PEG模拟物。已经开发出重组PEG模拟物,其保留了PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予几个另外的有利性质。举例来说,可以形成已经与所关注的肽或蛋白质药物重组融合的能够形成与PEG相似的扩展构象的简单多肽链(包括例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr)(例如,Amunix' XTEN技术;Mountain View,CA)。这消除了制造过程中对额外的缀合步骤的需要。此外,已建立的分子生物学技术能够控制多肽链的侧链组成,从而优化免疫原性和制造性质。

[0216] 糖基化:为了本公开的目的,“糖基化”意在广泛地指将聚糖连接于蛋白质、脂质或其它有机分子的酶促方法。

[0217] 术语“糖基化”与本公开结合使用通常意图指添加或缺失一个或多个碳水化合物部分(通过除去下面的糖基化位点或通过用化学和/或酶促手段除去糖基化),和/或添加天然序列中可能存在或不存在的一个或多个糖基化位点。此外,短语包括天然蛋白的糖基化的定性变化,其涉及存在的各种碳水化合物部分的性质和比例的变化。

[0218] 糖基化可以显著影响多肽如IL-15的物理性质(例如溶解性),并且在蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位中也是重要的。糖基化多肽还可以表现出增强的稳定性或可以改善一种或多种药代动力学性质,如半衰期。此外,溶解度改善可以例如能够产生与包含非糖基化多肽的制剂相比更适合于药物施用的制剂。

[0219] 适当的糖基化对生物活性可以是至关重要的。实际上,当在缺乏糖基化蛋白质的细胞过程的细菌(例如大肠杆菌)中表达时,来自真核生物体的某些基因产生蛋白质,所述蛋白质由于它们缺乏糖基化而在少许活性或没有活性的情况下回收。

[0220] 可以通过改变氨基酸序列实现糖基化位点的添加。可以例如通过一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(用于O-连接的糖基化位点)或天冬酰胺残基(用于N-连接的糖基化位点)的添加或取代进行对多肽的改变。N-连接和O-连接的寡糖和每种类型中发现的糖残基的结构可能是不同的。通常在二者中发现的一类糖是N-乙酰神经氨酸(以下称为唾液酸)。唾液酸通常是N-连接和O-连接的寡糖两者的末端残基,并且由于其负电荷可能对糖蛋白赋予酸性特性。本公开的一个具体实施方案包括N-糖基化变体的产生和使用。

[0221] 任选地,本公开的多肽序列可以通过经由核酸水平变化来改变,特别是通过在预选碱基上突变编码多肽的核酸,使得产生将翻译成期望的氨基酸的密码子。增加多肽上碳水化合物部分数目的另一种手段是通过糖苷与多肽的化学或酶促缀合。碳水化合物的除去可以化学或酶促完成,或者通过取代编码糖基化的氨基酸残基的密码子实现。化学脱糖基化技术是已知的,并且多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切和外切糖苷酶实现。

[0222] 二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是用于生产重组糖蛋白的常用的宿主细胞。这些细胞不表达酶 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶,因此不将 α -2,6连接中的唾液酸添加到在这些细胞中产生的糖蛋白的N-连接寡糖。

[0223] 聚唾液酸化:本公开还考虑使用聚唾液酸化、多肽与天然存在的可生物降解的 α -(2 $\rightarrow$ 8)连接的聚唾液酸(“PSA”)的缀合,以便改善多肽的稳定性和体内药代动力学。PSA是一种可生物降解、无毒的天然聚合物,其是高亲水性的,对其给予在血液中的高表观分子

量,从而延长其血清半衰期。此外,一系列肽和蛋白质治疗剂的聚唾液酸化导致了显著降低的蛋白水解、体内活性的保留和免疫原性和抗原性的降低(参见例如G.Gregoriadis等人,Int.J.Pharmaceutics (2005) 300 (1-2):125-30)。与用其它缀合物(例如PEG)的修饰一样,用于位点特异性聚唾液酸化的各种技术是可用的(参见例如T.Lindhout等人,(2011)PNAS 108 (18) 7397-7402)。

[0224] 白蛋白融合:用于缀合的另外的合适的组分和分子包括白蛋白,如人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。

[0225] 成熟HAS,一种具有约20天的血清半衰期的585个氨基酸的多肽(约67kDa),主要负责维持胶体渗透压、血液pH值,以及许多内源和外源配体的转运和分布。蛋白质具有三种结构上同源的结构域(I、II和III结构域),几乎全部处于 α -螺旋构象,并且由17个二硫桥高度稳定化。白蛋白的三种主要药物结合区域位于亚结构域IB、IIA和IIIA内的三种结构域中的每种上。

[0226] 白蛋白合成发生在肝脏中,所述肝脏产生短寿的初级产物前原白蛋白。因此,全长HSA具有18个氨基酸的信号肽(MKWVTFISLLFLFSSAYS;SEQ ID NO:40),随后是6个氨基酸的前结构域(RGVFRR;SEQ ID NO:41);该24个氨基酸残基肽可以称为前原结构域。HSA可以使用其内源性信号肽作为前原结构域表达和分泌。或者,可以使用与成熟构建体融合的IgK信号肽来表达和分泌HSA。前原白蛋白在其氨基末端的内质网管腔中快速共翻译切割,以产生稳定的609个氨基酸的前体多肽白蛋白原。然后,白蛋白原传递至高尔基体,在那里通过弗林蛋白酶依赖性氨基末端切割将其转化为585个氨基酸的成熟白蛋白。

[0227] 白蛋白的主要氨基酸序列、结构和功能在物种间是高度保守的,白蛋白合成和分泌的过程也是如此。例如,食蟹猴、牛、狗、兔和大鼠中发现与HSA相当的白蛋白血白蛋白。在非人物种中,牛血清白蛋白(BSA)在结构上与HSA最相似(参见例如Kosa等人,Nov 2007J Pharm Sci.96 (11):3117-24)。本公开考虑了使用来自非人物种的白蛋白,包括但不限于上文列出的那些,例如在药物开发过程中。

[0228] 根据本公开,白蛋白可以在羧基末端、氨基末端、羧基和氨基末端以及内部与药物分子(例如,本文所述的多肽)缀合(参见例如USP 5,876,969和USP 7,056,701)。

[0229] 在本公开考虑的HSA-药物分子缀合物中,可以使用各种形式的白蛋白,如白蛋白分泌前序列及其变体、其片段和变体,以及HSA变体。这种形式通常拥有一种或多种期望的白蛋白活性。在另外的实施方案中,本公开涉及包含直接或间接与白蛋白、白蛋白片段和白蛋白变体等融合的多肽药物分子的融合蛋白,其中融合蛋白具有比未融合药物分子更高的血浆稳定性和/或融合蛋白保留未融合药物分子的治疗活性。在一些实施方案中,间接融合通过接头如肽接头或其修饰形式实现。

[0230] 细胞内切割可以通过例如弗林蛋白酶或胰凝乳蛋白酶酶促进行。细胞表达低水平的这些内源性酶,其能够在细胞内切割融合分子的一部分。因此,在不与HSA缀合的情况下从细胞分泌一些多肽,而其它多肽以包含HSA的融合分子的形式分泌。本公开的实施方案考虑了各种弗林蛋白酶融合构建体的使用。例如,可以设计包含序列RGRR(SEQ ID NO:18)、RKRKKR(SEQ ID NO:19)、RKKR(SEQ ID NO:20)或RRRKKR(SEQ ID NO:21)的构建体。

[0231] 本公开还考虑细胞外切割(离体切割),由此从细胞分泌融合分子,进行纯化,然后切割。应当理解,切除可以与成熟的IL-15分离整个HSA-接头复合物,或者小于整个HSA-接

头复合物。

[0232] 如上文提到,可以例如通过遗传操作实现白蛋白与本公开的一种或多种多肽的融合,使得编码HSA或其片段的核酸连接到编码一种或多种多肽序列的核酸。此后,可以用融合的核苷酸序列以例如合适的质粒的形式转化或转染合适的宿主,以便表达融合多肽。可以在体外从例如原核或真核细胞或体内从例如转基因生物体实现表达。在本公开的一些实施方案中,在哺乳动物细胞系,例如CHO细胞系中进行融合蛋白的表达。转化在本文中广义地使用,是指源自直接摄取通过细胞膜、外源遗传物质(外源核酸)的掺入和表达的细胞的遗传改变。在一些细菌中自然发生转化,但它也可以通过人工手段在其它细胞中实现。

[0233] 此外,可以修饰白蛋白本身以延长其循环半衰期。可以通过上文描述的遗传操作技术或通过化学缀合获得经修饰的白蛋白与IL-15的融合;所得的融合分子的半衰期超过与非修饰白蛋白的融合的半衰期(参见WO2011/051489)。

[0234] 备选白蛋白结合策略:已经开发了几种白蛋白结合策略作为直接融合的备选,包括通过缀合脂肪酸链(酰化)的白蛋白结合。由于血清白蛋白是脂肪酸的转运蛋白,具有白蛋白结合活性的这些天然配体已被用于小蛋白治疗剂的半衰期延长。例如,地特胰岛素(LEVEMIR)(用于糖尿病的批准产品)包含与经遗传修饰的胰岛素缀合的肉豆蔻基链,产生长效胰岛素类似物。

[0235] 本公开考虑包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和本文所述的一种或多种多肽的序列的融合蛋白。文献中描述的任何ABD多肽序列可以是融合蛋白的组分。融合蛋白的组分可以任选地通过接头,如本文所述的接头共价键合。在本公开的一些实施方案中,融合蛋白包含ABD多肽序列作为N-末端部分和本文所述的多肽作为C-末端部分。

[0236] 本公开还考虑包含白蛋白结合多肽的片段的融合蛋白,该片段基本上保留白蛋白结合;或者包含至少两个白蛋白结合多肽或其片段作为单体单元的白蛋白结合多肽或其片段的多聚体。关于ABD和相关技术的一般讨论,参见WO 2012/050923、WO 2012/050930、WO 2012/004384和WO 2009/016043。

[0237] 与其它分子的缀合:用于缀合的其它合适的组分和分子包括例如甲状腺球蛋白;破伤风类毒素;白喉类毒素;聚氨基酸,如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸);轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血凝素,流感病毒核蛋白;匙孔血蓝蛋白(KLH);和乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或上述的任何组合。

[0238] 因此,本公开考虑多肽序列的N-和/或C-末端的一种或多种另外的组分或分子,如另一种多肽(例如,具有与主题多肽异源的氨基酸序列的多肽)或载体分子的缀合。因此,示例性多肽序列可以作为与另一种成分或分子的缀合物提供。

[0239] 缀合物修饰可以导致多肽序列,其保留具有源自第二分子的另外或互补的功能或活性的活性。例如,多肽序列可以与分子缀合,例如以促进溶解性、储存、体内或货架半衰期或稳定性、免疫原性的降低、体内延迟或受控释放等。其它功能或活性包括相对于未缀合的多肽序列降低毒性的缀合物、比未缀合的多肽序列更有效地靶向细胞或器官类型的缀合物,或者进一步反击如本文中阐述的疾病、病症或病况(例如癌症)相关的原因或效应的药物。

[0240] IL-15多肽还可以与大的、缓慢代谢的大分子如蛋白质;多糖,如sepharose、琼脂糖、纤维素或纤维素珠;聚合氨基酸,如聚谷氨酸或聚赖氨酸;氨基酸共聚物;灭活的病毒颗

粒；灭活的细菌毒素，如来自白喉、破伤风、霍乱或白细胞毒素分子的类毒素；灭活的细菌；和树突细胞缀合。若想要的话，此类缀合形式可用于产生针对本公开的多肽的抗体。

[0241] 用于缀合的其它候选组分和分子包括适合于分离或纯化的那些。具体的非限制性实例包括结合分子，如生物素（生物素-抗生物素蛋白特异性结合对）、抗体、受体、配体、凝集素或包含固体支持物的分子，包括例如塑料或聚苯乙烯珠、板、磁珠、测试条和膜。

[0242] 可以使用如阳离子交换层析的纯化方法通过电荷差分离缀合物，所述电荷差有效地将缀合物分离成它们的各种分子量。例如，可以加载阳离子交换柱，然后用约20mM乙酸钠（pH约4）清洗，然后用约3至5.5的pH（例如pH约4.5）缓冲的线性（0M至0.5M）NaCl梯度洗脱。通过阳离子交换层析获得的级分的含量可以使用常规方法，例如质谱法、SDS-PAGE或用于通过分子量分离分子实体的其它已知方法通过分子量鉴定。

[0243] Fc融合分子：在某些实施方案中，本公开的多肽序列的氨基末端或羧基末端可与免疫球蛋白Fc区（例如人Fc）融合以形成融合缀合物（或融合分子）。已经显示Fc融合缀合物增加生物药物的系统半衰期，因此生物制药产品可能需要不太频繁的施用。

[0244] Fc结合作为血管衬里的内皮细胞中的新生儿Fc受体（FcRn），并且在结合时，Fc融合分子受到保护而免于降解并再释放到循环中，使循环中的分子保持更长。认为这种Fc结合是内源性IgG保留其长血浆半衰期的机制。最近的Fc融合技术将生物药物的单拷贝与抗体的Fc区连接，以优化与传统Fc-融合缀合物相比生物药物的药代动力学和药效学性质。

[0245] 其它修饰：本公开考虑使用IL-15目前已知或未来开发的其它修饰以改善一种或多种性质。一种此类方法涉及通过HES化修饰多肽序列，所述HES化利用与其它分子连接的羟乙基淀粉衍生物以便改变多肽序列的特征。HES化的各个方面描述于例如美国专利申请号2007/0134197和2006/0258607。

[0246] 本公开还考虑包含小泛素样修饰剂（SUMO）作为融合标签（LifeSensors, Inc.; Malvern, PA）的融合分子。本文所述的多肽与SUMO的融合可以传达几种有益效果，包括表达的增强、溶解性的改善和/或辅助开发纯化方法。SUMO蛋白酶识别SUMO的三级结构并在SUMO的C-末端切割融合蛋白，从而释放本文所述的具有期望的N-末端氨基酸的多肽。

[0247] 本公开还考虑使用PASylation™（XL-Protein GmbH (Freising, Germany)）。该技术扩展了所关注的蛋白质的表观分子大小，而不会对蛋白质的治疗生物活性具有负面影响，超出了肾小球的孔径，从而降低了蛋白质的肾清除。

[0248] 接头：上文已经描述了接头及其用途。用于修饰本公开的多肽序列的任何前述组分和分子可以任选地通过接头缀合。合适的接头包括通常具有足够长度以允许修饰的多肽序列与连接的组分和分子之间的一些移动的“柔性接头”。接头分子通常为约6-50个原子长。接头分子也可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物，二胺、二酸、氨基酸或其组合。合适的接头可以容易地选择并且可以是任何合适的长度，如1个氨基酸（例如Gly）、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50或多于50个氨基酸。

[0249] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物（G）_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物（例如，（GS）_n、GSGGS_n（SEQ ID NO:22）、GGGS_n（SEQ ID NO:23）、（G_mSo）_n、（G_mSoG_m）_n、（G_mSoG_mSoG_m）_n（SEQ ID NO:24）、（GSGGS_m）_n（SEQ ID NO:25）、（GSGS_mG）_n（SEQ ID NO:26）和（GGGS_m）_n（SEQ ID NO:27）和其组合，其中m、n和o各自独立地选自至少1的整数）、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的，因此可以充

当组分之间的中性系链。示例性的柔性接头包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:28)、GGSGG (SEQ ID NO:29)、GSGSG (SEQ ID NO:30)、GSGGG (SEQ ID NO:31)、GGGSG (SEQ ID NO:32) 和GSSSG (SEQ ID NO:33)。

[0250] 在本公开的某些实施方案中,通过共价连接至一个或多个PEG分子的活化接头将PEG与IL-15缀合。如果接头是化学反应性的并且准备共价连接到肽上的反应性基团,则接头是“活化的”。本公开考虑使用任何活化的接头,条件是它可以在合适的反应条件下容纳一个或多个PEG分子并与氨基酸残基形成共价键。在具体的方面中,活化的接头相对于其它连接位点(例如赖氨酸的 ϵ 氨基或组氨酸的亚氨基)以高选择性方式连接到 α 氨基。

[0251] 在一些实施方案中,活化的PEG可由下式表示:(PEG)_b-L',其中PEG共价连接到接头的碳原子以形成醚键,b是1至9(即,1至9个PEG分子可以连接到接头),并且L'含有可以与例如氨基酸残基上的氨基或亚氨基反应以提供PEG与IL-15的共价连接的反应性基团(活化部分)。在其它实施方案中,活化的接头(L')含有式RCHO的醛,其中R是直链或支链C₁₋₁₁烷基;在将活化的接头共价连接到IL-15后,接头含有2至12个碳原子。本公开考虑实施方案,其中丙醛是示例性的活化接头。PEG-丙醛(CH₂CH₂CHO)描述于美国专利5,252,714中,并且是可商购的(例如Shearwater Polymers (Huntsville, AL))。其它活化的PEG-接头可以可商购自例如Shearwater Polymers和Enzon, Inc. (Piscataway, N.J.)。

[0252] 在一些实施方案中,期望将多于一个PEG分子共价连接到IL-15,并且可以使用合适的活化的分支(即“多臂”)接头。可以使用将两个或更多个PEG分子共价连接到IL-15的氨基酸残基上的氨基(例如,在N-末端的 α 氨基)的任何合适的支链PEG接头。在具体实施方案中,本公开考虑的分支接头含有两个或三个PEG分子。举例来说,分支PEG接头可以是水解稳定的直链或支链脂肪族基团,并含有与氨基酸残基的氨基反应的活化部分(如醛基),如上所述;分支接头的脂肪族基团可以含有2至12个碳。在一些实施方案中,脂肪族基团可以是叔丁基,其可以含有例如三个碳原子的每个上的三个PEG分子(即总共9个PEG分子)和叔丁基的第四个碳上的反应性醛部分。

[0253] 在美国专利号5,643,575、5,919,455、7,052,868和5,932,462中描述了其它示例性的分支PEG接头。熟练技术人员可以通过例如添加反应性醛部分来制备对分支PEG接头的修饰。用于制备使用的接头的方法在本领域中也是公知的,并且在例如上面列出的美国专利中进行了描述。

[0254] 治疗和预防用途

[0255] 本公开考虑本文所述的IL-15多肽(例如PEG-IL-15)在治疗或预防大量疾病、病症和/或病况和/或其症状中的用途。虽然在下文中详细描述了具体的用途,但是应当理解,本公开不限于此。此外,虽然以下阐述了具体疾病、病症和病况的一般类别,但是一些疾病、病症和病况可以是多于一类的成员,而其它可能不是任何公开类别的成员。

[0256] 如下面更详细地讨论,已经显示IL-15在与免疫和炎症功能相关的疾病、病症和病况中发挥作用(例如,自身免疫相关性病症(例如类风湿性关节炎)、结节病、炎性肠病和移植排斥);癌症(例如白血病、淋巴组织增殖性病症和实体瘤);和传染病(例如HIV)。[参见例如Fehniger等人, Blood 97(1) (2001年1月1日)]。

[0257] 免疫和炎性病况。在一些实施方案中,本公开考虑免疫系统的抑制和免疫相关疾病、病症和病况的治疗。如本文中所用,如“免疫疾病”、“免疫病况”、“免疫病症”、“炎性疾

病”、“炎性病况”、“炎性病症”等术语意图广泛地涵盖任何免疫或炎症相关病况(例如病理性炎症和自身免疫性疾病)。此类病况常常与其它疾病、病症和病况密不可分。举例来说,“免疫病况”可以指增殖性病况,如癌症、肿瘤和血管生成;包括抵抗免疫系统消除的感染(急性和慢性)、肿瘤和癌症。

[0258] 本文所述的IL-15肽可以用于通过施用有效抑制一种或多种细胞事件的量抑制免疫功能,所述细胞事件由于野生型IL-15与IL-15受体复合物之间的相互作用而天然发生。或者,可以施用编码本文所述的IL-15肽的核酸分子或表达本文所述的IL-15肽的重组细胞。在具体实施方案中,IL-15肽以与野生型IL-15类似的亲和力结合IL-15受体复合物,但不能激活细胞信号转导。有利的是,IL-15肽与野生型IL-15有效竞争并抑制通常响应IL-15信号传导而关联的事件。

[0259] 可以例如由炎性细胞因子引起的免疫和炎症相关疾病、病症和病况的非限制性列表包括关节炎(例如类风湿性关节炎)、结节病、肾衰竭、狼疮、哮喘、银屑病、结肠炎、胰腺炎、变态反应、手术并发症(例如其中炎性细胞因子阻止愈合)、贫血和纤维肌痛。可能与慢性炎症有关的其它疾病和病症包括阿尔茨海默氏病、充血性心力衰竭、中风、主动脉瓣狭窄、动脉硬化、骨质疏松症、帕金森病、感染、炎性肠病(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、过敏性接触性皮炎和其它湿疹、系统性硬化、移植和多发性硬化。在下文中更详细地描述了IL-15分子可能特别有效的一些上述疾病、病症和病况(由于例如目前疗法的限制)。

[0260] 本公开的IL-15多肽可以特别有效地治疗和预防炎性肠病(IBD)。IBD包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),这两者都是可以影响胃肠道的任何部分的特发性慢性疾病,并且与许多不利影响相关,并且长期UC患者有增加的发展结肠癌的风险。目前的IBD治疗旨在控制炎症症状,而某些药剂(例如,皮质类固醇、氨基水杨酸和标准免疫抑制剂(如环孢菌素、硫唑嘌呤和甲氨蝶呤))已经以有限的成功满足,长期治疗可能会引起肝损伤(例如纤维化或肝硬化)和骨髓抑制,并且患者通常对此类治疗变得难治。

[0261] 银屑病,一系列免疫介导性慢性皮肤病,在美国影响超过450万人,其中认为150万人患有中度至重度形式的疾病。此外,超过10%的银屑病患者会发展银屑病关节炎,从而破坏关节周围的骨骼和结缔组织。对银屑病的潜在生理学的理解改善已经导致引入例如靶向导致该疾病炎症性质的T淋巴细胞和细胞因子的活性的药剂。这些药剂包括TNF- α 抑制剂(也用于治疗类风湿性关节炎(RA)),包括ENBREL(依那西普(etanercept))、REMICADE(英利昔单抗)和HUMIRA(阿达木单抗)(adalimumab)和T细胞抑制剂如AMEVIVE(阿来法塞(alefacept))和RAPTIVA(依法珠单抗)。虽然这些药物中的几种在某些患者群体中在一定程度上有效,但无一可以显示有效地治疗所有患者。

[0262] 类风湿性关节炎(RA)影响约1%的美国人口(约210万人),所述类风湿性关节炎通常以关节的膜衬里(滑膜)的慢性炎症为特征。细胞因子(包括TNF- α 和IL-1)在炎症过程中的作用的进一步了解使得能够开发和引入一类新的缓解疾病的抗风湿药物(DMARD)。药剂(其中一些与其它适应症的治疗方式重叠)包括ENBREL(依那西普)、REMICADE(英利昔单抗)、HUMIRA(阿达木单抗)和KINERET(阿那白滞素)。虽然这些药剂中的一些缓解症状,抑制结构性损伤的进展,并改善特定患者群体中的身体功能,但仍然需要具有改善的功效、互补作用机制和较少/较不严重的不良反应的备选药物。

[0263] 在某些情况下,已经发现了器官和组织的移植排斥涉及IL-15相关的成分。排斥是

由细胞免疫和体液免疫二者介导的适应性免疫应答,以及先天免疫应答的组分。不同类型的移植器官和组织通常具有不同的排斥机制平衡。肾脏、心脏、骨髓、皮肤和血液是最常参与移植排斥的器官和组织。移植排斥的治疗通常由排斥的医学类别(例如超急性,急性或慢性)决定。免疫抑制疗法构成治疗移植排斥的主要手段。治疗通常起始于皮质类固醇(例如泼尼松)。联合疗法通常需要添加钙调神经素抑制剂(例如环孢菌素和他克莫司)和抗增殖剂(例如硫唑嘌呤)。可以将特定免疫组分特异性的抗体加入免疫抑制疗法;抗体治疗剂包括单克隆抗IL-2R α 受体抗体(例如,达克珠单抗(daclizumad))和单克隆抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。尽管在许多情况下有帮助,但需要备选治疗方式,如IL-15相关药剂。

[0264] 患有多发性硬化症(MS)(一种严重虚弱的自身免疫性疾病,包括脑和脊髓中髓磷脂的炎症和瘢痕形成的多个区域)的受试者可以特别由本文所述的IL-15多肽帮助,因为目前的治疗仅缓解症状或延迟残疾的进展。

[0265] 已经在丙型肝炎诱导的肝疾病期间以及在肝硬化和慢性肝炎中观察到IL-15血清水平升高。患有肝细胞癌的受试者中的IL-15水平特别升高。

[0266] 类似地,IL-15多肽可以特别有利于患有神经变性病病症的受试者,如阿尔茨海默氏病(AD)(一种严重损害患者思想、记忆和语言过程的脑部病症);帕金森病(PD)(一种以例如异常运动、僵硬和震颤为特征的进行性CNS病症);以及糖尿病。这些疾病是进行性和虚弱的,并且没有治愈性药物可用。

[0267] 癌症和相关病况。根据本公开,本文所述的IL-15分子(例如肽)可用于治疗具有不希望的表达IL-15受体的细胞增殖的受试者。或者,可以施用编码本文所述的IL-15肽的核酸分子或表达本文所述的IL-15肽的重组细胞。虽然不需要IL-15施加抗增殖作用的根本作用机制的理解来实施本公开,但细胞增殖可被补体定向的细胞溶解或抗体依赖性细胞毒性抑制。

[0268] 本文所述的IL-15肽可用于治疗或预防增殖性病况或病症,包括癌症,例如子宫癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠癌(例如食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌或大肠癌、结肠癌或直肠癌)、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌(例如胶质瘤)、神经节癌、中枢神经系统(CNS)癌和周围神经系统(PNS)癌以及造血系统和免疫系统(例如脾或胸腺)的癌症。本公开还提供了治疗或预防其它癌症相关疾病、病症或病况的方法,包括例如免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠性肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、淋巴瘤(例如皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌症、转移和血管生成。

[0269] 在具体实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、成胶质细胞瘤或白血病(例如HTLV-1介导的成年T细胞白血病)。术语癌症相关疾病、病症和病况的使用意在广义地指直接或间接与癌症相关的病况,并且包括例如血管发生和癌前病况如发育异常。

[0270] 在一些实施方案中,本公开提供了用IL-15分子和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗增殖性病况、癌症、肿瘤或癌前病况的方法,其实例在本文其它地方阐述。

[0271] 病毒和细菌性病况。IL-15在病毒和细菌性疾病、病症和病况中的作用越来越受到关注。假定IL-15依赖于其受体结合活性和其它因素而产生刺激和抑制作用。

[0272] 关于人免疫缺陷病毒 (HIV), IL-15通过其模拟IL-2作用的能力而具有两个相互冲突的效应。一种效应是免疫功能的潜在有益的增强,而另一个效应是HIV复制的潜在有害的激活。这些相反的作用也存在于其它病毒相关病症中。在IL-15水平和病毒载量波动之间观察到紧密的时间相关性。本公开考虑IL-15多肽在治疗和/或预防用IL-15治疗可以有益的任何病毒性疾病、病症或病况中的用途。考虑的病毒性疾病、病症和病况的实例包括埃巴病毒、乙型肝炎、丙型肝炎、HIV、单纯疱疹病毒和巨细胞病毒 (CMV)。

[0273] IL-15最近与某些细菌和其它侵入性感染有关。举例来说,报告指出,在由例如沙门氏菌和恶性疟原虫引起的感染前施用重组IL-15改善了针对生物素的宿主防御和生物体的清除。

[0274] 药物组合物

[0275] 本公开的IL-15多肽可以是适合于对受试者施用的组合物的形式。通常,此类组合物是包含IL-15和一种或多种药学上可接受或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的“药物组合物”。在某些实施方案中,IL-15多肽以治疗上可接受的量存在。药物组合物可用于本公开的方法中;因此,例如,药物组合物可以离体或体内施用于受试者,以便实施本文所述的治疗和预防方法和用途。

[0276] 本公开的药物组合物可以配制为与意图的施用方法或途径相容;本文阐述了示例性施用途。此外,药物组合物可以与本文所述的其它治疗活性剂或化合物组合使用,以治疗或预防如本公开考虑的疾病、病症和病况。

[0277] 药物组合物通常包含治疗有效量的由本公开考虑的IL-15多肽和一种或多种药学上和生理上可接受的配制剂。合适的药学上可接受或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯)、乳化剂、悬浮剂、分散剂、溶剂、填充剂、增量剂、洗涤剂、缓冲剂、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,合适的媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,可能补充有用于胃肠外施用的药物组合物中常见的其它材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性媒介物。本领域技术人员将容易地认识到可用于药物组合物和本文考虑的剂型的各种缓冲液。典型的缓冲剂包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。例如,缓冲成分可以是水溶性物质,如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸) (HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐 (MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸 (MOPS) 和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸 (TAPS)。

[0278] 在已经配制药剂组合物后,可以将它作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。此类制剂可以以即用形式、需要在使用前重建的冻干形式、在使用前需要稀释的液体形式或其它可接受的形式存储。在一些实施方案中,在一次性容器(例如,一次性小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中提供药物组合物,而在其它实施方案中提供多次使用容器(例如,多次使用小瓶)。任何药物递送装置可用于递送IL-15,包括植入物(例如可植入泵)和导管系统、缓慢注射泵和装置,所有这些都是熟练技术人员公知的。也可以利用通常皮下或肌肉内施用的积存注射在限定的时间段内释放本文公开的多肽。积存注射通常是基于固体的或基于油的,并且通常包含本文阐述的至少一种制剂组分。本领域普通技术人员熟悉积存注射的可能配方和用途。

[0279] 药物组合物可以是无菌注射水性或油性悬浮液的形式。该悬浮液可根据已知技术使用本文提及的合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂也可以是无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如作为1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇) 及其合适的混合物。另外, 无菌不挥发油常规用作溶剂或悬浮介质。为此目的, 可以使用任何温和的不挥发油, 包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外, 脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。可以通过包括延迟吸收的试剂 (例如单硬脂酸铝或明胶) 来实现特定可注射制剂的延长吸收。

[0280] 含有活性成分的药物组合物可以是适于口服使用的形式, 如片剂、胶囊、糖锭剂、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散的粉末或颗粒、乳剂、硬胶囊或软胶囊或糖浆、溶液、微珠或酞剂。意图用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法制备, 并且这种组合物可以含有一种或多种药剂, 如例如甜味剂、调味剂、着色剂药剂和防腐剂, 以提供药学上优雅且可口的制剂。片剂、胶囊等含有与适合于制造片剂的无毒性药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如稀释剂, 如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠; 造粒剂和崩解剂, 例如玉米淀粉或藻酸; 粘合剂, 例如淀粉、明胶或阿拉伯胶; 和润滑剂, 例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0281] 适合于口服施用的片剂、胶囊等可以是未涂覆的或通过已知技术包被以延迟在胃肠道中的崩解和吸收, 从而提供持续的作用。例如, 可以使用延时材料, 如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们也可以通过本领域已知的技术进行包被以形成用于受控释放的渗透性治疗性片剂。其它药剂包括可生物降解的或生物相容性的颗粒或聚合物, 如聚酯、聚胺酸、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚酞、聚乙醇酸、乙烯-乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物以控制施用的组合物的递送。例如, 口服药剂可以通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中, 分别通过使用羟甲基纤维素或明胶微胶囊或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊, 或在胶体药物递送系统中俘获。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和基于脂质的系统, 包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用于制备上文提及的制剂的方法对于本领域技术人员是显而易见的。

[0282] 口服使用的制剂也可以以硬明胶胶囊形式呈现, 其中活性成分与惰性固体稀释剂, 例如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素混合, 或作为软明胶胶囊呈现, 其中活性成分与水或油介质, 例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0283] 水性悬浮液含有活性物质与适合于其制造的赋形剂的混合物。此类赋形剂可以是悬浮剂, 例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶; 分散剂或润湿剂, 例如天然存在的磷脂 (例如卵磷脂) 或环氧烷与脂肪酸的缩合产物 (例如, 硬脂酸聚氧乙烯酯) 或环氧乙烷与长链脂肪族醇 (例如十七碳亚乙基氨基鲸蜡醇) 的缩合产物或环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物 (例如, 聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯) 或环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇酞的偏酯的缩合产物 (例如, 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂。

[0284] 油性悬浮液可以通过将活性成分悬浮在植物油, 例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰

子油中,或矿物油如液体石蜡中来配制。油性悬浮液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂(如上文阐述)和调味剂以提供可口的口服制剂。

[0285] 适合于通过加入水制备水性悬浮液的分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。在本文中示例合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂。

[0286] 本公开的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂、源自脂肪酸的酯或偏酯;己糖醇酐,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;和偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0287] 制剂还可以包括保护组合物免受身体快速降解或消除的载体,如受控释放制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微囊化递送系统。例如,可以采用单独或与蜡组合的延时材料,如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。

[0288] 本公开考虑以直肠施用的栓剂形式施用IL-15多肽。栓剂可以通过将药物与合适的非刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在常温下为固体但在直肠温度下为液体,因此将在直肠中融化以释放药物。此类材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0289] 本公开考虑的IL-15多肽可以是现在已知或将来开发的任何其它合适的药物组合物(例如,用于鼻腔或吸入用途的喷雾剂)的形式。

[0290] 制剂中多肽或其片段的浓度可以广泛变化(例如,按重量计小于约0.1%,通常为或至少约2%至多至20%至50%或更高),并且通常将根据例如所选择的特定施用模式,主要基于流体体积、粘度和基于受试者的因素选择。

[0291] 施用途径

[0292] 本公开考虑以任何适当的方式施用IL-15分子及其组合物。合适的施用途径包括胃肠外(例如肌肉内、静脉内、皮下(例如注射或植入物)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(实质内)和脑室内)、口服、鼻、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(例如透皮)、舌下和吸入。通常皮下或肌肉内施用的积存注射也可用于在限定的时间段内释放本文公开的IL-15分子。

[0293] 本公开的具体实施方案考虑胃肠外施用,并且在进一步的具体实施方案中,胃肠外施用是皮下。

[0294] 联合疗法

[0295] 本公开考虑使用IL-15分子与一种或多种活性治疗剂(例如细胞因子)或其它预防或治疗方式(例如辐射)组合。在此类联合疗法中,各种活性剂经常具有不同的互补作用机制。通过允许一种或多种药剂的剂量减少,从而减少或消除与一种或多种药剂相关的副作用,此类联合疗法可能是特别有利的。此外,此类联合疗法可对潜在的疾病、病症或病况具有协同的治疗或预防作用。

[0296] 如本文中所用,“组合/联合”意在包括可以分开施用,例如分开配制用于分开施用(例如,如可以在试剂盒中提供)的治疗剂,以及可以在单一制剂中一起施用(即“共施用”)的疗法。

[0297] 在某些实施方案中,IL-15多肽和一种或多种活性治疗剂或其它预防或治疗方式

依次施用或施加,例如其中一种药剂在一种或多种其它药剂之前施用。在其它实施方案中,IL-15多肽和一种或多种活性治疗剂或其它预防或治疗方式同时施用,例如两种或更多种药物同时或大约同时施用;两种或更多种药物可以在两种或更多种分开的制剂中存在或组合成单一制剂(即共制剂)。不管两种或更多种药剂是依次还是同时施用,为了本公开的目的,认为它们是联合施用的。

[0298] 本公开的IL-15多肽可以在任何情况下以任何合适的方式与至少一种其它(活性)剂联合使用。在一个实施方案中,在一段时间内维持本公开的至少一种活性剂和至少一种IL-15多肽的治疗。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),而将用本公开的IL-15多肽的治疗维持于恒定的给药方案。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),而减少用本公开的IL-15多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),并且增加用本公开的IL-15多肽的治疗(例如,更高剂量、更频繁的施用或更长的治疗方案)。在另一个实施方案中,维持用至少一种活性剂的治疗,并且减少或中断用本公开的IL-15多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗和用本公开的IL-15多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。

[0299] 免疫和炎性病况。本公开提供了用IL-15分子和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗和/或预防免疫和/或炎性相关疾病、病症和病况以及与其相关的病症的方法。

[0300] 可用于联合疗法的治疗剂的实例包括但不限于以下:非类固醇抗炎药(NSAID),如阿司匹林、布洛芬和其它丙酸衍生物(阿利洛芬,苯恶洛芬、布氯酸、卡洛芬、芬布芬、非诺洛芬、氟洛芬、氟比洛芬、吲哚洛芬、酮洛芬、咪洛芬、萘普生、奥沙普秦、吡洛芬、普拉洛芬、舒洛芬、噻洛芬酸和硫恶洛芬)、乙酸衍生物(吲哚美辛,阿西美辛,阿氯芬酸,环氯茛酸,双氯芬酸,芬氯酸,芬克洛酸,芬替酸、呋罗芬酸(fuirofenac)、异丁芬酸、伊索克酸、奥西平酸(oxpinac)、舒林酸、硫平酸、托美丁、齐多美辛和佐美酸)、灭酸衍生物(氟芬那酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、尼氟酸和托芬那酸)、联苯羧酸衍生物(二氟尼柳和氟苯柳)、昔康类(伊索昔康、吡罗昔康、舒多昔康和替诺昔康)、水杨酸盐(乙酰水杨酸、柳氮磺吡啶)和吡唑啉酮(阿扎丙宗、苄哌立隆(bezpiperylon)、非普拉宗、莫非布宗、羟布宗、保泰松)。其它组合包括环氧合酶-2(COX-2)抑制剂。

[0301] 用于组合的其它活性剂包括类固醇,如泼尼松龙、泼尼松、甲泼尼龙、倍他米松、地塞米松或氢化可的松。此类组合可能是特别有利的,因为可以通过逐渐减少需要的类固醇剂量减少或甚至消除类固醇的一种或多种副作用。

[0302] 可以联合用于治疗例如类风湿性关节炎的活性剂的其它实例包括细胞因子抑制性抗炎药(CSAID);其它人细胞因子或生长因子(例如,TNF、LT、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF或PDGF)的抗体或拮抗剂。

[0303] 活性剂的具体组合可能会干扰自身免疫和随后的炎性级联中的不同点,并且包括TNF拮抗剂,如嵌合、人源化或人TNF抗体、REMICADE、抗TNF抗体片段(例如CDP870)和可溶性p55或p75TNF受体、其衍生物、p75TNFR1gG(ENBREL.)或p55TNFR1gG(LENERCEPT)、可溶性IL-13受体(sIL-13),以及还有TNF α 转化酶(TACE)抑制剂;类似地,IL-1抑制剂(例如白细胞介

素-1-转化酶抑制剂)可能是有效的。其它组合包括白细胞介素11、抗P7s和p-选择蛋白糖蛋白配体(PSGL)。可与本文所述的IL-15多肽组合使用的药剂的其它实例包括干扰素-β1a(AVONEX);干扰素-β1b(BETASERON);克帕松;高压氧;静脉内免疫球蛋白;克拉屈滨(clabribine);以及其它人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂(例如,CD40配体和CD80的抗体)。

[0304] 本公开包括上述任一项的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0305] 癌症和相关病况。本公开提供了用于用IL-15分子和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗和/或预防增殖性病况;癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病况的方法。

[0306] 化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,如塞替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安,英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶如苯并多巴、卡波醌(carboquone)、麦曲多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙撑亚胺和甲基密胺,包括六甲蜜胺、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基密胺(trimethylolomelamine);氮芥(nitrogen mustards),如苯丁酸氮芥(chiorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氧化氮芥盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲(nitrosureas),如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如阿克莱诺霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、奥瑟霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡洛比星(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、博替罗霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin);抗代谢物,如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-硫唑嘧啶、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氮尿苷、5-FU;雄激素,如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗雄激素,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,如叶酸;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吡啶(amsacrine);贝曲布辛(bestrabucil);比生群

(bisantrone);伊达曲仙(edatraxate);德弗法明(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);伊弗尼辛(elformithine);依利酷铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明;米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌;莫哌达醇(mopidamol);硝氮丙吡啶(nitracrine);喷司他丁;蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);雷佐生(razoxane);西左非兰(sizofiran);锗螺旋胺(spirogermanium);替奴佐酸(tenuazonic acid);三氮唑酮(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露糖醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);瓜西托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷(Ara-C);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(doxetaxel);苯丁酸氮芥;吉西他滨(gemcitabine);6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨嘌呤;铂和铂配位络合物,如顺铂和卡铂;长春碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);丝裂霉素C;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨;诺维本(navelbine);诺肖林(novantrone);替尼泊苷(teniposide);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂还包括作用为调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬、奥那司酮和托瑞米芬;和抗雄激素如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,联合疗法包括施用激素或相关激素剂。

[0307] 可以与IL-15多肽联合使用的其它治疗方式包括细胞因子或细胞因子拮抗剂,如IL-12、INF α 或抗表皮生长因子受体、放疗、针对另一肿瘤抗原的单克隆抗体、单克隆抗体和毒素的复合物、T细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞(例如树突细胞疗法)。本文中还提供疫苗(例如,作为可溶性蛋白质或编码蛋白质的核酸)。

[0308] 本公开包括上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0309] 病毒和细菌性病况。本公开提供用于用IL-15分子和至少一种另外的治疗剂或诊断剂(例如一种或多种其它抗病毒剂和/或一种或多种与病毒疗法无关的药剂)治疗和/或预防病毒性疾病、病症和病况以及与其相关的病症的方法。

[0310] 此类联合疗法包括靶向各种病毒生命周期阶段并具有不同作用机制的抗病毒剂,包括但不限于以下:病毒脱壳抑制剂(例如金刚烷胺和金刚乙胺(rimantidine));逆转录酶抑制剂(例如,阿昔洛韦,齐多夫定和拉米夫定);靶向整合酶的药剂;阻断转录因子连接到病毒DNA的药剂;影响翻译的药剂(例如反义分子)(例如福米韦生);调节翻译/核酶功能的药剂;蛋白酶抑制剂;病毒装配调节剂(例如利福平);以及阻止病毒颗粒释放的药剂(例如,扎那米韦和奥塞米韦)。某些病毒感染(如HIV)的治疗和/或预防通常需要抗病毒剂组(“鸡尾酒”)。考虑与IL-15多肽联合使用的其它抗病毒药物包括但不限于:阿巴卡韦、阿德福韦、金刚烷胺、安普那韦(amprenavir)、安普利近(ampligen)、arbidol、阿扎那韦(atazanavir)、依发韦仑(atrila)、boceprevirertet、西多福韦(cidofovir)、双汰芝(combivir)、地瑞那韦(darunavir)、地拉韦啉(delavirdine)、去羟肌苷(didanosine)、二

十二醇(docosanol)、依度尿昔(edoxudine)、依法韦伦(efavirenz)、恩曲他滨(emtricitabine)、恩夫韦地(enfuvirtide)、恩替卡韦(entecavir)、泛昔洛韦(famciclovir)、呋山那韦(fosamprenavir)、膦甲酸(foscarnet)、膦乙酸(fosfonet)、更昔洛韦(ganciclovir)、伊巴他滨(ibacitabine)、imunovir、碘苷、咪喹莫特(imiquimod)、茛地那韦(indinavir)、肌苷、各种干扰素(例如聚乙烯乙二醇 α -2a)、洛匹那韦(lopinavir)、洛韦胺(loviride)、马拉维诺(maraviroc)、吗啉胍(moroxydine,美替沙脒(methisazone)、奈非那韦(nelfinavir)、奈韦拉平(nevirapine)、nexavir、喷昔洛韦(penciclovir)、帕拉米韦(peramivir)、普来可那立(pleconaril)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、雷特格韦(raltegravir)、利巴韦林(ribavirin)、利托那韦(ritonavir)、嘧啶(pyrimidine)、沙奎那韦(saquinavir)、司他夫定(stavudine)、特拉匹韦(telaprevir)、去羟肌苷加(tenofovir)、替拉那韦(tipranavir)、曲氟尿苷(trifluridine)、三协唯(trizivir)、曲金刚胺(tromantadine)、特鲁瓦达(truvada)、伐昔洛韦(valaciclovir)、缬更昔洛韦(valganciclovir)、vicriviroc、阿糖腺苷(vidarabine)、韦拉密汀(viramidine)和扎西他滨(zalcitabine)。

[0311] 认为棒状革兰阴性菌的沙门氏菌属(*Salmonella*)的IL-15处理与目前正在开发的疫苗结合最有效的。关于用于治疗恶性疟原虫寄生物的联合疗法,抗疟药(例如,氯喹)和青蒿素在与IL-15肽的联合疗法中可以是有效的。

[0312] 本公开包括上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0313] 剂量

[0314] 本公开的IL-15多肽可以以一定量对受试者施用,所述量取决于例如施用目标(例如,期望的消退程度);接受制剂施用的受试者的年龄、重量、性别、健康和身体状况;施用途径;以及疾病、病症、病况或其症状的性质。给药方案可以考虑与所施用的药剂相关的任何不良反应的存在、性质和程度。有效的剂量和剂量方案可以容易地从例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)以及本领域技术人员已知的其它方法来确定。

[0315] 通常,给药参数决定了剂量的量小于对受试者可以不可逆地有毒性的量(最大耐受剂量(MTD)),并且不小于对受试者产生可测量的影响所需的量。这些量通过例如与ADME相关的药代动力学和药效学参数来确定,考虑到施用途径和其它因素。

[0316] 有效剂量(ED)是在一定分数的服用药剂的受试者中产生治疗响应或期望效果的药剂的剂量或量。药剂的“中值有效剂量”或ED50是在接受其施用的群体的50%中产生治疗响应或期望效果的药剂的剂量或量。虽然ED50通常用作对药剂效果合理预期的量度,但并不一定是考虑到所有相关因素,临床医生认为合适的剂量。因此,在一些情况下,有效量超过计算的ED50,在其它情况下有效量小于计算的ED50,而在其它情况下,有效量与计算的ED50相同。

[0317] 此外,本公开的IL-15分子的有效剂量可以是当对受试者以一个或多个剂量施用时相对于健康受试者产生期望结果的量。例如,对于经历特定病症的受试者,有效剂量可以是所述病症的诊断参数、测量、标志物等改善至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或超过90%的剂量,其中100%定义为正常受试者展现的诊断参数、测量、标志物等。治疗本文所述的疾病、病症或病况必需的IL-15分子的量基于缀合蛋白的IL-15活性,其可

以通过本领域已知的IL-15活性测定法确定。

[0318] IL-15分子的治疗有效量的范围可以为约0.01至约100 μ g蛋白/kg体重/天、约0.1至20 μ g蛋白/kg体重/天、约0.5至10 μ g蛋白质/kg体重/天或约1至4 μ g蛋白/kg体重/天。在一些实施方案中,IL-15分子的治疗有效量的范围可以为约1至16 μ g蛋白/kg体重/天。本公开考虑通过连续输注施用IL-15分子以递送例如约50至800 μ g蛋白/kg体重/天。输注速率可以随着对例如不利影响和血细胞计数的评估而变化。

[0319] 对于口服药剂的施用,组合物可以以片剂、胶囊等形式提供,其含有1.0-1000毫克的活性成分,特别是1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0或1000.0毫克的活性成分。

[0320] 在某些实施方案中,以“单位剂型”含有所公开的IL-15多肽的剂量。短语“单位剂型”是指物理上离散的单位,每个单位含有单独或与一种或多种额外的药剂组合的预定量的本公开的IL-15多肽,足以产生期望的效果。应当理解,单位剂型的参数将取决于具体药剂和待实现的效果。

[0321] 试剂盒

[0322] 本公开还考虑包含IL-15及其药物组合物的试剂盒。试剂盒通常为容纳各种组分的物理结构的形式,如下文所述,并且可以用于例如实施本文所述的方法。

[0323] 试剂盒可以包括本文所公开的一种或多种IL-15多肽(在例如无菌容器中提供),其可以是适合于对受试者施用的药物组合物的形式。IL-15多肽可以以准备使用的形式提供,或者以施用前需要例如重建或稀释的形式提供。当IL-15多肽是需要由使用者重建的形式时,试剂盒还可以包含与IL-15多肽包装或分开的缓冲液、药学上可接受的赋形剂等。当考虑联合疗法时,试剂盒可以单独含有几种药剂,或者它们可以已经被含在试剂盒中。试剂盒的每种组分可以封闭在单独的容器内,并且所有的各种容器可以在单个包装内。本公开的试剂盒可以设计用于适当维持容纳在其中的组分所必需的条件(例如冷藏或冷冻)。

[0324] 试剂盒可以包含标签或包装插页,包括其中组分的鉴定信息及其使用说明(例如,给药参数、活性成分的临床药理学,包括作用机理、药代动力学和药效学、不良反应、禁忌症等)。标签或插页可以包括制造商信息,如批号和失效期。标签或包装插页可以例如集成到容纳组分的物理结构中、单独含在物理结构内,或者固定到试剂盒的组件(例如,安瓿、管或小瓶)。

[0325] 标签或插页可另外包括或并入计算机可读介质,如盘(例如,硬盘、卡、存储盘),光盘,如CD或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带或电存储介质如RAM和ROM或这些杂合物,如磁/光存储介质/FLASH介质或存储器型卡。在一些实施方案中,实际指令不存在于试剂盒中,而是提供用于从远程源获得指令(例如通过因特网)的手段。

[0326] 实施例

[0327] 提出以下实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明的完整公开和描述,而不意图限制发明人视为其发明的范围,它们也不意图表示以下实验是实施的,并且是可以实施的所有实验。应当理解,以现在进行时书写的示例性描述不一定是实施的,而是可以实施描述以产生其中描述的数据等。已经努力确保使用的数字(例如量,温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。

[0328] 除非另有指示,份为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏度($^{\circ}$ C),并且压力

为或接近大气压。

[0329] 使用标准缩写,包括以下:bp=碱基对;kb=千碱基;pl=皮升;s或sec=秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;kb=千碱基;nt=核苷酸;ng=纳克;μg=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;dL或dL=分升;μl或μL=微升;ml或mL=毫升;l或L=升;nM=纳摩尔;μM=微摩尔;mM=毫摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌内;i.p.=腹膜内;s.c.=皮下;QD=每日;BID=每日两次;QW=每周;QM=每月;HPLC=高效液相层析;BW=体重;U=单位;ns=统计学不显著;PBS=磷酸盐缓冲盐水;PCR=聚合酶链式反应;NHS=N-羟基琥珀酰亚胺;DMEM=伊格尔培养基的Dulbeco改良;GC=基因组拷贝;ELISA=酶联免疫吸附测定法;EDTA=乙二胺四乙酸;PMA=佛波酮肉豆蔻酸乙酸酯;rhIL-15=重组人IL-15;LPS=脂多糖。

[0330] 材料和方法

[0331] 可以在下述实施例中使用以下通用材料和方法:

[0332] 描述了分子生物学中的标准方法(参见例如Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;和Ausubel等人(2001) Current Protocols in Molecular Biology,第1-4卷,John Wiley and Sons,Inc.New York,N.Y.,其描述了在细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷)、在哺乳动物细胞和酵母中的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)和生物信息学(第4卷))。

[0333] 科学文献描述了蛋白质纯化的方法,包括免疫沉淀、层析、电泳、离心和结晶,以及化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生和蛋白质的糖基化(参见例如Coligan等人(2000) Current Protocols in Protein Science,第1-2卷,John Wiley and Sons, Inc.,NY)。

[0334] 描述了多克隆和单克隆抗体的生产、纯化和片段化(例如,Harlow和Lane (1999) Using Antibodies,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY);用于表征配体/受体相互作用的标准技术是可用的(参见例如Coligan等人(2001) Current Protocols in Immunology,第4卷,John Wiley,Inc.,NY);用于流式细胞术(包括荧光激活细胞分选(FACS))的方法是可用的(参见例如,Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons,Hoboken,NJ);适用于修饰核酸,包括核酸引物和探针、多肽和抗体的荧光试剂(例如用作诊断试剂)是可用的(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR.;Sigma-Aldrich (2003) Catalogue,St.Louis,MO.)。

[0335] 描述了免疫系统的组织学的标准方法(参见例如Louis等人(2002) Basic Histology:Text and Atlas,McGraw-Hill,New York,NY)。

[0336] 免疫细胞(CD4⁺和CD8⁺T-细胞)的消减可以通过抗体介导的消除来实现。例如,可以每周注射250μg的CD4-或CD8-特异性抗体,并使用FACS和IHC分析来验证细胞消减。

[0337] 用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库是可用的(参见例如GCG Wisconsin包(Accelrys,Inc.,San Diego,CA);以及DeCypher™(TimeLogic Corp.,Crystal Bay,NV)。

[0338] 免疫感受态Balb/C或B细胞缺陷型Balb/C小鼠可以从The Jackson Lab.,Bar Harbor,ME获得,并且可以按照标准程序(参见例如Martin等人(2001) Infect.Immun.,69

(11):7067-73和Compton等人(2004) Comp. Med. 54 (6):681-89)使用。适用于本公开考虑的实验工作的其它小鼠品系是熟练技术人员已知的,并且通常可从The Jackson Lab获得。熟练技术人员熟悉也可以用于本公开的实施例中的模型和细胞系(例如,炎症模型)。

[0339] 血清IL-15浓度水平和暴露水平可以通过本领域中使用的标准方法测定。例如,可以如下进行血清暴露水平测定法:通过将来自小鼠尾巴剪断的全血(约50 μ L/小鼠)收集到普通毛细血管,通过离心分离血清和血细胞,并通过标准ELISA试剂盒(例如R&D Systems)和技术测定IL-15暴露水平。可替代地或另外地,以下描述的ELISA方案(或类似方案)可以适合于测量人IL-15的血清水平,作为确定突变蛋白或经修饰的突变蛋白的体内半衰期的手段。

[0340] 突变蛋白的产生与评估

[0341] 人IL-15表达载体pSecTag2hygro-huIL15的装配。可以通过使用Platinum Pfx DNA聚合酶(Life Technologies#11708-039,按照制造商的方案),使用pCMV6-AC-人-IL15(Origene#SC324164,G enbank登录#NM_000585.4)作为DNA模板和引物5'-tataGGCCCAGC CGGCCgcccgcaccATGAGAATTTTCGAAACCACATTTGAG-3'(SEQ ID NO:34)和5'-tatagggccctCAAGAAGTGTGATGAACATTTGG-3'(SEQ ID NO:35)经由PCR扩增完整的人IL-15开放阅读框装配人IL-15哺乳动物表达载体,并且可以使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen#28106)扩增所得PCR反应。可以用SfiI和ApaI(New England Biolabs,Ipswich, MA)在37 $^{\circ}$ C将纯化的人IL-15PCR片段和哺乳动物表达载体pSecTag2hygro(B)(Life Technologies#V910-20)消化1小时,其中对pSecTag2hygro(B)消化添加牛肠磷酸酶(New England Biolabs,Ipswich,MA)。可以在100V下在1%琼脂糖凝胶(Lonza#54803)上将消化的DNA片段运行1小时,然后使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen#28706)进行切割和纯化。可以使用快速DNA连接试剂盒(Rockwell#11635379001)将人IL-15PCR片段连接到pSecTag2hygro(B)载体中,转化到One Shot TOP10化学感受态大肠杆菌(Life Technologies#C404006)中,铺板到含有100 μ g/mL氨苄西林的琼脂平板,并在37 $^{\circ}$ C下培养过夜。次日,可以单独挑取细菌菌落,并置于含有LB+100 μ g/mL氨苄西林的3mL培养物中,并在37 $^{\circ}$ C下,在摇动培养箱中以200RPM培养8-20小时。然后,将两(2)mL的每种培养物等分到2mL管中,将细胞以6000RPM在台式离心机中沉淀10分钟,吸出培养基,并使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒(Qiagen#27106)从细菌中纯化出DNA。可以通过DNA测序(MC Lab,South San Francisco,CA)鉴定正确的表达载体。

[0342] 产生突变蛋白表达载体。使用Quikchange II位点定向诱变试剂盒(Agilent Technologies#200524),按照具有以下澄清的制造商的方案将前述的人IL-15哺乳动物表达载体pSecTag2hygro-huIL-15突变来装配人IL-15突变蛋白表达载体:引物不总是满足推荐的T_m;将PCR反应循环16-18轮,延长时间为6-7分钟;将4 μ L DpnI处理的反应转化为One Shot TOP10化学感受态细胞(Life Technologies#C404006),如先前描述。如先前描述,将三(3)mL微量制备培养物培养、纯化、并且序列验证。对于一些突变蛋白,培养400mL培养物并纯化。简言之,将1个细菌菌落挑取到400mL LB+100 μ g/mL氨苄西林中,并在摇动培养箱中以200RPM在2L挡板锥形瓶中在37 $^{\circ}$ C下培养12-20小时。然后,将培养物在离心机(在JA-10转子中在Beckman Avanti J-25T中6000RPM,持续20分钟)中沉淀,吸出培养基,并且使用EndoFree Plasmid Mega试剂盒(Qiagen,#12381),按照制造商的方案(具有非常小的变化,

具有熟练技术人员熟悉的类型,对DNA沉淀方法做出以提高最终DNA浓度)提取DNA。

[0343] 通过一次插入一个突变装配需要多个氨基酸变化的突变蛋白。引入N-糖基化基序N-X-S和N-X-T有时需要引入三个突变,因为X≠P(脯氨酸)。用于突变蛋白的编号约定将起始密码子分配为第一个位置,因此前48个残基(MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEA (SEQ ID NO:36))包含信号肽,并且成熟蛋白的第一个残基将是天冬酰胺碱49。

[0344] 蛋白质转染方案。可以在HEK293FT细胞(Life Technologies#R700-07)中瞬时表达所有人IL-15表达载体(野生型和突变蛋白)。可以在37℃下在5%CO₂在T175烧瓶(Greiner One/CellStar#660175)中在50mL DMEM(Life Technologies#11995-073)+10%表征的胎牛血清(Hyclon/Thermo Scientific#SH30071.03)+1X青霉素/链霉素(Life Technologies#15140-122)中维持细胞。达到汇合后,可以用10mL PBS+5mM EDTA分离细胞,再用10mL生长培养基收集细胞,在离心机(Beckman Allegra 6R)中以1000RPM沉淀,吸出培养基,将细胞重悬浮于新鲜培养基中,然后在三个各含有45mL生长培养基的T175烧瓶之间分开。

[0345] 可以将所有表达载体转染到6孔板或T175烧瓶中。对于6孔板转染,可以从汇合的T175烧瓶中收获Hek293FT细胞,如先前所述收集细胞,然后重悬于20mL新鲜生长培养基中。可以在含有2mL新鲜培养基的6孔板(Falcon#353046)的每个孔中添加七百(700)μL细胞悬浮液,并且如上所述培养过夜。次日,可以使用以下方案使用Lipofectamine 2000(Life Technologies#1388795)转染细胞:可以将250μL OptiMEM I还原血清培养基(Life Technologies#31985-088)等分到两个Eppendorf管,然后将10μL Lipofectamine 2000转染试剂(Life Technologies#1388795)加入到一个等分试样,并将4μg DNA加入另一个。可以在室温下将两种溶液分开温育5分钟,然后可以通过将两种溶液组合并在室温下将它们再温育30分钟来形成转染复合物。然后,可以将完整的500μL混合物逐滴加入6孔板的1个孔,并且返回培养箱4小时。然后,可以将转染培养基吸出并用DMEM+青霉素/链霉素替换,并且培养约36小时。然后,可以收获条件化培养基,并在4℃下储存。然后,可以如上所述转染T175烧瓶,区别在于:转染前可将具有42-45mL生长培养基的T175烧瓶培养至95%汇合,并且可以通过将175μL Lipofectamine 2000加入到4.4mL OptiMEM I并且将75-100μL DNA加入到第二份4.4mL OptiMEM I形成转染复合物。抽吸转染复合物后,可向每个烧瓶加入50mL培养基。

[0346] 模拟转染可以含有空的pSecTag2hygro(B)表达载体或没有DNA,并且可以如前所述制备。

[0347] 人IL-15检测ELISA。可以在4℃下用100μL/孔PBS+1μg/mL抗人IL-15抗体(例如ATCC HB-12062,克隆M111,Manassas,VA)将96孔板(Nunc Maxisorp#442404)包被过夜,在DPBS-Tween 20(Teknova#P0297)中清洗6X 200μL,并且在室温下在摇摆平台上在200μL/孔PBS+5%BSA(Calbiochem#2960)中封闭2小时,并且如先前描述的那样清洗。可以在PBS中连续稀释样品,并将100μL/孔加入到测定板中。可以一式两份或一式三份运行样品。作为阳性对照,可以掺入纯化的人IL-15,而缓冲液或来自模拟转染的条件化培养基可以用作阴性对照,并且两者都连续稀释。可以在4℃下在摇摆平台上温育样品过夜,然后如前所述清洗。可以向每个孔加入100μL/孔的PBS+抗人IL-15抗体(例如,ab7213;Abcam),在摇摆平台上室温

温育1小时,如前所述清洗,然后可以加入100 μ L/孔驴抗兔IgG (H+L) -HRP (Jackson Immuno Research#711-035-152,以1:10,000稀释),并在室温下在摇摆平台上再温育1小时。可以如所述清洗板,并且用100 μ L/孔的1-Step Ultra TMB-ELISA (Pierce/Thermo#34029) 显现1-5分钟,然后用100 μ L/孔停止溶液 (Life Technologies#SS04) 停止反应。可以在450nm在Molecular Devices M2读板器上读板。

[0348] 另一种ELISA形式可以包括预制试剂盒(例如,按照在人IL-15Quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems#D1500,Minneapolis,MN)中制造商推荐的方案)。

[0349] 野生型和突变蛋白人IL-15的纯化。可以将抗人IL-15抗体(例如ATCC HB-12062,克隆M111,Manassas,VA)缀合到CNBr活化的Sepharose 4Fast Flow (GE Healthcare#71-5000-15AF,按照制造商的方案),并且在PBS中平衡。可以在玻璃Econo柱(Bio-Rad,Hercules,CA)中含有的每100mL条件化培养基中珠粒化500 μ L-1mL的M111-Sepaharose,并在室温下在摇摆平台上温育1-2小时。可以通过重力流将培养基运行通过柱,用1X PBS (pH 7.4) 清洗1次,用0.1M甘氨酸 (pH 2.9) 洗脱,并用10%体积的1M Tris缓冲液 (pH8.0) 中和。可以使用Amicon超离心过滤装置 (Millipore,Billerica,MA;5,000kD分子量截留) 将蛋白质浓缩并缓冲液交换到PBS (pH 7.4) 中。可以通过分光光度计在280nm处测定蛋白质浓度。

[0350] SEC分析蛋白。使用1100系列HPLC (Agilent Technologies,Santa Clara,CA),可将20-50 μ g蛋白质注射到用PBS (pH7.4) 平衡的TSK3000sw柱 (Tosoh Biosciences,Tokyo,JP) 上,并以流速1mL/min运行。

[0351] IL-15的聚乙二醇化

[0352] 可以在pH 4-8的50mM磷酸盐及100mM NaCl中将PEG (NOF Corporation,Japan) 稀释至10-100mg/mL的浓度,并且可以在PBS, pH 7.4中将人IL-15稀释至2-10mg/mL的浓度。最终反应混合物可以包括10:1至2:1比率范围 (PPA PEG:人IL-15) 的PEG和人IL-15,和终浓度5-50mM的氰基硼氢化钠。反应可以在4 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C下温育2至48小时。为了选择期望的蛋白质种类和/或缓冲液交换,可以通过SEC (如前所述) 分级聚乙二醇化蛋白质,或者为了消除聚乙二醇化反应混合物和/或缓冲液交换中的大多数非蛋白质种类,PEG-IL-15反应混合物可进行超滤步骤(例如,Millipore Labscale TFF系统可与具有5kDa分子量截留的再生纤维素 (PLCGC) 膜一起使用)。

[0353] 测定IL-15的修饰形式的生物活性的测定法

[0354] 本公开考虑使用本领域已知的任何测定法和方法来测定本文所述的IL-15分子的生物活性。下文描述的测定法是代表性的,而不是排他性的。

[0355] CTLL-2细胞增殖测定法。Soman等人 (J Immunol Methods348 (1-2):83-94 (2009年8月31日)) 描述了使用可溶性CellTiter96Aqueous One Reagent (Promega;Madison,WI) 的CTLL-2细胞的优化的基于四唑染料的比色细胞增殖测定法定量评估IL-15生物活性。CTLL-2是依赖IL-2的鼠细胞系。

[0356] 本文中使用与Soman等人描述的测定法基本上相似的CTLL-2细胞增殖测定法测定IL-15生物活性。简言之,将CTLL-2细胞 (ATCC TIB-214,Manassas,VA) 在补充有10%FBS和10%T-STIM (Corning#354115,Tewsbury,MA) 的RPMI 1640 (Life Technologies,11875-093,Grand Island,NY) 中培养。在37 $^{\circ}$ C在补充5%CO₂的情况下以10,000个细胞/mL-100,000个细胞/mL的密度维持细胞,并且当它们以对数期生长(通常在解冻后2-3周;细胞活力

≥95%)时收获,并用20mL无T-STIM的生长培养基清洗4次(通过以1000rpm离心5分钟)。然后,将100μL无T-STIM的生长培养基中的25,000个细胞/孔等分到透明的96孔组织培养板中,并且在稀释蛋白质的情况下返回到培养箱。将IL-15样品在测定培养基中稀释至初始浓度8ng/mL,然后连续两倍稀释,然后将100μL加入到96孔组织培养板的孔并返回到37℃,5%CO₂培养箱达48小时。在48小时温育期后,加入CellTiter96®Aqueous One Solution(20μL/孔),并将悬浮液在37℃和5%CO₂下再温育1-4小时。在490nm读板,并从样品孔读数中减去具有培养基的孔中的背景读数。

[0357] M07e细胞增殖测定法。Kanakura等人(Blood 76(4):706-15(1990年8月15日)); Caliceti等人(PLoS One 7(7):e41246.doi:10.1371/journal.pone.0041246(2012)); 和 Zauner等人(BioTechniques 20:905-13(1996年5月))描述了使用M07e(人巨核细胞白血病细胞系,其增殖是IL-3或GM-CSF依赖性的)细胞增殖测定法。M07e细胞可以从DSMZ(DSMZ编号ACC 104;Braunschweig,Germany)购买。

[0358] 可以在补充有10%FBS、rhGM-CSF(10ng/mL)或rhIL-3(10ng/mL)的RPMI 1640培养基(Gibco,Grand Island,NY)中培养M07e细胞系;或者,可以在补充有5%FCS和10ng/mL IL3的IMDM中培养细胞。可以使用MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(Sigma)掺入定量因子诱导的M07e细胞增殖。简言之,可以在37℃下在平底微量滴定板(100μL/孔)中培养M07e细胞一式三份等分试样72小时。对于培养的最后4小时,可以加入MTT(10μL在PBS中的5mg/mL MTT溶液)。在72小时时,可以将100μL酸性异丙醇(异丙醇中的0.04N HCl)加入到所有孔,混合,并在微ELISA读数器上在540nm测量光密度。

[0359] CD8+/CD4+T细胞测定法。当用PEG-IL-15处理时,活化的原代人CD8+和CD4+T细胞分泌IFNγ、粒酶B、穿孔蛋白和TNFα。以下方案提供了用于筛选这些细胞因子的产生的示例性测定法。可以根据任何标准方案(参见例如Fuss等人(2009)Current Protocols in Immunology,Unit 7.1,John Wiley,Inc.,NY)分离人原代外周血单核细胞(PBMC)。可以用含有RPMI(Life Technologies;Carlsbad,CA)、10mM HEPES(Life Technologies;Carlsbad,CA)、10%胎牛血清(Hyclone Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)和青霉素/链霉素混合物(Life Technologies;Carlsbad,CA)的完全RPMI,或在AIM-V无血清培养基(Life Technologies#12055-083)中,在任何标准培养处理的6孔板(BD;Franklin Lakes,NJ)中在具有5%CO₂的湿润37℃培养箱中每孔培养2.5mL PBMC(以1000万个细胞/mL的细胞密度)。可以使用Miltenyi Biotec的MACS细胞分离技术根据制造商的方案(Miltenyi Biotec;Auburn,CA)分离CD8+和CD4+T细胞。可以通过用抗CD3和抗CD-28抗体(Affymetrix eBioscience;San Diego,CA)包被24孔组织培养板(Costar#3526,Corning, NY)并且通过加入1ml AIM-V培养基中的3E6个细胞/孔来激活T细胞。可以如所述培养细胞3天,然后收集并以2E6个细胞/mL的密度重悬浮于新鲜的AIM-V中,并将250μL/孔等分到96孔组织培养板(Falcon#353072,Corning,NY)。可以连续稀释人PEG-IL-15并以1μg/mL至0.01ng/mL的终浓度加入到孔;可以在具有5%CO₂的湿润的37℃培养箱中温育细胞3天。然后,可以收集培养基,并且使用商业ELISA试剂盒并按照制造商的方案(例如,Affymetrix Bioscience;San Diego,CA或R&D Systems,Minneapolis,MN)测定IFNγ、粒酶B、穿孔蛋白和/或TNFα。

[0360] NK细胞测定法。人NK细胞可以从PBMC细胞(先前描述的方案;在完全RPMI中培养)

中分离,并且根据制造商的方案(Miltenyi Biotech;Auburn,CA)使用Miltenyi Biotec的MACS细胞分离技术类似地分离。可以生长和培养细胞(如对T细胞所述,使用完整的RPMI),在250 μ l完全RPMI中以5E5个细胞/孔在96孔组织培养板(Falcon#353072,Corning,NY)中接种。在生长1-3天后,可以如对T细胞所述测定培养基。

[0361] 肿瘤模型和肿瘤分析

[0362] 可以使用任何公认的肿瘤模型、测定法等评价本文所述的IL-15分子对各种肿瘤的影响。下文描述的肿瘤模型和肿瘤分析是可以利用的肿瘤模型和肿瘤分析的代表。

[0363] 每个肿瘤接种,以 10^4 、 10^5 或 10^6 个细胞皮下或皮内注射同基因小鼠肿瘤细胞。可以使用Ep2乳腺癌、CT26结肠癌、PDV6鳞状皮肤癌和4T1乳腺癌模型(参见例如Langowski等人(2006)Nature442:461-465)。可以使用免疫感受态Balb/C或B细胞缺陷型Balb/C小鼠。可以将PEG-mIL-15施用于免疫感受态小鼠,而PEG-hIL-15处理可以在B细胞缺陷型小鼠中。在治疗开始之前,允许肿瘤达到100-250mm³的大小。IL-15、PEG-mIL-15、PEG-hIL-15或缓冲液对照在远离肿瘤植入的部位皮下施用。通常使用电子测径器每周两次监测肿瘤生长。

[0364] 在各种终点收获肿瘤组织和淋巴器官以测量许多炎症标志物的mRNA表达,并对几种炎性细胞标志物进行免疫组织化学。将组织在液氮中快速冷冻并储存在-80℃。通常使用电子测径器每周两次监测原发性肿瘤生长。可以使用公式(宽度²x长度/2)计算肿瘤体积,其中长度是较长的尺度。在开始处理前,允许肿瘤达到90-250mm³的大小。

[0365] 本文描述了本发明的具体实施方案,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读前述内容后,所公开的实施方案的描述、变化对于本领域技术人员来说可变得显而易见,并且预期熟练技术人员可以适当采用此类变化。因此,意图以与本文具体描述的方式不同的方式实施本发明,并且本发明包括根据适用法律允许的所附权利要求中所述的主题的所有修改和等同方案。此外,除非本文另有说明或根据背景明显矛盾,否则本发明涵盖了其所有可能变化的上述要素的任何组合。

[0366] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其它参考文献通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请具体和单独地指明通过引用并入本文一样。

序列表

<110> S·麦考利

<120> 白介素-15组合物及其用途

<130> ACIR-001W0

<150> US 62/063,784

<151> 2014-10-14

<160> 41

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1           5           10           15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
           20           25           30
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
           35           40           45
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
           50           55           60
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65           70           75           80
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
           85           90           95
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
           100          105          110
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
           115          120          125
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
           130          135          140
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145          150          155          160
Thr Ser

```

<210> 2

<211> 135

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

```

Met Val Leu Gly Thr Ile Asp Leu Cys Ser Cys Phe Ser Ala Gly Leu
1           5           10           15
Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys
           20           25           30
Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr
           35           40           45
Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
           50           55           60
Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
65           70           75           80
His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
           85           90           95
Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
           100          105          110
Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
           115          120          125
Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
           130          135

```

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1           5           10           15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
           20           25           30
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
           35           40           45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
           50           55           60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65           70           75           80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
           85           90           95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
           100          105          110
Thr Ser

```

<210> 4

<211> 489

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

```

atgagaatTTT cGaaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
ctaaacagtc atttttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120
gcagggttc ctaaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180
gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240
cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300
gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360
agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
gaaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480
acttcttga                                         489

```

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

```

atggtattgg gaaccataga tttgtgcagc tgtttcagtg cagggttcc taaaacagaa 60
gccaaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 120
catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 180
atgaagtgct ttctcttggg gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtatt 240
catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaaacaaca gtttgtcttc taatgggaat 300
gtaacagaat ctggatgcaa agaatgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaatTTT 360
ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttcttga                                         408

```

<210> 6

<211> 345

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

```

aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 60
attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
aagtgttttc tcttggagtt acaagttatt tcaattgagt ccggagatgc aagtattcat 180
gatacagtag aaaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240
acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg 300
cagagttttg tacatatgtt ccaaagtgtc atcaacactt cttga                                         345

```

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Ala

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Arg Gly Arg Arg

1

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Arg Lys Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Arg Lys Lys Arg

1

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Arg Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Ser可以重复n次,其中n是至少1的整数。

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Ser可以重复n次,其中n是至少1的整数。
<400> 23
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> Gly可以重复m次,其中m是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 1-5位可以重复n次,其中n是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Ser可以重复o次,其中o是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> Gly可以重复m次,其中m是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Ser可以重复o次,其中o是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Gly可以重复m次,其中m是至少1的整数。
<400> 24

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 1-5位可以重复n次,其中n是至少1的整数。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Ser可以重复m次,其中m是至少1的整数。

<400> 25

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 1-5位可以重复n次,其中n是至少1的整数。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Ser可以重复m次,其中m是至少1的整数。

<400> 26

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (4)
<223> 1-4位可以重复n次,其中n是至少1的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Ser可以重复m次,其中m是至少1的整数。
<400> 27
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 28
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 29
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 30

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 34

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 34

tataggccca gccggccgcc gccaccatga gaatttcgaa accacatttg ag 52

<210> 35

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 35

tatagggccc tcaagaagtg ttgatgaaca tttgg 35

<210> 36

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala

35 40 45

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 38

Asp Thr Val Glu Asn Leu

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 39

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

1 5

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

Arg Gly Val Phe Arg Arg

1 5

1A. IL-15 长信号肽 (LSP) 蛋白 (登录号 BC018149.2) (SEQ ID NO:1)

MRISKPHILRSISIQCYLCLLNSHFLTEAGIHVFEILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSM
HIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLHILANNSLSSNGNVTESGC
KECEHEEEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS

1B. IL-15 短信号肽 (SSP) 蛋白 (登录号 BC100962.1) (SEQ ID NO:2)

MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES
GDASIHDTVENLHILANNSLSSNGNVTESGC KECEHEEEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS

1C. 成熟人 IL-15 蛋白 (SEQ ID NO:3)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVEN
LHILANNSLSSNGNVTESGC KECEHEEEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS

图 1A-1C

2A. 长信号肽 (LSP) cDNA 开放阅读框 (ORF) (登录号 BC018149.2)
(SEQ ID NO:4)

atgagaatttcgaaccacaattgagaagatitccatccagtgctacttggttacttctaaccagtcatttctaactgaagctggcattcatgtctcatttg
ggctcttfcagtcagggtcttctaaacagaagccaaactgggtgaatgtaataagtgattgaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcataatgatg
ctactttatfacggaaagtgatgttcaacccagttgcaaaagtaacagcaatgaagtgcttctcttggagttacaagttattcacttgagtcggagatgca
agtattcatgatacagtagaaaatctgacatccctagcaacaacagttgtcttctaattgggaatgtaacagaatctggatgcaagaatgtgagggaactg
gaggaaaaaataftaaagaattttgcagagttttgtacataatgtccaaatgttcatcaacacttcttga

2B. 短信号肽 (SSP) cDNA 开放阅读框 (ORF) (登录号 BC100962.1)
(SEQ ID NO:5)

atggtatitgggaaccatagatttgcagcgtttcagtgccagggtcttctaaacagaagccaaactgggtgaatgtaataagtgatttga
aaaattgaagatcttattcaatctatgcataatgatgctactttatatacggaaagtgatgttcaacccagttgcaaaagtaacagcaatgaagtg
cttctcttggagttacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgacatcctagcaaacacagttt
gtcttctaattgggaatgtaacagaatctggatgcaagaatgtgagggaactggaggaaaaaataftaaagaattttgcagagttttgtacat
attgtccaaatgttcatcaacacttcttga

2C. 编码成熟人 IL-15 蛋白的核酸序列 (SEQ ID NO:6)

aaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcataatgatgctactttatatacggaaagtgatgttcaacccagttgc
aaagtaacagcaatgaagtgcttctcttggagttacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgacatccctagc
aaacaacagttgtcttctaattgggaatgtaacagaatctggatgcaagaatgtgagggaactggaggaaaaaataftaaagaattttgcagagttttgt
acataatgtccaaatgttcatcaacacttcttga

图 2A-C

结构基序	螺旋 A																														A/B 环																			
氨基酸	N	W	V	V	N	V	I	S	D	L	K	K	I	E	D	L	I	Q	S	M	H	I	D	A	T	L	Y	T	E	S	D																			
残基#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30																				
结构基序	螺旋 B																														B/C 转角										螺旋 C									
氨基酸 位置	V	H	P	S	C	R	V	T	A	M	K	C	F	L	L	E	L	Q	V	I	S	L	E	S	G	D	A	S	I	H																				
潜在PEG位点	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60																				
结构基序	螺旋 C																														C/D 环										螺旋 D									
氨基酸 位置	D	T	V	E	M	L	I	I	L	A	N	N	S	L	S	S	N	G	N	V	T	E	S	G	C	K	E	C	E	E																				
潜在PEG位点	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90																				
结构基序	C/D 环																														螺旋 D										螺旋 E									
氨基酸 位置	L	E	E	K	N	I	K	E	F	L	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S																										
潜在PEG位点	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120																				

图3

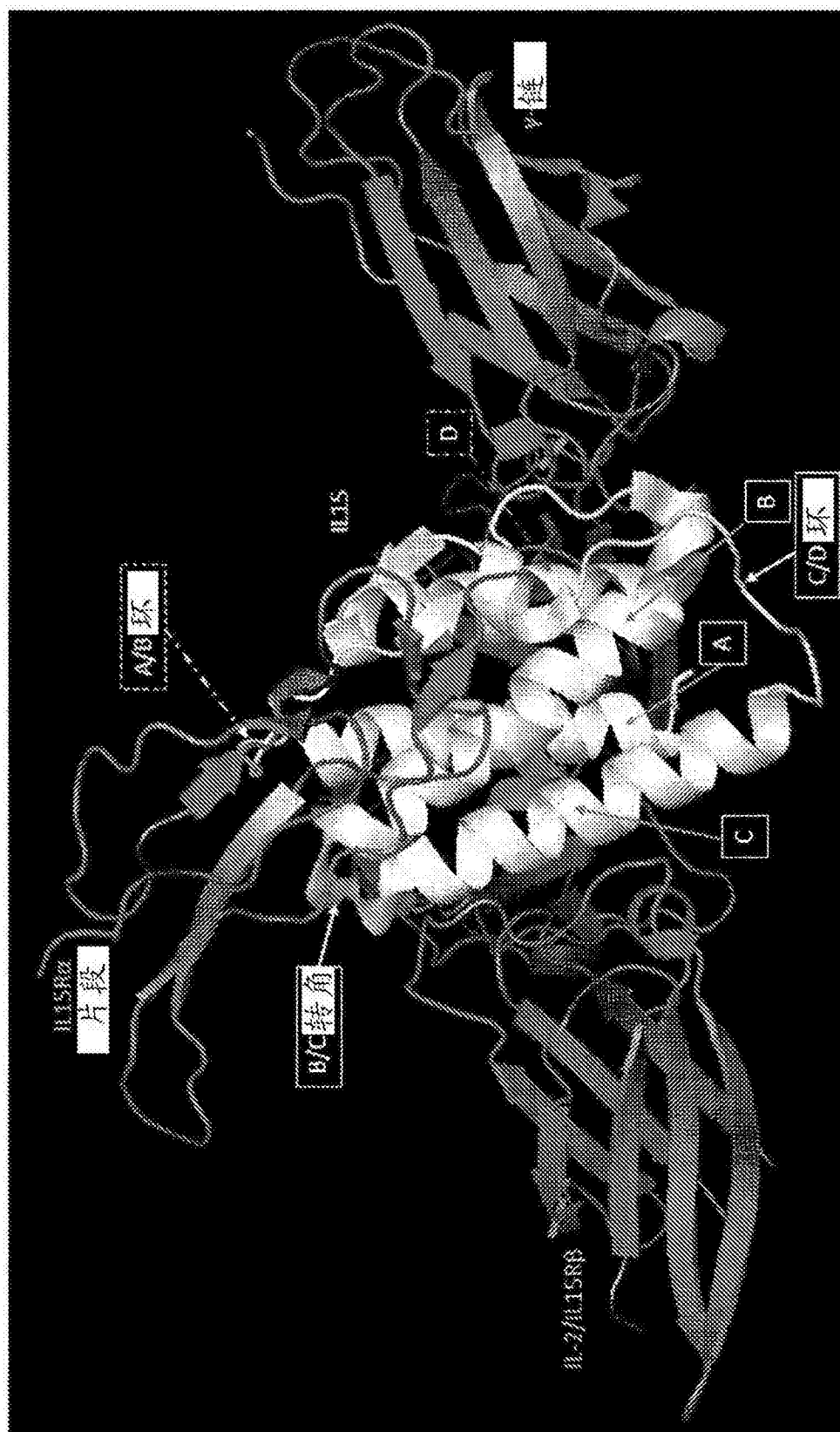


图4A

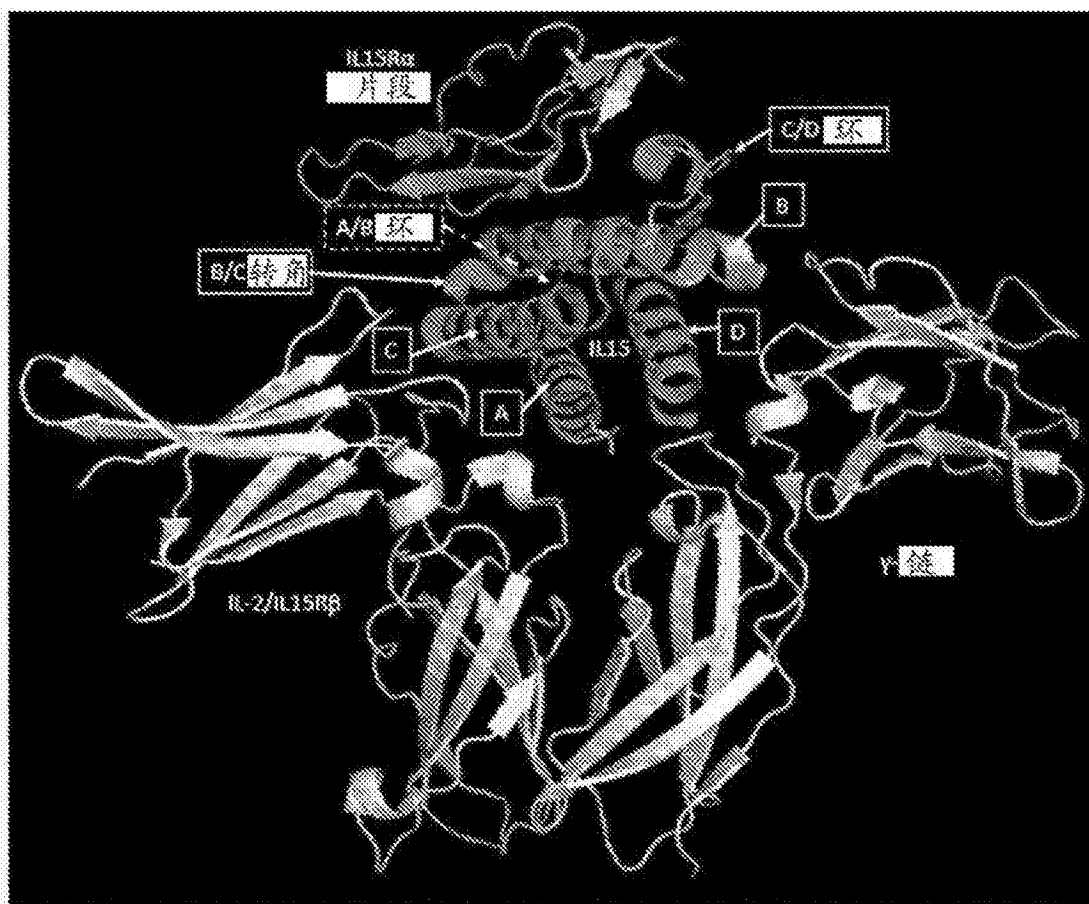


图4B

结构基序		螺旋 A										A/B 环																				
氨基酸 位置	潜在PEG 位点	N	W	V	N	V	I	S	D	L	K	K	I	E	D	L	I	Q	S	M	H	I	D	A	T	L	V	T	E	S	D	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
潜在PEG 位点		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
结构基序		螺旋 B										B/C 转角										螺旋 C										
氨基酸 位置	潜在PEG 位点	V	H	P	S	C	K	V	T	A	M	K	C	F	L	I	E	L	Q	V	I	S	L	E	S	G	D	A	S	I	H	
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
潜在PEG 位点		-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
结构基序		螺旋 C										C/D 环										C/D 环										
氨基酸 位置	潜在PEG 位点	D	T	V	E	N	L	I	I	L	A	M	N	S	L	S	S	N	G	N	V	T	E	S	G	C	K	K	E	C	E	
		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
潜在PEG 位点		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
结构基序		C/D 环										螺旋 D										螺旋 D										
氨基酸 位置	潜在PEG 位点	L	E	E	K	N	I	K	E	F	L	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S							
		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114							
潜在PEG 位点		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

图5

螺旋 A										螺旋 B										螺旋 C										
结构	成熟蛋白	Y	C	W	S	W	Y	Y	A/B 环	结构	成熟蛋白	Y	C	W	S	W	Y	A/B 环	螺旋 B	结构	成熟蛋白	Y	C	W	S	W	Y	A/B 环	螺旋 C	
成熟蛋白	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	成熟蛋白	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	成熟蛋白	M3	+	+	+	+	+	+	+	+
	Y	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+
	S	+	+	+	+	+	+	+	+		S	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	S	+	+	+	+	+	+	+
螺旋 A	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 A	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 A	M3	+	+	+	+	+	+	+	+
	Y	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+
	S	+	+	+	+	+	+	+	+		S	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	S	+	+	+	+	+	+	+
螺旋 B	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 B	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 B	M3	+	+	+	+	+	+	+	+
	Y	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+
	S	+	+	+	+	+	+	+	+		S	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	S	+	+	+	+	+	+	+
螺旋 C	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 C	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	螺旋 C	M3	+	+	+	+	+	+	+	+
	Y	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+	+		C	+	+	+	+	+	+	+	+
	W	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+	+		W	+	+	+	+	+	+	+	+
	S	+	+	+	+	+	+	+	+		S	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	S	+	+	+	+	+	+	+

图6A

螺旋 C		螺旋 D										螺旋 E	
结构		101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
成熟蛋白		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-T		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

螺旋 D		螺旋 E										螺旋 F	
结构		113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
成熟蛋白		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-T		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

螺旋 E		螺旋 F										螺旋 G	
结构		125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
成熟蛋白		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-X-T		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

图6B