



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105612175 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201480052636. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 08. 08

C07K 14/54(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/715(2006. 01)

13003963. 9 2013. 08. 08 EP

C12N 15/62(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/002181 2014. 08. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/018528 EN 2015. 02. 12

(71) 申请人 赛腾制药

地址 法国南特市普莱索尔切纳路 3 号

申请人 雷卡尔巴黎大学

公共救济事业局 - 巴黎医院

(72) 发明人 A·盖伊 E·塔托尔 D·贝查德

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理

事务所(普通合伙) 11382

代理人 曹津燕 张伟

权利要求书1页 说明书23页

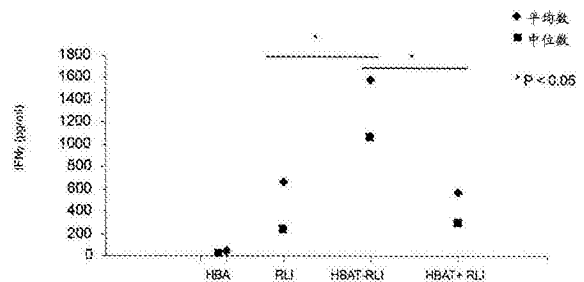
序列表33页 附图1页

(54) 发明名称

基于 IL-15 和 IL-15R α sushi 结构域的调节因子

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫细胞因子,所述免疫细胞因子包含:(a) 缀合物,和 (b) 通过共价键直接或间接连接至所述缀合物的免疫调节抗体或其片段,其中所述缀合物包含:(i) 包含白细胞介素 15 或其衍生物的氨基酸序列的多肽,和包含 IL-15R α 的 sushi 结构域或其衍生物的氨基酸序列的多肽;以及涉及所述免疫细胞因子的用途。



1. 一种免疫细胞因子,所述免疫细胞因子包含:
 - A)缀合物,和
 - B)通过共价键直接或间接连接至所述缀合物的免疫调节抗体或其片段,其中,所述缀合物包含:
 - (i)包含白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列的多肽,和
 - (ii)包含IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的多肽。
2. 根据权利要求1所述的免疫细胞因子,其中所述免疫调节抗体刺激共刺激受体并选自CD40激动剂、CD137激动剂、CD134激动剂和TNFRSF18激动剂。
3. 根据权利要求1所述的免疫细胞因子,其中所述免疫调节抗体抑制免疫抑制受体并选自CTL-A4拮抗剂、抑制性KIR拮抗剂、BTLA拮抗剂、LAG3拮抗剂、HAVCR2拮抗剂、ADORA2A拮抗剂和PD-1拮抗剂。
4. 根据权利要求3所述的免疫细胞因子,其中所述抑制免疫抑制受体的免疫调节抗体选自CTL-A4拮抗剂,优选易普利单抗或ticilimumab。
5. 根据权利要求3所述的免疫细胞因子,其中所述抑制免疫抑制受体的免疫调节抗体选自抑制性KIR拮抗剂,优选1-7F9。
6. 根据权利要求3所述的免疫细胞因子,其中所述抑制免疫抑制受体的免疫调节抗体选自PD-1拮抗剂,优选纳武单抗、Merck 3745或CT-01 1(也称为hBAT)。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的免疫细胞因子,其中
 - a)所述缀合物的多肽i)和多肽ii)在融合蛋白中共价连接;和
 - b)所述缀合物和所述抗体或其片段在融合蛋白中共价连接。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫细胞因子,其中所述白细胞介素15具有氨基酸序列SEQ ID NO:1。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的免疫细胞因子,其中IL-15R α 的sushi结构域具有氨基酸序列SEQ ID NO:4。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的免疫细胞因子,其中所述包含IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的多肽(ii)具有氨基酸序列SEQ ID NO:12。
11. 根据权利要求7所述的免疫细胞因子,其中所述缀合物包含的所述白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列位于相对于所述IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的C-末端位置,并且其中所述缀合物的氨基酸序列位于相对于所述抗体或其片段的氨基酸序列的C-末端位置。
12. 一种编码权利要求1至11中任一项所定义的免疫细胞因子的核酸。
13. 一种包含权利要求12所定义的核酸的载体。
14. 一种采用权利要求12的核酸或权利要求13的载体遗传工程化的宿主细胞,优选地,所述宿主细胞为动物细胞,最优选地为CHO细胞。
15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含最终与药学上可接受的媒介物结合的权利要求1至11中任一项所定义的免疫细胞因子、权利要求12的核酸或权利要求13的载体。
16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗受试者的癌症,优选地,治疗如肾细胞癌(RCC)的晚期癌症。

基于IL-15和IL-15R α sushi结构域的调节因子

[0001] 本国际专利申请要求于2013年8月8日提交的欧洲专利申请EP13003963.9的优先权,该申请以引用的方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及新的“免疫细胞因子”(本文称之为调节因子(modulokine)),及其作为药物的用途,特别是通过活化肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)来治疗癌症。

背景技术

[0003] 脊椎动物的免疫系统需要多种分子和细胞的相互作用来达到抗肿瘤的最佳免疫响应。

[0004] 现在,宿主的抗肿瘤免疫主要受TIL的影响(GALON等,Science,vol.313,p:1960-1964,2006)。事实上,许多证据表明TIL受肿瘤细胞的抑制调节。

[0005] 为了使所述TIL“再活化”,已经设想了多种策略和目标。这些策略基于i)TIL免疫抑制受体(如CTL-A4、PD-1、BTLA、LAG3HAVCR2、ADORA2A或抑制性KIR)的抑制,从而通过防止信号下调来促进免疫活化;或基于ii)TIL共刺激受体(如CD40、4-1BB、OX-40或糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(TNFR)相关蛋白(GITR))的刺激,从而促进T细胞和/或NK细胞的活化。

[0006] 尽管所述疗法提供了一些有前途的结果,但是这些策略的效力似乎是有限的。多数情况下,仅有少数比例的群组(cohort)显示出了恢复的TIL响应。

[0007] 为了获得增强的效力,现设想将上述策略与其他药物或调节剂组合。

[0008] 因此,发明人尝试将上述策略与抗-PD1抗体与公开在专利申请WO2007/046006中的调节剂组合。

[0009] 结果表明,上述组合不能恢复显著部分(即约20%)的自肾细胞癌(RCC)患者中分离的TIL。

[0010] 发明概述

[0011] 现在,发明人还尝试了另外一种组合,即将相同的调节剂与相同的抗体融合从而提供一种新型的免疫细胞因子,称为“调节因子”。惊奇的是,与前述组合相比,这种组合提供了强的TIL再活化,其中观察到了绝大多数的TIL(即约80%)的再活化。

[0012] 这种强的协同作用能够想到新的疗法。

[0013] 因此,本发明涉及一种免疫细胞因子,所述免疫细胞因子包含:

[0014] A)缀合物,和

[0015] B)通过共价键直接或间接连接至所述缀合物的免疫调节抗体或其片段,

[0016] 其中,所述缀合物包含:

[0017] (i)包含白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列的多肽,和

[0018] (ii)包含IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的多肽。

[0019] 第二方面,本发明涉及编码上述免疫细胞因子的核酸。

[0020] 第三方面,本发明提供包含上述核酸的载体。

[0021] 第四方面,本发明涉及采用上述多核苷酸或载体遗传工程化的宿主细胞。本发明还涉及一种生产表达根据本发明的免疫细胞因子的遗传工程化宿主细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(i)体外或离体引入上述核酸或载体至宿主细胞;(ii)体外或离体培养遗传工程化获得的重组宿主细胞,和(iii)可选地,选择表达和/或分泌所述免疫细胞因子的细胞。

[0022] 在优选的实施方案中,所述遗传工程化宿主细胞是动物细胞,优选为CHO细胞。

[0023] 第五方面,本发明提供一种药物组合物,该组合物包含最终与药学上可接受的媒介物(carrier)结合的如上所述的免疫细胞因子、编码该免疫细胞因子的核酸、或包含所述核酸的核酸载体。

[0024] 在优选的实施方案中,所述组合物包含其它治疗剂,优选为抗癌剂。

[0025] 第六方面,本发明涉及用于治疗受试者的癌症的上述药物组合物。

[0026] 第七方面,本发明涉及产品,该产品含有:

[0027] (i)上述免疫细胞因子、编码所述免疫细胞因子的核酸序列、或包含这种核酸序列的载体,和

[0028] (ii)治疗剂,优选抗癌剂,

[0029] 作为用于治疗受试者的癌症的同时、单独或顺序使用的组合制剂。

[0030] 第八方面,本发明涉及用于治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向所述受试者施用上述药物组合物的步骤。

[0031] 最后一个方面,本发明涉及用于治疗癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者同时、单独或顺序地施用治疗有效量的如下物质的步骤:

[0032] (i)上述免疫细胞因子、编码所述免疫细胞因子的核酸序列、或包含这种核酸序列的载体,和

[0033] (ii)治疗剂,优选抗癌剂。

附图说明

[0034] 图1示出了PD-1、Tim-3和IL-15R α 在源自患者A(A)和患者B(B)的TIL中的表达;

[0035] 图2示出了由抗-PD1抗体(HBAT)、RLI、RLI和HBAT的组合(RLI+HBAT)或本发明的调节因子(HBAT-RLI)诱导的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的再活化。

[0036] 发明详述

[0037] 术语“免疫细胞因子”是指包含通过共价键直接或间接连接至细胞因子或其衍生物的抗体或其片段的分子。所述抗体和所述细胞因子可通过连接肽连接。

[0038] 本发明的免疫细胞因子的缀合物

[0039] 术语“白细胞介素15”为其在本领域的一般含义,是指具有类似于IL-2的结构细胞因子(GRABSTEIN等,Science,vol.264(5161),p:965-968,1994)。这种细胞因子也被称为IL-15、IL15或MGC9721。这种细胞因子和IL-2共享许多生物活性,且发现它们结合相同的促红细胞生成素受体亚基。因此,IL-15和IL-12可以竞争相同的受体,从而负调节彼此的活性。已经证实,IL-15调节T细胞和自然杀伤细胞的活化和增殖,且证明CD8+记忆细胞的数量由IL-15这种细胞因子和IL-2之间的平衡来控制。如实施例中所公开的,IL-15的活性可以

通过测定其对kit225细胞系的增殖诱导来测量(HORI等, Blood, vol.70(4), p:1069-72, 1987)。

[0040] 对于kit225细胞系的增殖诱导,所述IL-15或其衍生物具有人白细胞介素-15的活性的至少10%,优选地至少25%,更优选地至少50%。

[0041] 所述白细胞介素15为哺乳动物白细胞介素15,优选地为灵长类动物白细胞介素15,更优选地为人白细胞介素15。

[0042] 本领域技术人员可以简单地识别哺乳动物白细胞介素15。作为实例,可以引用源自野猪(*Sus scrofa*)(登录号:ABF82250)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)(登录号:NP_037261)、小家鼠(*Mus musculus*)(登录号:NP_032383)、牛(*Bos Taurus*)(登录号:NP_776515)、家兔(*Oryctolagus cuniculus*)(登录号:NP_001075685)、绵羊(*Ovis aries*)(登录号:NP_001009734)、家猫(*Felis catus*)(登录号:NP_001009207)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)(登录号:BAA19149)、智人(登录号:NP_000576)、恒河猴(*Macaca Mulatta*)(登录号:NP_001038196)、土拨鼠(*Cavia porcellus*)(登录号:NP_001166300)或绿猴(*Chlorocebus sabaeus*)(登录号:ACI289)的白细胞介素15。

[0043] 本文所用术语“哺乳动物白细胞介素15”是指共有序列SEQ ID NO:1。

[0044] 本领域技术人员可以简单地识别灵长类动物白细胞介素15。作为实例,可以引用源自野猪(登录号:ABF82250)、家兔(登录号:NP_001075685)、食蟹猴(登录号:BAA19149)、智人(登录号:NP_000576)、恒河猴(登录号:NP_001038196)或绿猴(登录号:ACI289)的白细胞介素15。

[0045] 本文所用术语“灵长类动物白细胞介素15”是指共有序列SEQ ID NO:2。

[0046] 本领域技术人员可以简单地识别人白细胞介素15,且所述人白细胞介素15是指氨基酸序列SEQ ID NO:3。

[0047] 本文所用术语“白细胞介素15的衍生物”是指与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少92.5%(即对应于约10个氨基酸置换)、优选地至少96%(即对应于约5个氨基酸置换)、更优选地至少98.5%(即对应于约2个氨基酸置换)或至少99%(即对应于约1个氨基酸置换)同一性百分数的氨基酸序列。本领域技术人员根据其自身的知识及本专利申请的教导可以简单地识别这类衍生物。作为这类衍生物的实例,可以引用国际专利申请PCT WO 2009/135031中描述的那些。还应当理解的是天然的氨基酸可以被化学修饰的氨基酸替换。通常,这种化学修饰的氨基酸增加多肽的半衰期。

[0048] 本文所用术语两个氨基酸序列之间的“同一性百分数”是指通过将进行比较的两个序列的最佳比对获得的所述两个序列之间相同氨基酸的百分数,这一百分数是纯粹统计学意义的且两个序列之间的差异被随机地分布于氨基酸序列中。本文所用“最佳比对”或“最优比对”是指所确定的同一性百分数(参见下文)最高的比对。两个氨基酸序列之间的序列比较通常是通过比较事先已经根据最佳比对来比对过的序列而实现的;这一比较在片段比较中实现,以便识别和比较局部区域的相似性。除通过手动方式之外,实施比较的最佳序列比对可以通过采用由Smith和Waterman开发的局部同源算法(Ad.App.Math., vol.2, p:482, 1981)、由Neddleman和Wunsch开发的全局同源算法(J.Mol.Biol., vol.48, p:443, 1970)、由Pearson和Lipman开发的相似法(Proc.Natl.Acd.Sci.USA, vol.85, p:2444, 1988)、使用这种算法的计算机软件(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST

P、BLAST N、FASTA、TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI USA)、MUSCIE多重比对算法(Edgar,Robert C.,Nucleic Acids Research,vol.32,p:1792,2004)或CLUSTAL(GOUJON等,Nucleic acids research,vol.38,W695-9,2010)来实现。为了获得最佳的局部比对,可以优选使用具有BLOSUM 62矩阵的BLAST软件。两个氨基酸序列之间的同一性百分数是通过比较最佳比对的两个序列确定的,所述氨基酸序列能够包含相对于参考序列的添加或缺失,以便得到两个序列之间的最佳比对。通过以下方法来计算同一性百分数:确定两个序列中相同位点的数量,用该数量除以比较的位点的总数,然后所得结果乘以100,从而得到两个序列之间的同一性百分数。

[0049] 优选地,所述白细胞介素15的衍生物是IL-15激动剂或超激动剂。本领域技术人员能够简单地识别IL-15-激动剂或IL-15-超激动剂。作为IL-15-激动剂或IL-15-超激动剂的实例,可以引用国际专利申请WO 2005/085282或ZHU等(J.Immunol.,vol.183(6),p:3598-607,2009)中公开的那些。

[0050] 进一步优选地,所述IL-15激动剂或超激动剂选自包含下述或由下述组成的组:L45D、L45E、S51D、L52D、N72D、N72E、N72A、N72S、N72Y和N72P(参考人IL-15的序列,SEQ ID NO:3)。

[0051] 本文所用术语“IL-15R α 的sushi结构域”具有其在本领域的一般含义,是指起始于IL-15R α 的信号肽之后的第一个半胱氨酸残基(C1),并终止于所述信号肽之后的第四个半胱氨酸残基(C4)的结构域。对应于IL-15R α 的胞外区域的一部分的所述sushi结构域是其结合至IL-15所必需的(WEI等,J.Immunol.,vol.167(1),p:277-282,2001)。

[0052] 所述IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物具有人IL-15R α 的sushi结构域对人白细胞介素-15的结合活性的至少10%,优选至少25%,更优选至少50%。所述结合活性可以通过WEI等公开的方法(上述提及,2001)简单地确定。

[0053] 所述IL-15R α 的sushi结构域为哺乳动物IL-15R α 的sushi结构域,优选地为灵长类动物IL-15R α 的sushi结构域,更优选地为人IL-15R α 的sushi结构域。

[0054] 本领域技术人员可简单地识别哺乳动物IL-15R α 的sushi结构域。作为实例,可以引用源自褐家鼠(登录号:XP_002728555)、小家鼠(登录号:EDL08026)、牛(登录号:XP_002692113)、家兔(登录号:XP_002723298)、食蟹猴(登录号:ACI42785)、豚尾猴(Macaca nemestrina)(登录号:ACI42783)、智人(登录号:Q13261.1)、恒河猴(Macaca Mulatta)(登录号:NP_001166315)、苏门答腊猩猩(Pongo abelii)(登录号:XP_002820541)、白颈白眉猴(Cercocebus torquatus)(登录号:ACI42784)、普通狨(Callithrix jacchus)(登录号:XP_002750073)或豚鼠(Cavia porcellus)(登录号:NP_001166314)的IL-15R α 的sushi结构域。

[0055] 本文所用术语“哺乳动物IL-15R α 的sushi结构域”是指共有序列SEQ ID NO:4。

[0056] 优选地,包含哺乳动物IL-15R α 的sushi结构域的氨基酸序列的多肽是指共有序列SEQ ID NO:5。

[0057] 本领域技术人员可简单地识别灵长类动物IL-15R α 的sushi结构域。作为实例,可以引用来自家兔、食蟹猴、豚尾猴、智人、恒河猴、苏门答腊猩猩、白颈白眉猴或普通狨的IL-15R α 的sushi结构域。

[0058] 本文所用术语“灵长类动物IL-15R α 的sushi结构域”指共有序列SEQ ID NO:6。

[0059] 优选地,包含灵长类动物IL-15R α 的sushi结构域的氨基酸序列的多肽是指共有序列

列SEQ ID NO:7。

[0060] 本领域技术人员可简单地识别人IL-15R α 的sushi结构域,并且所述人IL-15R α 的sushi结构域是指氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0061] 优选地,包含人IL-15R α 的sushi结构域的氨基酸序列的多肽是指SEQ ID NO:9。

[0062] 本文所用术语“IL-15R α 的sushi结构域的衍生物”是指与选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少92%(即对应于约5个氨基酸置换)、优选地至少96%(即对应于约2个氨基酸置换)、更优选地至少98%(即对应于约1个氨基酸置换)同一性百分数的氨基酸序列。这类衍生物包含L-15R α 的sushi结构域四个半胱氨酸残基,且本领域技术人员根据其自身的一般知识及本专利申请的教导可以简单地识别这类衍生物。还应当理解的是天然的氨基酸可以被化学修饰的氨基酸替换。通常,这种化学修饰的氨基酸能够增加多肽的半衰期。

[0063] 根据优选的实施方案,所述缀合物包含(ii)包含IL-15R α 的sushi和铰链结构域或其衍生物的氨基酸序列的多肽。

[0064] 所述IL-15R α 铰链结构域定义为开始于sushi结构域后的第一个氨基酸残基并终止于第一个糖基化潜在位点前的最后一个氨基酸残基的氨基酸序列。在人IL-15R α 中,所述铰链区的氨基酸序列由十四个氨基酸组成,所述十四个氨基酸位于该IL-15R α 的sushi结构域之后,位于相对于所述sushi结构域的C末端位置,即所述IL-15R α 铰链区开始于所述(C4)半胱氨酸残基后的第一个氨基酸且终止于第十四个氨基酸(以标准的“从N-末端到C-末端”方向计数)。

[0065] 所述IL-15R α 的sushi和铰链结构域为哺乳动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域,优选地为灵长类动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域,更优选地为人IL-15R α 的sushi和铰链结构域。

[0066] 本领域技术人员可简单地识别哺乳动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域的氨基酸序列。本文所用术语“哺乳动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域”是指共有序列SEQ ID NO:10。

[0067] 本领域技术人员可简单地识别灵长类动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域的氨基酸序列。本文所用术语“灵长类动物IL-15R α 的sushi和铰链结构域”是指共有序列SEQ ID NO:11。

[0068] 本领域技术人员可简单地识别人IL-15R α 的sushi和铰链结构域的氨基酸序列。本文所用术语“人IL-15R α 的sushi和铰链结构域”是指共有序列SEQ ID NO:12。

[0069] 本文所用术语“IL-15R α 的sushi和铰链结构域的衍生物”是指与选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少93%(即对应于约5个氨基酸置换)、优选地至少97%(即对应于约2个氨基酸置换)、更优选地至少98%(即对应于约1个氨基酸置换)同一性百分数的氨基酸序列。这类衍生物包含L-15R α 的sushi结构域四个半胱氨酸残基,且本领域技术人员根据其自身的一般知识及本专利申请的教导可以简单地识别这类衍生物。还应当理解的是天然的氨基酸可以被化学修饰的氨基酸替换。通常,这种化学修饰的氨基酸能够增加多肽的半衰期。

[0070] 缀合物的多肽i)和多肽ii)都可以是非共价连接的,例如在专利US8,124,084B2中公开的复合物中。可通过提供合适量的多肽i),提供合适量的多肽ii),在合适的pH和离子

条件下混合这两种多肽足以允许复合物(即缀合物)形成的持续时间,并可选地浓缩或纯化所述复合物,简单地获得所述缀合物或复合物。例如,根据标准方法采用肽合成仪;通过在细胞或细胞提取物中分别表达每种多肽,然后分离和纯化所述多肽,可形成所述复合物(即缀合物)的多肽。可选地,通过在相同细胞或细胞提取物中表达多肽i)和多肽ii),然后例如采用色谱技术,例如具有针对淋巴因子部分、淋巴因子受体部分或复合物的抗体的亲和色谱,分离和纯化该复合物,可形成本发明的治疗性多肽复合物。

[0071] 缀合物的多肽i)和多肽ii)还可以是采用双功能蛋白质偶联剂或在融合蛋白中共价连接的。

[0072] 双功能蛋白质偶联剂是本领域技术人员所熟知的,如使用它们的方法,并且所述双功能蛋白质偶联剂包括例如N-琥珀酰亚胺基(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(iminothiolane)(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如盐酸二甲基己二酰亚胺)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酸亚胺)、醛(例如戊二醛)、双-叠氮化合物(例如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0073] 术语“融合蛋白”指通过连接最初编码单独的蛋白质的两个或更多个基因产生的蛋白质。其也被称为嵌合蛋白。这种融合基因的翻译产生具有衍生自每种初始蛋白的功能特性的单一多肽。通过应用于生物学研究或治疗的DNA重组技术人工产生重组融合蛋白。重组融合蛋白是通过融合基因的遗传工程化产生的蛋白质。这通常涉及从编码第一个蛋白质的cDNA序列中移除终止密码子,然后通过连接PCR或重叠延伸PCR在框架中附加第二个蛋白质的cDNA序列。然后,由细胞将该DNA序列表达为单一蛋白质。所述蛋白质可以工程化为包括两种初始蛋白质的全序列或任一个初始蛋白质序列的仅一部分。

[0074] 在一个优选的实施方案中,所述缀合物为融合蛋白。

[0075] 白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列可以位于相对于IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的C-末端或N-末端位置。优选地,白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列位于相对于IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列的C-末端位置。

[0076] 白细胞介素15或其衍生物的氨基酸序列与IL-15R α 的sushi结构域或其衍生物的氨基酸序列可被第一“连接子”氨基酸序列隔开。所述第一“连接子”氨基酸序列可以具有足以确保融合蛋白形成合适的二级和三级结构的长度。

[0077] 在不显著影响融合蛋白生物活性的情况下,第一连接子氨基酸序列的长度是可以变化的。通常,所述第一连接子氨基酸序列包含至少1个、但是少于30个氨基酸,如2-30个氨基酸的连接子,优选10-30个氨基酸的连接子,更优选15-30个氨基酸的连接子,进一步优选15-25个氨基酸的连接子,最优选18-22个氨基酸的连接子。

[0078] 优选的连接子氨基酸序列是那些允许所述缀合物采用合适构象的序列(即允许通过IL-15R β / γ 信号传导通路的合适的信号传导活动的构象)。

[0079] 最合适的第一连接子氨基酸序列(1)将采用柔性延伸构象,(2)不会显示出发展有序二级结构的倾向,所述有序二级结构可与融合蛋白的功能结构域相互作用,和(3)将具有最小的疏水性或带电特性,所述疏水性或带电特性可促进与功能蛋白结构域的相互作用。

[0080] 优选地,所述第一连接子氨基酸序列包含选自Gly(G)、Asn(N)、Ser(S)、Thr(T)、

Ala(A)、Leu(L)和Gln(Q)的近中性氨基酸,最优选地,所述第一连接子氨基酸序列包含选自Gly(G)、Asn(N)和Ser(S)的近中性氨基酸。

[0081] 连接子序列的实例描述于美国专利No.5,073,627和No.5,108,910中。

[0082] 更特别地适用于本发明的示例性柔性连接子包括由SEQ ID NO:13 (SGGSGGGGSGGGSGGGGSLQ)、SEQ ID NO:14 (SGGSGGGGSGGGSGGGGSGG)或SEQ ID NO:15 (SGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ)的序列编码的那些连接子。

[0083] 优选地,所述缀合物具有序列SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。

[0084] 本发明的免疫细胞因子的抗体

[0085] 术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其对应于包含通过二硫键互连的两个相同的重(H)链(全长时约50-70kDa)和两个相同的轻(L)链(全长时约25kDa)的四个多肽链的四聚体。轻链分为 κ 和 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,并将抗体的同种型分别限定为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。每个重链由N-末端重链可变区(缩写为HCVR)和重链恒定区组成。对于IgG、IgD和IgA,所述重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2和CH3)组成;对于IgM和IgE,所述重链恒定区由四个结构域(CH1、CH2、CH3和CH4)组成。每个轻链由N-末端轻链可变区(缩写为LCVR)和轻链恒定区组成。所述轻链恒定区由一个结构域CL组成。可将所述HCVR和LCVR区进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,穿插着被称为构架区(FR)的更保守的区域。每个HCVR和LCVR由自氨基末端至羧基末端按如下顺序排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。根据熟知的惯例给每个结构域分配氨基酸。抗体结合特定抗原的功能能力取决于每个轻链/重链对的可变区,且主要由CDR确定。

[0086] 本文所用术语“抗体”是指单克隆抗体本身。单克隆抗体可以是人抗体、嵌合抗体和/或人源化抗体。

[0087] 有利地,术语抗体是指IgG,如IgG1、IgG2(IgG2a或IgG2b)、IgG3和IgG4。优选地,术语抗体是指IgG1或IgG2,更优选地指IgG2a。

[0088] “嵌合抗体”是指由鼠免疫球蛋白的可变区和人免疫球蛋白的恒定区组成的抗体。该改变仅包括用鼠恒定区取代人抗体的恒定区,从而产生对药物用途可具有可接受的足够低的免疫原性的人/鼠嵌合体。已经报道了许多用于产生这种嵌合抗体的方法,从而这些方法构成了本领域技术人员的常识的一部分(参见,例如美国专利No.5,225,539)。

[0089] “人源化抗体”是指部分或全部由这样的氨基酸序列组成的抗体:所述氨基酸序列通过改变具有非人互补决定区(CDR)的抗体的序列而衍生自人抗体种系。所述抗体的可变区以及最终的CDR的这种人源化可通过本领域目前熟知的技术进行。作为实例,英国专利申请GB 2188638A和美国专利No.5,585,089公开了重组抗体的生产工艺,其中抗体被取代的唯一部分是互补决定区或“CDR”。CDR移植技术已用于产生由鼠CDR和人可变区框架和恒定区组成的抗体(参见,例如RIECHMANN等,Nature,vol.332,p:323-327,1988)。这些抗体保留了对Fc依赖性效应子功能所必需的、但是不太可能引起针对该抗体的免疫响应的人恒定区。作为实例,可变区的框架区被相应的人框架区置换,保持非人CDR基本完整,或甚至用衍生自人基因组的序列替换CDR。在遗传修饰的小鼠中产生完全人抗体,所述小鼠的免疫系统已被改变以对应于人免疫系统。如上述,使用所述抗体的免疫特异性片段,包括代表单链形态的片段,对于用在本发明方法中是足够的。

[0090] 人源化抗体还指这样的抗体:所述抗体包含人框架、至少一个源自非人抗体的

CDR,并且其中存在的任何恒定区与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约85或90%、优选至少95%相同。因此,可能除CDR之外,人源化抗体的所有部分都与一个或多个天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。例如,人源化的免疫球蛋白通常不包含嵌合的小鼠可变区/人恒定区抗体。作为实例,可以如下进行人源化免疫球蛋白的设计:当氨基酸属于下述类别时,所采用的人免疫球蛋白(受体免疫球蛋白)的框架氨基酸被源自提供CDR的非人免疫球蛋白(供体免疫球蛋白)的框架氨基酸替换:(a)受体免疫球蛋白的人框架区中的氨基酸对于人免疫球蛋白来说在所述位置是不常见的,而供体免疫球蛋白中的相应氨基酸对于人免疫球蛋白来说在所述位置是常见的;(b)氨基酸的位置紧邻一个CDR;或(c)在三维免疫球蛋白模型中,框架氨基酸的任意侧链原子在CDR氨基酸的任意原子的约5-6埃(中心-至-中心)内(QUEEN等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,vol.88,p:2869,1991)。当受体免疫球蛋白的人框架区中的氨基酸和供体免疫球蛋白中的相应氨基酸的每个对于人免疫球蛋白来说在该位置不常见时,这种氨基酸被对于人免疫球蛋白来说在该位置典型的氨基酸替换。

[0091] 本文所用术语“抗体片段”是指能够与其抗体对应物的相同的抗原反应的抗体片段。本领域技术人员可以简单地识别这种片段,其包括,作为实例,本发明包括F_{ab}片段(例如通过木瓜蛋白酶消化)、F_{ab}'片段(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原)、F_(ab')₂片段(例如通过胃蛋白酶消化)、F_{acb}(例如通过纤溶酶消化)、F_d(例如,通过胃蛋白酶消化、部分还原和再聚合)、以及scFv(单链Fv;例如通过分子生物学技术)片段。

[0092] 采用本领域已知的和/或本文所述的酶裂解、合成或重组技术可以生产这种片段。也可以采用抗体基因以各种截短的形式生产抗体,其中在天然终止位点的上游引入了一个或多个终止密码子。例如,可设计编码F_(ab')₂重链部分的组合基因以包括编码重链的CH₁结构域和/或绞链区的DNA序列。抗体的各个部分可以通过常规技术化学结合在一起,或者可以使用遗传工程化技术制备成连接蛋白。

[0093] 优选地,所述抗体片段为scFv片段。

[0094] 本文所用术语“免疫调节抗体”是指通过如下方式发挥作用的抗体:

[0095] 1)通过结合免疫抑制受体(如CTL-A4、PD-1、BTLA、LAG3HAVCR2、ADORA2A或抑制性KIR)或其配体来抑制该受体,从而通过防止信号下调来促进免疫活化;或

[0096] 2)刺激共刺激受体(如CD40、CD137、CD134或TNFRSF18(GITR)),从而促进T细胞和/或NK细胞的活化。

[0097] 在第一个优选的实施方案中,所述免疫调节抗体抑制免疫抑制受体。作为抑制免疫抑制受体的免疫调节抗体的实例,可以引用CTL-A4、抑制性KIR、BTLA、LAG3、HAVCR2、ADORA2A和PD-1拮抗剂,进一步优选选自抗-PD1和抗-PD-L1抗体的PD-1拮抗剂。

[0098] 1987年发现了CTL-A4(细胞毒性淋巴细胞相关抗原,也称为CD152)(BRUNET等,Nature,vol.328,p:267-270,1987)。CTL-A4的主要作用是抑制T细胞活化,这一作用见于患有大量淋巴组织增生的缺乏CTL-A4的小鼠中(CHAMBERS等,Immunity,vol.7,p:8855-8959,1997)。现在,已表明CTL-A4的阻滞能够增强T细胞在体外(WALUNAS等,Immunity,vol.1,p:405-413,1994)和体内(KEARNEY,J.Immunol,vol.155,p:1032-1036,1995)的响应,并且还能增加抗肿瘤免疫(LEACH,Science,vol.271,p:1734-1736,1996)。作为对应于CTL-A4拮抗剂的抗体的实例,可以引用公开在WO01/14424中的易普利单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010和10D1,可从MEDAREX获得,且由BRISTOL-MYERS SQUIBB公司以YERVOY™出售);公开在WO

00/37504中的ticilimumab(也称为11.2.1和CP-675,206);和公开在国际专利申请WO 98/42752、WO 01/14424、WO 2004/035607和WO 2012/120125中的,公开在EP 1212422和EP 1262193中的,公开在美国专利Nos.US 5,811,097、US 5,855,887、US 5,977,318、US 6,051,227、US 6,207,156、US 6,682,736、US 6,984,720、US 7,109,003和US 7,132,281中的CTL-A4抗体,它们以引用的方式并入本文。

[0099] 程序性细胞死亡1,也称为PD-1(还称为PDCD1或CD279),是~55kDI型膜糖蛋白。PD-1是CD28共刺激基因家族的受体,其在天然T、B和NK细胞上适度表达,并通过T/B细胞受体信号传导在淋巴细胞、单核细胞和髓细胞上上调。PD-1具有两个已知的表达谱不同的配体:PD-L1(B7-H1),其在天然淋巴细胞、在活化的B细胞和T细胞、单核细胞和树突细胞上广泛表达;和PD-L2(B7-DC),其表达被限制在活化的树突细胞、巨噬细胞和单核细胞及血管内皮细胞上。在一些鼠的同源肿瘤模型中,PD-1或PD-L1的阻滞显著地抑制肿瘤生长或诱导完全消退。因此,PD-1被认为是免疫调节和外周耐受维持中的重要参与物质。作为对应于PD-1拮抗剂的抗体的实例,可以引用公开在W02006/121168中的纳武单抗(nivolumab)(也称为BMS-936558或MDX1106;抗-PD-1抗体,BRISTOL-MYERS SQUIBB),公开在W02009/114335中的Merck 3745(也称为MK-3475或SCH-900475,为抗-PD-1抗体);公开在W02009/101611中的CT-011(也称为hBAT或Hbat-1,抗-PD-1抗体);公开在W02008/156712中的lambrolizumab;公开在W02010/027423、W02010/027827、W02010/027828和W02010/098788中的AMP514;以及公开在国际专利申请W02004/056875、W02006/056875、W02008/083174、W02010/029434、W02010/029435、W02010/036959、W02010/089411、W02011/110604、W02012/135408和W02012/145493中的抗体。所述PD-1拮抗剂可对应于抗-PD-L1抗体,如公开在W02007/005874中的MDX-1105(也称为BMS-936559,抗-PD-L1抗体)或公开在W02010/077634中的YW243.55.S70(也称为MPDL3280A或RG7446;抗-PD-L1抗体),它们以引用的方式并入本文。

[0100] 杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)是在免疫系统的重要细胞——天然杀伤(NK)细胞上发现的细胞表面蛋白家族。这些杀伤细胞免疫球蛋白样受体通过与在所有细胞类型上表达的MHC I类分子相互作用来调节天然杀伤细胞的杀伤功能。上述相互作用使它们能够检测在其表面具有特征性低水平的I类MHC的病毒感染细胞或肿瘤细胞。多数KIR为抑制性的,即KIR对MHC的识别抑制其NK细胞的细胞毒性活性。仅有限数量的KIR具有活化细胞的能力。

[0101] 抑制性KIR具有含有免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)的长细胞质尾,该长细胞质尾通过其MHC I类配体的接合将抑制性信号转导至NK细胞。已知的抑制性KIR包括包含KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1、KIR3DL2和KIR3DL3的KIR2DL和KIR3DL亚家族的成员。作为对应于抑制性KIR拮抗剂的抗体的实例,可以引用公开在W02006/003179中的抗体1-7F9,其以引用的方式并入本文。

[0102] BTLA(B-和T-淋巴细胞衰减因子),也称为CD272,其在T细胞活化过程中被诱导并保持在Th1细胞、而非Th2细胞上表达。BTLA通过与肿瘤坏死因子(受体),成员14(TNFRSF14),也称为单纯疱疹病毒侵入介质(HVEM)、TR2、ATAR、HVEA、CD270、LIGHTR的相互作用来显示T-细胞抑制作用。TNFRSF14被认为是单纯疱疹病毒(HSV)侵入的细胞介质。已发现该受体的胞质区结合至几种可介导活化免疫反应的信号转导通路的TRAF家族成员。最后,BTLA/HVEM复合物负调节T细胞免疫反应。作为BTLA/HVEM拮抗剂的实例,可引用公开在

W02008/076560、W02010/106051和W02011/014438中的抗体。

[0103] LAG3(淋巴细胞活化基因3,也称为CD223)属于免疫球蛋白(Ig)超家族,其含有4个胞外Ig样结构域。作为LAG3拮抗剂的实例,可以引用公开在W02010/019570中的抗体。

[0104] HAVCR2(甲型肝炎病毒细胞受体2,也称为Tim-3、KIM-3、TIMD3、Tim-3和TIMD-3)是属于免疫球蛋白超家族的Th-1特异性细胞表面蛋白。HAVCR2调节巨噬细胞的活化并抑制Th-1介导的自体免疫响应和同种免疫响应,从而促进免疫耐受。作为HAVCR2拮抗剂的实例,可以引用公开在W02013/006490A中的抗体。

[0105] ADORA2A(腺苷A_{2a}受体,也称为A_{2a}R、RDC8或ADORA2)属于鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)偶联受体(GPCR)超家族,该家族细分为类和亚型。这种蛋白在许多生物功能(如心脏节律和血液循环、脑和肾血流动、免疫功能、疼痛调节和睡眠)中都发挥重要作用。ADORA2A涉及病理生理状况,如炎症疾病和神经退行性疾病。

[0106] 在第二个优选的实施方案中,免疫调节抗体刺激共刺激受体。

[0107] 作为刺激共刺激受体的免疫调节抗体的实例,可以引用CD40、CD137、CD134和TNFRSF18激动剂。

[0108] CD40是在APC上发现的TNF-受体超家族的成员,是其活化所需的。已发现CD40是介导包括T细胞依赖性免疫球蛋白类别转换和记忆B细胞发育在内的多种免疫和炎症响应所必需的。

[0109] 作为对应于CD40激动剂的抗体的实例,可以引用公开在W003/040170、W02005/063981、W02005/063289和W02012/041635中的抗体,它们以引用的方式并入本文。

[0110] CD137是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。其替代名称为肿瘤坏死因子超家族成员9(TNFRSF9)、4-1BB且由淋巴细胞活化诱导(ILA)。CD137可由活化的T细胞表达,但是,与在CD4T细胞上相比,其更大程度上是在CD8T细胞上表达。此外,已发现CD137在树突细胞、小结树突细胞、天然杀伤细胞、粒细胞(granulocyte)和炎症部位的血管壁细胞上表达。CD137的最佳表征的活性是其对活化的T细胞的共刺激活性。CD137的交联增强了T细胞增殖、IL-2分泌存活和溶细胞活性。另外,CD137能增强免疫活性从而消除小鼠中的肿瘤。

[0111] 作为对应于CD137激动剂的抗体的实例,可以引用urelumab(也称为BMS-663513)和公开在W003/040170、W02004/010947、W02005/035584、W02006/126835和W02012/145183中的抗体,它们以引用的方式并入本文。

[0112] CD134(也称为OX40)是受体的TNFR超家族的成员。OX40是一种共刺激分子,其表达依赖于T细胞的充分活化。OX40结合至T细胞上的受体,从而预防T细胞死亡并随后增加细胞因子的产生。由于OX40的增强存活的能力,其除了在最初几天的免疫响应的维持中,还在之后的记忆响应中具有关键作用。

[0113] 作为对应于CD134激动剂的抗体的实例,可以引用公开在W02009/079335、W02012/027328、W02013/038191和W02013/028231中的抗体,它们以引用的方式并入本文。

[0114] 肿瘤坏死因子受体超家族成员18(TNFRSF18)也被称为活化可诱导的TNFR家族受体(AITR)或糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR),其是肿瘤坏死因子受体(TNF-R)超家族的成员。这一蛋白已被证明是一种参与抑制T调节细胞的抑制效应和延长T效应细胞的存活的表面受体分子。

[0115] 作为对应于TNFRSF18激动剂的抗体的实例,可以引用公开在W02006/105021和

WO2011/028683中的抗体。

[0116] 可以采用双功能蛋白质偶联剂或在融合蛋白中共价连接缀合物与抗体或所述抗体的片段。

[0117] 本领域技术人员熟知双功能蛋白质偶联剂方法,并且之前已经公开所述方法。作为实例,本领域技术人员可以使用TILL等(Proc.Natl.Acad,U.S.A.,vol.86(6),p:1987-91,1989)公开的方法。

[0118] 在一个优选的实施方案中,所述免疫细胞因子为融合蛋白。

[0119] 在另一个优选的实施方案中,所述免疫细胞因子为复合物,优选地为包含多肽i)和多肽ii)之间的缀合物的复合物,其中,所述多肽i)或多肽ii)融合至抗体或所述抗体的片段。

[0120] 所述多肽i)、多肽ii)或缀合物可以在相对于抗体或所述抗体的片段的氨基酸序列的C-末端位置或N-末端位置。

[0121] 优选地,所述缀合物为融合蛋白,且缀合物的氨基酸序列在相对于抗体或所述抗体的片段的氨基酸序列的C-末端位置,最优选在相对于抗体或所述抗体的片段的至少一个重链恒定区的氨基酸序列的C-末端位置。

[0122] 所述缀合物的氨基酸序列和抗体或所述抗体的片段的氨基酸序列可以被或者不被第二“连接子”氨基酸序列隔开。

[0123] 在特别的实施方案中,本发明的免疫细胞因子为融合蛋白,其中缀合物和抗体或所述抗体的片段没有被任何连接子隔开。

[0124] 如同对于第一连接子氨基酸序列,所述第二“连接子”氨基酸序列可以具有足以确保融合蛋白形成合适的二级结构和三级结构的长度。

[0125] 第一连接子氨基酸序列的长度可以变化,而不会显著地影响融合蛋白的生物活性。通常,第一连接子氨基酸序列包含至少一个、但少于30个氨基酸,例如2-30个氨基酸的连接子,优选10-30个氨基酸的连接子,更优选15-30个氨基酸的连接子,最优选15-25个氨基酸的连接子。

[0126] 如同对于第一连接子氨基酸序列,最合适的第二连接子氨基酸序列(1)将采用柔性延伸构象,(2)不会显示出发展有序二级结构的倾向,所述有序二级结构可与融合蛋白的功能结构域相互作用,和(3)将具有最小的疏水性或带电特性,所述疏水性或带电特性可促进与功能蛋白结构域的相互作用。

[0127] 优选地,所述第二连接子氨基酸序列包含选自Gly(G)、Asn(N)、Ser(S)、Thr(T)、Ala(A)、Leu(L)和Gln(Q)的近中性氨基酸;最优选地,所述第二连接子氨基酸序列包含选自Gly(G)、Asn(N)和Ser(S)的近中性氨基酸。

[0128] 作为适用于本发明的第二连接子氨基酸序列的实例,可以引用序列SEQ ID NO:16(SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG)或SEQ ID NO:17(AAGGSGGGGSGGGGSGGGGSA)。

[0129] 核酸、载体和重组宿主细胞

[0130] 第二方面,本发明涉及编码上述免疫细胞因子,优选对应于融合蛋白的免疫细胞因子的核酸。

[0131] 所述核酸对应于RNA或DNA,优选DNA。

[0132] 根据优选的实施方案,编码本发明的免疫细胞因子的核酸可操作地连接到基因表

达序列,所述基因表达序列引导核酸在原核细胞或真核细胞内、优选真核细胞内的表达。“基因表达序列”为任何调控核苷酸序列,例如启动子序列或启动子-增强子组合,促进其可操作地连接的免疫细胞因子核酸的有效转录和翻译。基因表达序列可以为例如哺乳动物启动子或病毒启动子,例如组成型或诱导型启动子。

[0133] 组成型哺乳动物启动子包括但不限于用于如下基因的启动子:次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPTR)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白启动子、肌肉肌酸激酶启动子、人延伸因子启动子及其它组成型启动子。在真核细胞中组成性起作用的示例性病毒启动子包括,例如源自猴病毒(例如SV40)、乳头状瘤病毒、腺病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、巨细胞病毒(CMV)、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)、乙型肝炎病毒(HBV)、莫洛尼氏白血病毒病毒的长末端重复序列(LTR)及其它逆转录病毒的启动子,和单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。其它组成型启动子是本领域普通技术人员已知的。

[0134] 可用作本发明的基因表达序列的启动子还包括诱导型启动子。诱导型启动子在诱导剂的存在下表达。例如,在某些金属离子的存在下,启动子中的金属硫基蛋白(metallothione)被诱导,以促进转录和翻译。其它诱导型启动子是本领域普通技术人员已知的。

[0135] 通常,如需要,基因表达序列应当包括分别参与转录和翻译的启动的5'非转录序列和5'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。特别地,这样的5'非转录序列包括启动子区,所述启动子区包括用于可操作结合核酸的转录控制的启动子序列。如需要,基因表达序列可选地包括增强子序列或上游激活序列。如本文使用,当编码本发明的免疫细胞因子的核酸序列和基因表达序列共价连接而使得本发明的免疫细胞因子编码序列的表达或转录和/或翻译处于基因表达序列的影响或控制下时,编码本发明的免疫细胞因子的核酸序列和基因表达序列被认为是“可操作地连接的”。

[0136] 如果5'基因表达序列中启动子的诱导导致了本发明的免疫细胞因子的转录,并且如果两个DNA序列之间的连接的性质不会(1)导致移码突变的引入,(2)干扰启动子区域引导本发明的免疫细胞因子转录的能力或(3)干扰相应的RNA转录产物翻译成蛋白质的能力,则两个DNA序列被认为是可操作地连接的。因此,如果基因表达序列能够影响该核酸序列的转录而使产生的转录产物翻译成期望多肽,则基因表达序列是可操作地连接至编码本发明的免疫细胞因子的核酸序列的。

[0137] 有利地,所述核酸序列包含内含子,因为前体mRNA分子通常被证实提高重组分子的产品收率。可以提出任何内含子序列,作为实例,可以引用在ZAGO等(Biotechnol.Appl.Biochem.,vol.52(Pt 3),p:191-8,2009)和CAMPOS-DA-PAZ等(Mol.Biotechnol.,vol.39(2),p:155-8,2008)中公开的那些。

[0138] 编码本发明的免疫细胞因子的核酸可以在体内单独递送或与载体组合递送。

[0139] 第三方面,本发明涉及包含上述核酸的载体。

[0140] 最广义地讲,“载体”为能够促进编码本发明的免疫细胞因子的核酸转移到细胞中的任何媒介。优选地,载体将核酸转运到细胞,相对于在不存在载体时导致的降解程度,减少了降解。通常,本发明中有用的载体包括但不限于质粒、粘粒、噬菌粒(phagmid)、附加体、人工染色体、病毒、已经通过插入或引入免疫细胞因子核酸序列操作的源自病毒或细菌源的其它媒介。

[0141] 质粒载体是优选类型的载体,其在本领域已被广泛描述,并且为本领域技术人员所熟知。参见例如SANBROOK等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。质粒的非限制性实例包括pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40和pBlueScript,以及本领域普通技术人员熟知的其它质粒。另外,可以使用限制性内切酶和连接反应以移除和加入DNA的特定片段来定制设计质粒。

[0142] 优选地,核酸载体可以包括在细菌和哺乳动物细胞中均有活性的可选标记。

[0143] 第四方面,本发明涉及用之前描述的核酸或载体遗传工程化的宿主细胞。

[0144] 本文所用术语“遗传工程化宿主细胞”涉及已经用之前描述的核酸或载体转导、转化或转染的宿主细胞。

[0145] 作为合适的宿主细胞的代表性实例,可以引用例如大肠杆菌的细菌细胞、例如酵母菌的真菌细胞、例如Sf9的昆虫细胞、例如CHO或COS的动物细胞、植物细胞等。根据本文教导,合适的宿主的选择被认为包含在本领域技术人员的范围之内。

[0146] 优选地,遗传工程化宿主细胞为动物细胞,并且最优选CHO-S细胞(INVITROGEN,货号11619-012)。

[0147] 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞经常用于制备生物制品,例如重组蛋白质、抗体、肽体(peptibody)和受体配体的生物制药行业中。经常使用CHO细胞的原因之一是这些细胞具有用于生物制品生产的广泛的安全性记录。CHO细胞被认为是很好地表征的细胞系,因此,其所需的安全性试验在某些方面(例如,逆转录病毒安全性)可以不如其它细胞类型所需要的严格。然而,白细胞介素15的产生非常难,尤其在CHO细胞中。

[0148] 可以通过本领域技术人员熟知的方法将之前描述的核酸或载体引入到宿主细胞中,所述方法例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔。

[0149] 本发明还涉及一种生产表达根据本发明的免疫细胞因子的遗传工程化宿主细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(i)体外或离体引入上述核酸或载体至宿主细胞;(ii)体外或离体培养工程化获得的重组宿主细胞,和(iii)可选地,选择表达和/或分泌所述免疫细胞因子的细胞。这样的重组宿主细胞可用于产生本发明的免疫细胞因子。

[0150] 包含本发明的免疫细胞因子的药物组合物

[0151] 本发明的进一步目的涉及药物组合物,该药物组合物包含最终与药学上可接受的媒介物结合的如上述的免疫细胞因子、编码该免疫细胞因子的核酸、或包含所述核酸的载体。

[0152] 表述“药学上可接受的”是指这样的分子实体和组合物:其是生理可耐受的,并且当给药于人时通常不产生过敏反应或类似的不良反应,例如反胃、头晕等。优选地,如本文使用的表述“药学上可接受的”指联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其它普遍认可的用于动物、更特别是用于人类的药典中列出的。

[0153] 术语“媒介物”指与化合物一起给药的溶剂、助剂、赋形剂或溶媒。这样的药物媒介物可以为无菌液体,比如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,比如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。

[0154] 药物组合物包含“有效量”的本发明免疫细胞因子,所述有效量足以抑制癌细胞的生长,优选地足以诱导肿瘤生长的消退。用于给药的剂量可根据多种参数而改变,特别是根据使用的给药模式、相关病理学或可选地期望的治疗持续时间而改变。自然地,药物组合物

的形式、给药途径、剂量和方案自然取决于将被治疗的病症、疾病的严重程度、受试者的年龄、体重和性别等。下文中提供的有效剂量的范围不旨在限制本发明和代表优选的剂量范围。然而，如本领域技术人员理解和可确定的，可为单独的受试者定制优选的剂量，而无需过多实验。

[0155] 鉴于本发明的免疫细胞因子的显著功效，本领域技术人员可以计划使用非常少的剂量来治疗受试者。作为非限制性实例，本发明的免疫细胞因子可以以50mg/kg至5 μ g/kg受试者的剂量，优选地以10mg/kg至100 μ g/kg的剂量，最优选地以2.5mg/kg至500 μ g/kg的剂量通过注射给药。

[0156] 作为实例，可以配制本发明的药物组合物用于局部、口服、鼻内、眼内、静脉内、肌内、肿瘤内或皮下给药等。优选地，药物组合物含有对于旨在被注射的剂型为药学上可接受的溶媒。特别地，这些可以是等渗的、无菌的盐水溶液（磷酸二氢钠或磷酸氢二钠，氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等，或这些盐的混合物），或干的、尤其是冷冻干燥的组合物，其根据情形加入无菌水或生理盐水时，允许构成可注射的溶液。合适的药物媒介物描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0157] 本发明的免疫细胞因子、编码其的核酸或核酸载体可以溶解在缓冲液或水中，或者包含在乳液、微乳液、水凝胶（例如基于PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物的水凝胶）、微球、纳米球、微粒、纳米粒（例如，聚（乳酸-共-乙醇酸）、微粒（例如，聚乳酸（PLA）；聚（丙交酯-共-乙醇酸）（PLGA）；聚谷氨酸酯微球、纳米球、微粒或纳米颗粒）、脂质体或其它盖仑制剂中。在所有情形中，制剂必须是无菌的和注射可接受程度的流体的。制剂必须在制备和贮存条件下稳定，并且必须防止例如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0158] 呈游离碱或药理上可接受的盐的活性化合物的溶液可在与表面活性剂（例如羟丙基纤维素）合适地混合的水中制备。

[0159] 分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在一般的储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0160] 根据本发明的免疫细胞因子可以以中性或盐形式配制到组合物中。药学上可接受的盐包括酸加成盐（与蛋白质的游离氨基形成），所述酸加成盐是与例如盐酸或磷酸的无机酸或例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成的。与游离羧基形成的盐也可以来源于无机碱，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、或氢氧化铁，以及来源于有机碱，例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0161] 所述媒介物还可以是包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）、它们合适的混合物及植物油的溶剂或分散介质。本发明的免疫细胞因子也可以被修饰，例如被聚乙二醇化，以提高其生物可分布性(biodisponibility)。当本发明的免疫细胞因子具有核酸形式时，所述媒介物也可以为载体，例如病毒（例如MVA、rAAV、慢病毒等）。

[0162] 例如，通过使用包衣（例如卵磷脂），在分散体的情况下通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。通过多种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等，可以实现防止微生物的作用。在许多情况下，优选地包括等渗剂，例如糖或氯化钠。

[0163] 可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝、明胶、多元醇和增长半衰期的共价和非共价制剂实现。

[0164] 肽不稳定或降解的原因有许多,包括水解和变性。疏水性相互作用可引起分子集合到一起(即聚集)。可以加入稳定剂从而减少或防止这类问题。

[0165] 稳定剂包括环糊精及其衍生物(参见美国专利No.5,730,969)。还可加入合适的防腐剂如蔗糖、甘露醇、山梨醇、海藻糖、葡聚糖和甘油以稳定最终制剂。可将选自离子型和非离子型表面活性剂、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-半乳糖醛酸、海藻糖、葡聚糖、羟乙基淀粉、及其混合物的稳定剂添加至所述制剂中。碱金属盐或氯化镁的添加可以稳定肽。所述肽还可通过使其与选自葡聚糖、硫酸软骨素、淀粉、糖原、糊精和海藻酸盐的糖接触而被稳定。其它可添加的糖包括单糖、二糖、糖醇及它们的混合物(例如,葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、木糖醇)。多元醇可稳定肽,且是可与水混溶的或水溶性的。合适的多元醇可以是多羟基醇、单糖和二糖,包括甘露醇、甘油、乙二醇、丙二醇、三甲基二醇、乙烯基吡咯烷酮、葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖及它们的聚合物。各种赋形剂也可稳定肽,包括血清白蛋白、氨基酸、肝素、脂肪酸和磷脂、表面活性剂、金属、多元醇、还原剂、金属螯合剂、聚乙烯吡咯烷酮、水解明胶和硫酸铵。

[0166] 细胞因子疗法的前景实际上确实源自这些新的细胞因子的识别,但是甚至更重要地,该领域极大地受益于有说服力地证实了协同和/或新的生物效应的临床前期数据的不断增长的量,所述数据可以通过具有互补的免疫-刺激能力的细胞因子的一些组合获得。与基于RLI的免疫细胞因子组合的潜在治疗活性剂包括例如化疗剂、抗血管生成剂或免疫调节剂。

[0167] 在优选的实施方案中,本发明的组合物可以包含其它治疗活性剂,例如化疗剂、抗血管生成剂或免疫调节剂。

[0168] 对于化疗剂,已经证明其治疗作用可以部分地通过对于免疫响应的间接作用所介导,所述间接作用是通过诱导免疫原性细胞死亡、使免疫抑制环境保持平衡、使原发性大肿瘤减瘤体积消减(debulk)并且然后促进免疫攻击,或通过诱导瞬时的淋巴细胞减少然后诱导体内平衡的淋巴细胞增殖(homeostatic lymphoproliferation)来进行。许多化疗剂是本领域技术人员熟知的,作为可以与本发明的免疫细胞因子组合的化疗剂的实例,可以引用氟达拉滨、吉西他滨、卡培他滨、甲氨蝶呤、紫杉酚、泰索帝、巯嘌呤、硫鸟嘌呤、羟基脲、阿糖胞苷、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝基脲、例如顺铂、卡铂和奥沙利铂的铂复合物、丝裂霉素、达卡巴嗪、丙卡巴肼(procarbazine)、依托泊苷、替尼泊苷、喜树碱、博来霉素、多柔比星、伊达比星、柔红霉素、更生霉素、普卡霉素、米托蒽醌、L-天冬酰胺酶、多柔比星、表阿霉素(epimycin)、5-氟尿嘧啶、例如多西他赛和紫杉醇的紫杉烷、亚叶酸、左旋咪唑、依立替康、雌莫司汀、依托泊苷、氮芥、BCNU、例如卡莫司汀和洛莫司的亚硝基脲、例如长春碱、长春新碱和长春瑞滨的长春花生物碱、甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)、六甲蜜胺、托泊替康、激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、ATP酶抑制剂、酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrosinase inhibitor)、蛋白酶抑制剂、抑制剂除莠毒素A(herbimycin A)、染料木素、erastatin和熏草菌素A。

[0169] 对于抗血管生成剂,已经证明其对免疫系统具脱靶效应,从而可促进肿瘤免疫响应。作为可以与本发明的免疫细胞因子组合的抗血管生成剂的实例,可以引用经由其酪氨酸激酶靶向血管内皮生长因子受体(VEGFR)的药物,比如索拉非尼、舒尼替尼和帕唑帕尼,或雷帕霉素(mTOR)的哺乳动物靶点,例如西罗莫司和依维莫司。

[0170] 对于可以与本发明的免疫细胞因子组合的免疫调节剂,可以引用细胞因子(IL-2、

IL-7、IL-15、IL-12、IL18、IL-21、GM-CSF、G-CSF、IFN α ……)、趋化因子/抗血管生成细胞因子(IP10、Mig、SDF-1、RANTES……)、TLR激动剂和免疫调节抗体(抗-CTLA4、抗-PD1、抗-TGF β 、激动剂抗-CD40……)。

[0171] 治疗方法和用途

[0172] 在另外的方面,本发明涉及用于治疗受试者的癌症的前述药物组合物,优选为包含前述免疫细胞因子的药物组合物。

[0173] 本文所用术语“受试者”是指哺乳动物,比如啮齿类动物、猫科动物、犬科动物或灵长类动物,最优选为人。

[0174] 在另一个方面,本发明涉及产品,该产品含有:

[0175] (i)上述免疫细胞因子,编码所述免疫细胞因子的核酸序列,或包含这种核酸序列的载体,和

[0176] (ii)治疗剂,优选抗癌剂,

[0177] 作为用于治疗受试者的癌症的同时、单独或顺序使用的组合制剂。

[0178] 再一方面,本发明涉及用于治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向所述受试者施用前述药物组合物的步骤。

[0179] 最后一个方面,本发明涉及用于治疗癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者同时、单独或顺序地施用治疗有效量的如下物质的步骤:

[0180] (i)上述免疫细胞因子,编码所述免疫细胞因子的核酸序列,或包含这种核酸序列的载体,和

[0181] (ii)治疗剂,优选抗癌剂。

[0182] 在本发明的上下文中,本文所用术语“治疗”或“处理”指逆转、减缓、抑制应用该术语的障碍或病症或这样的障碍或病症的一个或多个症状的发展,或预防所述障碍或病症或这样的障碍或病症的一个或多个症状。本文所用表述“治疗癌症”是指癌细胞的生长抑制。优选地,所述治疗还导致肿瘤生长的消退,即,可测量肿瘤的尺寸的减小。最优选地,这种治疗导致肿瘤的完全消退。

[0183] 优选地,所述癌症为癌o a肺癌。

[0184] 最优选地,表述“治疗癌症”是指“通过活化肿瘤浸润淋巴细胞来治疗癌症”。

[0185] 因此,优选地,所述癌症对应于血管癌。

[0186] 还优选地,所述癌症为具有无反应性的TIL群的癌症,所述癌症对应于如肾细胞癌(RCC)的晚期癌症。

[0187] 在下文中,参照氨基酸序列、核酸序列和实施例更详细地描述本发明。然而,本发明不旨在受实施例的细节的限制。相反,本发明涉及包括在本文实施例中未明确提及的、但本领域技术人员无需过多努力即可发现的细节的任何实施方案。

实施例

[0188] 1)基于RLI的调节因子

[0189] 抗-PD-1(hBAT)RLI免疫细胞因子的构建

[0190] 编码抗-PD-1轻链(对应于CT-011(hBAT或hBAT-1)中的一个)的表达质粒。将抗体的嵌合IgG重链序列设计为在有或者没有22个氨基酸的连接子(SEQ ID NO:16)的情况下在

3'端融合至IL15(SEQ ID NO:3,其中在位点93的氨基酸为K)。由GENEART合成这些核苷酸序列并克隆在pcDNA3.1质粒中。在国际专利申请WO2009/101611中公开了抗-PD-1抗体的轻链和重链的全序列。

[0191] 质粒DNA的制备和转染试剂

[0192] 由POLYSCIENCE获得40kDa的线性PEI。通过加热在水中溶解PEI,用NaOH中和,并通过0.22 μ m过滤器过滤来灭菌,从而制备1mg/mL的储备溶液。将储备溶液等分并储存在-20℃下。

[0193] 采用质粒纯化试剂盒,根据制造商的说明(MACHERY-NAGEL)纯化用于转染的质粒DNA,并通过0.22 μ m过滤器过滤来灭菌。

[0194] 免疫细胞因子的生产和纯化

[0195] 1-在悬浮液中瞬时转染:

[0196] 将常规维持的CHO-S(INVITROGEN)细胞以 1×10^6 细胞/mL的密度接种在PowerCHO2培养基(LONZA)中,并且在具有5%CO₂的振荡培养箱(100rpm)中于37℃下培养过夜。为了转染,然后将细胞在CD-CHO培养基(INVITROGEN)中稀释至 2×10^6 细胞/mL。以10%的培养体积,使用150mM的NaCl制备转染复合物。将表达构建体DNA(2.5mg/L培养体积,使用1:2的比率的编码重链的质粒与编码轻链的质粒)与在NaCl中稀释的PEI(10mg/L的最终培养体积)混合,并在室温下孵育10分钟,之后加到培养物中。在振荡培养箱(130rpm)中于37℃下培养细胞5小时,然后用PowerCHO2培养基使培养体积翻倍。转染后5天,收集上清液。

[0197] 2-在粘附细胞上的稳定的转染

[0198] 在补充L-谷氨酰胺、10%的FCS和青霉素(100单位/ml)/链霉素(100 μ g/ml)的DMEM中培养CHO-K1细胞(ATCC NO:CCL-61),并按照制造商建议,使用lipofectamine 2000试剂(INVITROGEN)用每种载体转染该细胞。对于抗-GD20-乙酰化的ICK和抗-CD20ICK,通过分别采用含有遗传霉素和潮霉素(0.5mg/mL)或灭瘟素(blasticin)和潮霉素(5 μ g/mL和100 μ g/mL)的培养基的有限稀释而选择克隆。对于双功能蛋白质的产生,通过ELISA测定各个克隆的培养物上清液。对于ICK的产生,使选择的克隆在25%DMEM培养基和75%AIM培养基(INVITROGEN)中扩增。然后,将细胞维持在100%的AIM中,收集上清液,并每2天替换,共10天。

[0199] 3-上清液纯化:

[0200] 在4℃下,以3000rpm离心收集的上清液20分钟,用NaOH平衡pH至7.8,并通过0.22 μ m过滤器过滤。根据制造商的说明,通过亲和色谱,使用蛋白A柱(GE)纯化调节的培养基。用50kDa AMICON装置(MILLIPORE)浓缩纯化的蛋白质。在该步骤期间,用PBS替代洗脱缓冲液。最后,通过ELISA测定纯化的蛋白质,并在280nm测量吸光度。通过电泳评估纯度。

[0201] 4-通过ELISA检测免疫球蛋白部分

[0202] 在4℃下,用在PBS中稀释至1,5 μ g/ml的100 μ L的山羊抗-人抗体(UP892370, INTERCHIM)涂布Maxisorp平底微量滴定板(NUNC)小时。然后在37℃下,用200 μ L的封闭缓冲液(在PBS中的1%BSA+0.1%吐温20)封闭板1小时。然后,用洗涤缓冲液(在PBS中0.1%吐温20)洗涤板3次,加入在封闭缓冲液中稀释的样品,并在37℃下孵育30分钟(100 μ L)。在洗涤3次之后,加入1:10000稀释的过氧化物酶缀合的山羊抗-人IgG1(109-036-003, JACKSON),并在37℃下孵育30分钟。采用TMB底物(INTERCHIM)测定蛋白水平,并在450nm下读板。使用纯

化的利妥昔单抗(ROCHE)在板上产生标准曲线。

[0203] 5-通过ELISA检测细胞因子部分

[0204] 在4℃下,用在碳酸盐缓冲液中稀释至2μg/ml的100μL的抗-IL15B-E29(DIACLONE)涂布Maxisorp平底微量滴定板(NUNC)16小时。然后,在37℃下,用200μl的封闭缓冲液(在PBS中1%的BSA)封闭板1小时。然后,用洗涤缓冲液(在PBS中0.05%吐温20)洗涤板3次。加入在TBS+0.05%BSA中稀释的样品,并在37℃下孵育1小时30分钟(100μL)。在洗涤3次之后,加入稀释至200ng/mL的生物素化的抗-IL15抗体BAM247(R&D SYSTEM),并在37℃下孵育1小时30分钟。洗涤板3次,并加入以1:1000稀释的过氧化物酶缀合的链霉亲和素。使用TMB底物(INTERCHIM)测定蛋白水平,并在450nm下读板。使用IL-15(PEPROTECH)在板上产生标准曲线。

[0205] TIL的表型

[0206] 在将源自2个肾细胞癌患者的活检组织或肾切除(nephrectomie)组织进行DNA酶和胶原酶消化后,获得肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。这些TIL大多是无反应性的,从而肿瘤能够发展。

[0207] 这些TIL与PD-1、Tim-3和IL-15Rα相关的表型通过荧光免疫检验法测定。

[0208] 图1示出了获得的患者A(图1A)的表型和患者B(图1B)的表型。

[0209] 免疫细胞因子的结合活性

[0210] 通过流式细胞仪评价抗-PD-1RLI调节因子的特异性结合。在Kit225上测试调节因子结合效应细胞上的IL-15受体的能力。用PE-缀合的山羊抗-人IgG mAb(PN IM0550, BECKMAN COULTER)或偶联至PE-链霉亲和素(SIGMA-ALDRICH)的生物素化的小鼠抗-IL15抗体(BAM247, R&DSYSTEM)显示涂布在靶细胞上的调节因子。在4℃下,用每个ICK孵育靶细胞(1×10^5)1小时,洗涤,然后在4℃下用PE-缀合物孵育1小时。最后,在FACSCALIBUR(BECTON DICKINSON)上最终分析洗涤的细胞。

[0211] 结果显示,调节因子既结合至IL-15受体也结合至PD-1。

[0212] 免疫细胞因子的增殖活性

[0213] 测试获得的调节因子的白细胞介素-15介导的增殖活性,并与RLI比较。通过 $[^3\text{H}]$ 胸苷掺入测量Kit 225和32Dβ细胞对ICK的增殖反应。将细胞维持在培养基中3天,洗涤两次,然后使Kit 225和32Dβ在不含细胞因子的培养基中分别挨饿24小时或4小时。然后,按 10^4 个细胞/孔以100μl接种在多孔培养板中,并在补充浓度渐增的样品的培养基中培养48小时。人rIL-15和RLI用作校准。用0.5μCi/孔的 $[^3\text{H}]$ 胸苷脉冲细胞达16小时,收集到玻璃纤维过滤器上,并测量细胞相关的放射性。结果证实,调节因子的增殖活性与RLI的增殖活性相当。

[0214] 通过RLI调节因子的强的TIL再活化

[0215] 在将源自25个肾细胞癌患者的活检组织或肾切除组织进行DNA酶和胶原酶消化后,获得肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。这些TIL大多是无反应性的,从而肿瘤能够发展。

[0216] 通过将每个患者的所述TIL在不存在或存在等摩尔的RLI、HBAT(CT011=抗-PD1抗体)、HBAT-RLI(调节因子)、或HBAT与RLI的组合的情况下孵育,测试25个患者的TIL再活化。对于患者1-8采用1μg/ml的RLI,然后对于患者9-25采用300ng/ml的RLI。

[0217] 刺激后48小时收集上清液,并通过ELISA测量上清液中IFN γ 的浓度来测定再活

化。

[0218] 除了总是分泌低于20pg/ml的IFN γ 的未被刺激的TIL,将源自25个肾细胞癌患者的TIL的原始数据列于表1。

[0219] 组合(combinaison)

[0220] 表1

[0221]

患者	IFN γ (pg/ml)			
	RLI	HBAT	HBAT-RLI	HBAT+RLI
1	440	0	1070	ND
2	267	0	338	ND
3	365	28	2000	377
4	1500	92	2280	1500
5	2900	ND	7700	2900
6	570	80	970	700
7	0	0	0	0
8	15	15	32	25
9	320	17	1570	360
10	245	0	635	245
11	260	320	2000	1490
12	310	22	1100	360

	13	170	160	3600	1800
	14	0	9	50	0
	15	840	27	2500	1000
	16	15	73	0	50
	17	0	0	0	0
	18	125	55	800	230
[0222]	19	170	0	4500	0
	20	0	33	330	0
	21	80	0	395	0
	22	125	65	1500	1000
	23	0	0	0	0
	24	30	65	2500	540
	25	390	ND	3600	ND

[0223] 图2示出了由被RLI、HBAT、HBAT-RLI和HBAT+RLI活化的TIL产生的IFR γ 的平均数和中位数(*p<0.05)。

[0224] 结果显示,仅采用抗-PD-1抗体,几乎未获得TIL活化。仅采用RLI或采用RLI与抗-PD1抗体的组合,获得了一些TIL活化。现在,令人惊讶地,与RLI和RLI+HBAT相比,采用本发明的免疫细胞因子获得了强且普遍的活化(表1和图2)。

[0225] 根据上述结果可以设想新的疗法。

[0226] 在癌CT26实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0227] CT26是一种由N-亚硝基-N-胺甲酸甲酯-(NNMU)诱导的未分化的结肠小鼠癌细胞系。

[0228] 在BALB/C小鼠的右侧(right flank)皮下注射CT26肿瘤细胞(2.10^5 /小鼠)。

[0229] 在肿瘤应达到20-30mm²的第9天,用16或32 μ g/小鼠的仅调节因子抗-PD1-RLI治疗

不同组的小鼠,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD1、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0230] 自第9天,每周两次注射仅调节因子或RLI达4周。自第9天注射仅抗-PD1抗体,然后每周一次达4周。在组合的组中,自第9天注射抗-PD1抗体,然后每周一次达4周,和自第15天注射RLI,然后每周两次达3周。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度×宽度。当肿瘤尺寸达到300mm²或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。评估原发性肿瘤生长、存活和最终消退。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。

[0231] 在BALB/C小鼠的右侧皮下注射CT26肿瘤细胞($2 \cdot 10^5$ /小鼠)。在肿瘤达到20-30mm²的第9天,用16或32μg/小鼠的仅调节因子抗-PD-L1-RLI腹腔内(i.p.)治疗小鼠,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0232] 自第9天,每周两次注射仅调节因子或仅RLI达4周。自第9天注射仅抗-PD1抗体,然后每周一次达4周。在组合的组中,自第9天注射抗-PD1抗体,然后每周一次达4周,和自第15天注射RLI,然后每周两次达3周。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度×宽度。当肿瘤尺寸达到300mm²或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。评估原发性肿瘤生长、存活和最终消退。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。

[0233] 在肺tc-1实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0234] 肿瘤细胞系TC-1源自C57B1/6小鼠的原发性肺上皮细胞。将上述细胞用双嗜性逆转录病毒载体1xsn16e6e7永生化,并随后用表达活化的人c-ha-ras致癌基因的pvejb质粒转化。上述细胞对HPV-16E7的表达呈阳性。

[0235] 在C57B1/6小鼠的右侧皮下注射TC-1肿瘤细胞($1 \cdot 10^5$ /小鼠)。在肿瘤应达到20-50mm²的第9天,用16或32μg/小鼠的仅调节因子抗-PD1-RLI治疗不同组的小鼠,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD1、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。自第9天,每周两次注射仅调节因子或仅RLI达4周。自第9天注射仅抗-PD1抗体,然后每周一次达4周。在组合的组中,自第9天注射抗-PD1抗体,然后每周一次达4周,和自第15天注射RLI,然后每周两次达3周。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度×宽度。当肿瘤尺寸达到300mm²或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。评估原发性肿瘤生长、存活和最终消退。

[0236] 在转移性黑色素瘤B16F10实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0237] 第0天,通过在C57B1/6小鼠的一侧皮内(i.d.)注射 3×10^4 B16F10细胞来植入B16F10肿瘤。在允许肿瘤细胞植入后,第4天启动治疗。以16或32μg/小鼠腹腔内(i.p.)注射抗-PD-L1-RLI调节因子,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0238] 自第4天,每周两次注射调节因子、抗-PD-L1mAb、RLI或抗-PD-L1mAb+RLI的组合达4周。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度×宽度。当肿瘤尺寸达到300mm²或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。评估原发性肿瘤生长、存活和最终消退。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。

[0239] 在晚期膀胱癌MB49实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0240] MB49肿瘤细胞系源自来源于C57BL/6雄性小鼠的膀胱上皮的致癌物诱导的肿瘤。在C57BL/6小鼠的背部,向真皮上部中皮下(s.c.)注射 10^6 个MB49膀胱癌细胞。在肿瘤接种后的第6天启动治疗,此时肿瘤变得清晰可见和可感知,其尺寸 $\approx 15\text{mm}^2$ 。以16或 $32\mu\text{g}$ /小鼠腹腔内(i.p.)注射抗-PD-1-RLI调节因子和抗-PD-L1调节因子,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD1、仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0241] 自第6天,每周两次注射调节因子、抗-PD-1mAb、抗-PD-L1mAb(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、RLI和抗-PD-1mAb或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)+RLI的组合达4周。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度 \times 宽度。当肿瘤尺寸达到 300mm^2 或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。评估原发性肿瘤生长、存活和最终消退。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。

[0242] 在乳腺癌4T1实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0243] 第0天,将 5×10^4 4T1乳腺癌细胞接种至BALB/c小鼠的乳腺。在肿瘤接种后的第10天启动治疗,此时肿瘤变得清晰可见和可感知,其尺寸 $\approx 15-20\text{mm}^2$ 。以16或 $32\mu\text{g}$ /小鼠腹腔内(i.p.)注射抗-PD-1-RLI调节因子和抗-PD-L1调节因子,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD1、仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0244] 自第10天,每周两次注射调节因子、抗-PD-1mAb、抗-PD-L1mAb(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、RLI和抗-PD-1mAb或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)+RLI的组合达4周。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度 \times 宽度。第27天时处死小鼠。在双目显微镜下对肺转移结节进行计数。

[0245] 在卵巢癌ID8实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0246] 从小鼠卵巢上皮乳头状浆液性腺癌细胞系预先产生了ID8-VEGF卵巢癌细胞系。在C57BL/6小鼠的右侧皮下植入 5×10^6 ID8肿瘤细胞。在肿瘤接种后的第10天启动治疗,此时肿瘤变得清晰可见和可感知,其尺寸 $\approx 15-20\text{mm}^2$ 。以16或 $32\mu\text{g}$ /小鼠腹腔内(i.p.)注射抗-PD-1-RLI调节因子和抗-PD-L1调节因子,并与采用等摩尔浓度的仅抗-PD1、仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0247] 自第10天,每周两次注射调节因子、抗-PD-1mAb、抗-PD-L1mAb(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、RLI和抗-PD-1mAb或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)+RLI的组合达4周。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度 \times 宽度。当肿瘤尺寸达到 300mm^2 或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。

[0248] 在前列腺癌RM-1实验肿瘤模型中调节因子的疗效评价

[0249] 将 2×10^5 个RM-1鼠前列腺癌细胞皮下(s.c.)接种至C57BL/6雌性小鼠。在肿瘤接种后的第3天启动治疗,此时肿瘤变得清晰可见和可感知,其尺寸 $\approx 15-20\text{mm}^2$ 。以16或 $32\mu\text{g}$ /小鼠腹腔内(i.p.)注射抗-PD-1-RLI调节因子和抗-PD-L1调节因子,并与采用等摩尔浓度

的仅抗-PD1、仅抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、仅RLI(1004-14p)、抗-PD1或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)与RLI的组合或PBS的对照组进行比较。

[0250] 自第3天,每周两次注射调节因子、抗-PD-1mAb、抗-PD-L1mAb(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)、RLI和抗-PD-1mAb或抗-PD-L1(克隆10F.9G2,BIO-XCELL)+RLI的组合达4周。对照组接受相应剂量的抗体同种型或无关的RLI-抗体缀合物(抗-HER2-RLI)。采用卡尺每周测量肿瘤三次,并按照下式计算肿瘤面积:长度×宽度。当肿瘤尺寸达到300mm²或肿瘤溃烂时,将小鼠处死。

序列表

- <110> 赛腾制药
 雷卡尔巴黎大学
 公共救济事业局-巴黎医院
- <120> 基于 IL-15 和 IL-15R α sushi 结构域的调节因子
- <130> ELC163I0003P
- <150> EP 13003963.9
 <151> 2013-08-08
- <160> 19
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- [0001] <220>
 <223> 哺乳动物白细胞介素 15 共有序列
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X= N, S, T 或 I
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X= V, H, I, Q 或 E
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X= N, Y, F 或 D
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X= I 或 R

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X= S, N, L, Y, K 或 R
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X= K, E, R 或 Q
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X= K, T 或 R
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X= E, D 或 Q
- [0002] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X= D, H, S 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X= I 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X=Q, R 或 K
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X= S 或 F
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)

<223> X= M, I 或 L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21).. (21)

<223> X= I, V 或 M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23).. (23)

<223> X=A 或 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28).. (28)

<223> X=E 或 D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30).. (30)

<223> X= D 或 G

[0003]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31).. (31)

<223> X= V, F, A 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34).. (34)

<223> X= S, N 或 R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37).. (37)

<223> X= V 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39).. (39)

<223> X= A 或 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

- <222> (41)..(41)
 <223> X= K, Q 或 N

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> X= Q, G, R, H 或 E

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> X= S 或 L

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> X= L, Q 或 H

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> X= S, F 或 Y
 [0004]
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= G, K, S, N 或 R

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> X= D, H, S 或 N

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 <223> X= A, H, M, E, G, S 或 T

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X= S, V, P, T, N 或 D

 <220>

- <221> MISC_FEATURE
<222> (59).. (59)
<223> X= I 或 L
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60).. (60)
<223> X= H, S, K, N, Y 或 E
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61).. (61)
<223> X= D 或 E
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (62).. (62)
<223> X= T, I 或 A
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63).. (63)
<223> X= V 或 I
- [0005] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64).. (64)
<223> X= E, T, Q, R 或 K
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66).. (66)
<223> X= L 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67).. (67)
<223> X= I, T 或 L
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68).. (68)
<223> X=I, M, F, Y 或 L

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> X= N, T, R, D 或 S
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(73)
<223> X= S, N, R, T 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> X= S 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> X= S 或 A
- [0006] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> X= N, I 或 K
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78)..(78)
<223> X= G, E 或 K
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> X= N, Y, D 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X= V, K 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81)..(81)
<223> X= T, A 或 I

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (83)..(83)
<223> X= S, I 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> X= E 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> X= E 或 K
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(94)
<223> X= K 或 R
- [0007] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95)..(95)
<223> X= N, T 或 S
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (96)..(96)
<223> X= I 或 F
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> X= K, N, A, 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X= Q, K 或 E
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)

<223> X = E 或 Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16).. (16)

<223> X = I 或 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19).. (19)

<223> X = M 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30).. (30)

<223> X = D 或 G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31).. (31)

<223> X = V 或 I

[0010]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34).. (34)

<223> X = S 或 R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (52).. (52)

<223> X = L 或 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55).. (55)

<223> X = G 或 N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56).. (56)

<223> X = D 或 N

<220>

<221> MISC_FEATURE

- <222> (57)..(57)
<223> X = A 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> X = S, N 或 D
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> X = H 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> X = V 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> X = I 或 L
- [0011] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> X = N 或 R
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(73)
<223> X =S 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> X =S 或 A
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> X =N 或 T
- <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> X =V 或 I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> X =E 或 K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (112)..(112)
 <223> X = N 或 Y

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> X = T 或 A

<400> 2

[0012] Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ser Xaa His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Xaa Xaa His
 20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

Val Ile Ser Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Asp Thr Xaa Glu
 50 55 60

Asn Leu Xaa Ile Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Ser Xaa Asn Gly Xaa Xaa
 65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa
 100 105 110

Xaa Ser

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 变体

<222> (93)..(93)

<223> X= E 或 K

<400> 3

[0013] 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 Xaa 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> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 哺乳动物 sushi 结构域共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

[0014] <223> X= P 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X= M 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X= V 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X= W, R 或 Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X= S 或 N

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X= L 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> X= Y, H 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> X= I 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> X= S 或 T
- [0015] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> X=T 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X=T 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X= L 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> X= A 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> X= V 或 A

- <221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X= M 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X= V 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X= W, R 或 Q
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X= S 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> X=L 或 V
- [0017] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> X=Y, H 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X= I 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> X= S 或 T
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X= T 或 I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X= L 或 I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X= A 或 N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V 或 A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H 或 Y

<400> 5

[0018]

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

<210> 6
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 灵长类动物 sushi 结构域共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> X= P 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> X= M 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13).. (13)

<223> X= W, R 或 Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20).. (20)

<223> X= Y 或 H

[0019]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26).. (26)

<223> X= I 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51).. (51)

<223> X= V 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53).. (53)

<223> X= V 或 A

<400> 6

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser

1

5

10

15

Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

<210> 7

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩大的灵长类动物 sushi 结构域共有序列

[0020]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X= V 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X= P 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X= M 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X= W, R 或 Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X= Y 或 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28).. (28)

<223> X= I 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53).. (53)

<223> X=V 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55).. (55)

<223> X=H 或 Y

<400> 7

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
1 5 10 15

[0021]

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
50 55 60

<210> 8

<211> 61

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
1 5 10 15

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

<210> 9

<211> 64

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

[0022]

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

<210> 10

<211> 77

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 哺乳动物 sushi 和结构域共有序列

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> X= T, V 或 I
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> X= P 或 A
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> X= M 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> X= V 或 I
- [0023] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> X= W, R 或 Q
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> X= S 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21).. (21)
<223> X= L 或 V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22).. (22)
<223> X= Y, H 或 N
- <220>
<221> MISC_FEATURE

- <222> (28)..(28)
 <223> X= I 或 V

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X= S 或 T

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X= T 或 I

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X= L 或 I

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X=A 或 N
 [0024]
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V 或 A

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H 或 Y

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H 或 Y

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X=A, S 或 L

 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (70).. (70)
 <223> X= V, A, S 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (71).. (71)
 <223> X= H 或 R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72).. (72)
 <223> X= Q 或 H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73).. (73)
 <223> X= R, S 或 K

[0025] <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75).. (75)
 <223> X= A, V 或 P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76).. (76)
 <223> X= P 或 S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77).. (77)
 <223> X= P 或 T

<400> 10

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
 65 70 75

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 灵长类动物 sushi 和结构域共有序列

[0026]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X= V 或 I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X= P 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X= M 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X= W, R 或 Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> X= Y 或 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28).. (28)

<223> X= I 或 V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53).. (53)

<223> X= V 或 A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55).. (55)

<223> X= H 或 Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (68).. (68)

<223> X= A, S 或 L

[0027]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (70).. (70)

<223> X= V, A 或 T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (71).. (71)

<223> X= H 或 R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (75).. (75)

<223> X= A 或 V

<400> 11

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val

1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Gln Arg Pro Xaa Pro Pro
65 70 75

<210> 12

<211> 77

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

[0028]

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro
65 70 75

<210> 13

<211> 20

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Gln
 20

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

[0030]

Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 20

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子

<400> 17

Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ala
 20

<210> 18

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RLI1

<400> 18

Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val
1			5						10					15	

Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly
			20					25					30		

Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn
		35					40					45			

[0031]

Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile
	50					55					60				

Arg	Asp	Pro	Ala	Leu	Val	His	Gln	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly
65					70					75					80

Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu
				85					90					95	

Gln	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu
			100						105					110	

Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val
				115					120					125	

His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu
				130					135					140	

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205

Asn Thr Ser
 210

[0032]

<210> 19
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RLI2

<400> 19

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 100 105 110

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 115 120 125

[0033] His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205

Asn Thr Ser
 210

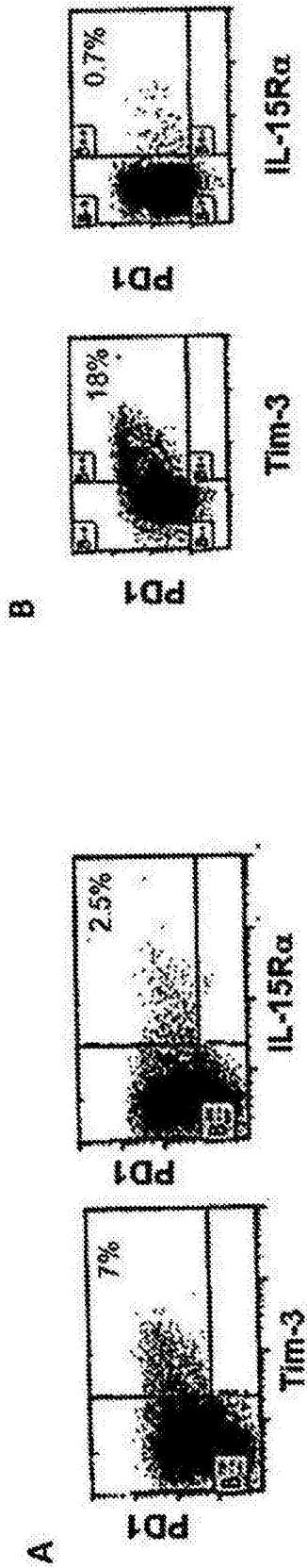


图1

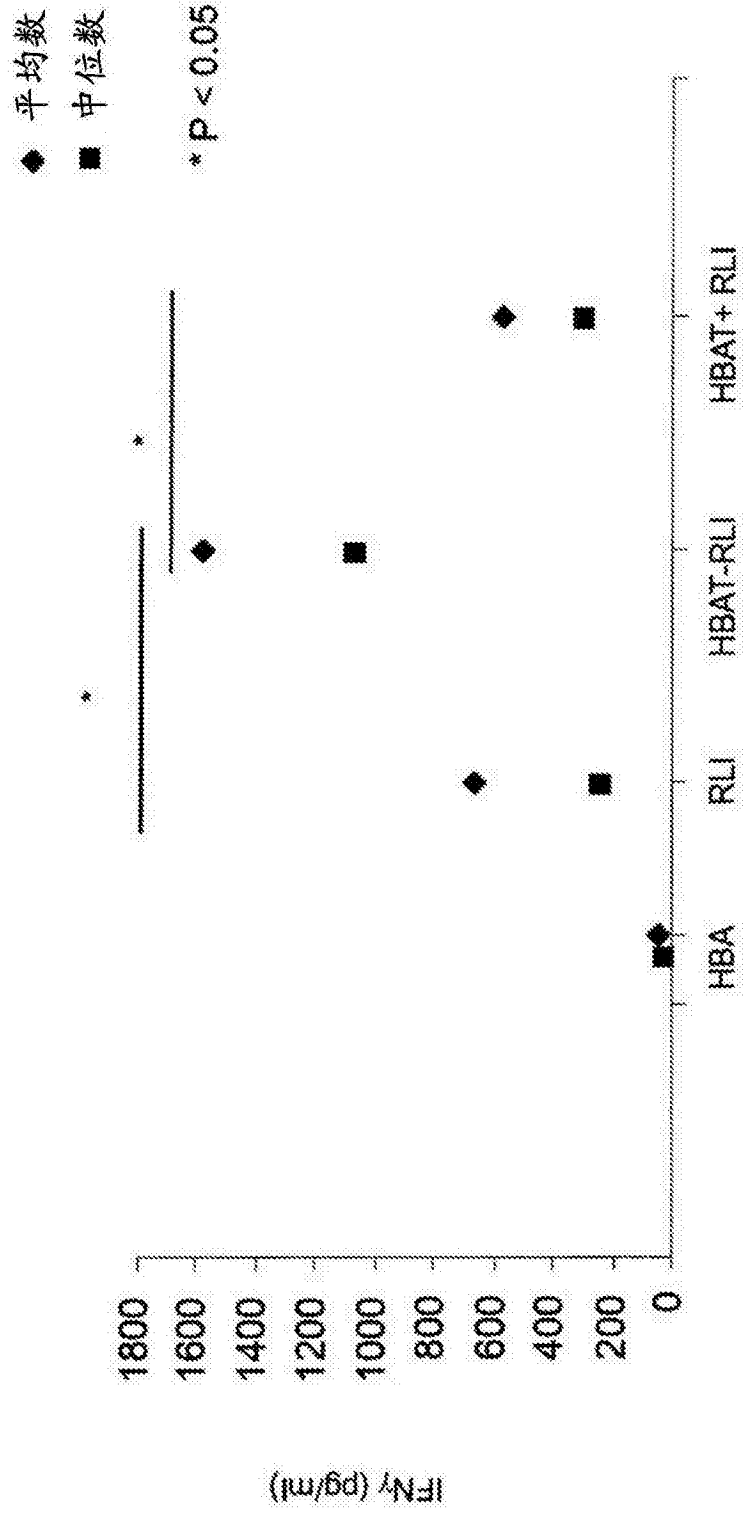


图2