



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114651014 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 21

(21) 申请号 202080067412.0

P • 达斯古普塔

(22) 申请日 2020.09.25

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(30) 优先权数据

11247

1913804.9 2019.09.25 GB

专利代理师 陈迎春 黄革生

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2022.03.24

C07K 19/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/70 (2006.01)

PCT/GB2020/052328 2020.09.25

A61K 38/20 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 35/00 (2006.01)

W02021/058973 EN 2021.04.01

(71) 申请人 前列腺癌研究中心

地址 英国伦敦

申请人 伦敦大学国王学院

(72) 发明人 C • 加卢斯蒂安 R • 史密斯

权利要求书6页 说明书25页

D • 斯莫拉雷克 E • 帕帕伊万格罗

序列表19页 附图14页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的IL-15融合肽

(57) 摘要

本发明涉及一种融合多肽,所述多肽包含:

a. 白细胞介素-15 (IL-15); 和b. IL-15活性促进序列,其中所述序列的长度为10至60个氨基酸残基;并且通过IL-15增加CD8⁺T细胞的增殖。还提供了编码融合多肽的核酸、产生融合多肽的相关方法、包含融合多肽的药物组合物和试剂盒,以及其治疗用途。

1. 一种融合多肽,所述多肽包含:
 - a. 白细胞介素-15 (IL-15); 和
 - b. IL-15活性促进序列,其中所述序列:
长度为10至60个氨基酸残基;并且通过IL-15增加CD8⁺T细胞的增殖。
2. 根据权利要求1所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合。
3. 根据权利要求1或2所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列的长度为10至55个氨基酸残基。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列的长度为15至55个氨基酸残基。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列的长度为25至55个氨基酸残基。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列的长度为30至55个氨基酸残基。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列的长度为42至50个氨基酸残基。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述多肽包含N端IL-15和C端IL-15活性促进序列。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4或9具有至少70%序列同一性的多肽序列。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4或9具有至少80%序列同一性的多肽序列。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4或9具有至少90%序列同一性的多肽序列。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4或9具有至少95%序列同一性的多肽序列。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列包含SEQ ID NO:4或9。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15活性促进序列由SEQ ID NO:4或9组成。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15是人IL-15。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15包含与SEQ ID NO:2或3具有至少70%序列同一性的多肽序列。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少70%序列同一性的多肽序列。
18. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少80%序列同一性的多肽序列。
19. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少90%序列同一性的多肽序列。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少95%序列同一性的多肽序列。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其包含SEQ ID NO:5、10或28。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽,其中膜结合剂与所述IL-15活性促进序列缀合。

23. 根据权利要求22所述的融合多肽,其中所述膜结合剂包含脂肪族酰基。

24. 根据权利要求23所述的融合多肽,其中所述脂肪族酰基为肉豆蔻酰基。

25. 根据权利要求22-24中任一项所述的融合多肽,其中所述膜结合元件还包含亲水性肽。

26. 根据权利要求25所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的肽序列。

27. 根据权利要求25或26所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的肽序列。

28. 根据权利要求25-27中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的肽序列。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的肽序列。

30. 根据权利要求25-29中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包括SEQ ID NO:6。

31. 根据权利要求25-30中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽由SEQ ID NO:6组成。

32. 根据权利要求22-31中任一项所述的融合多肽,其中所述膜结合元件与所述IL-15活性促进序列的半胱氨酸残基或赖氨酸残基缀合。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述融合多肽通过二硫键缀合至N-(α , ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKDDKKPGDC (SEQ ID NO:31)。

34. 一种融合多肽,所述多肽包含:

a. 白细胞介素-15 (IL-15); 和

b. 肽,其中所述肽的长度为10至60个氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:4或9具有至少70%的序列同一性。

35. 根据权利要求34所述的融合多肽,其中所述肽的长度为10至55个氨基酸残基。

36. 根据权利要求34或35所述的融合多肽,其中所述肽的长度为15至55个氨基酸残基。

37. 根据权利要求34-36中任一项所述的融合多肽,其中所述肽的长度为25至55个氨基酸残基。

38. 根据权利要求34-37中任一项所述的融合多肽,其中所述肽的长度为30至55个氨基酸残基。

39. 根据权利要求34-38中任一项所述的融合多肽,其中所述肽的长度为42至50个氨基酸残基。

40. 根据权利要求34-39中任一项所述的融合多肽,其中所述多肽包含N端IL-15和C端肽。

41. 根据权利要求34-40中任一项所述的融合多肽,其中所述肽包含与SEQ ID NO:4或9具有至少80%序列同一性的多肽序列。

42. 根据权利要求34-41中任一项所述的融合多肽,其中所述肽包含与SEQ ID NO:4或9具有至少90%序列同一性的多肽序列。

43. 根据权利要求34-42中任一项所述的融合多肽,其中所述肽包含与SEQ ID NO:4或9具有至少95%序列同一性的多肽序列。

44. 根据权利要求34-43中任一项所述的融合多肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:4或9(优选由SEQ ID NO:4或9组成)。

45. 根据权利要求34-44中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15为人IL-15。

46. 根据权利要求34-45中任一项所述的融合多肽,其中所述IL-15包含与SEQ ID NO:2或3具有至少70%序列同一性的多肽序列。

47. 根据权利要求34-46中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少70%序列同一性的多肽序列。

48. 根据权利要求34-47中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少80%序列同一性的多肽序列。

49. 根据权利要求34-48中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少90%序列同一性的多肽序列。

50. 根据权利要求34-49中任一项所述的融合多肽,其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少95%序列同一性的多肽序列。

51. 根据权利要求34-50中任一项所述的融合多肽,其包含SEQ ID NO:5、10或28。

52. 根据权利要求34-51中任一项所述的多肽,其中所述膜结合剂与所述肽缀合。

53. 根据权利要求52所述的融合多肽,其中所述膜结合剂包含脂肪族酰基。

54. 根据权利要求53所述的融合多肽,其中所述脂肪族酰基为肉豆蔻酰基。

55. 根据权利要求52-54中任一项所述的融合多肽,其中所述膜结合元件还包含亲水性肽。

56. 根据权利要求55所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的肽序列。

57. 根据权利要求55或56所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的肽序列。

58. 根据权利要求55-57中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的肽序列。

59. 根据权利要求55-58中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的肽序列。

60. 根据权利要求55-59中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽包括SEQ ID NO:6。

61. 根据权利要求55-60中任一项所述的融合多肽,其中所述亲水性肽由SEQ ID NO:6组成。

62. 根据权利要求52-61中任一项所述的融合多肽,其中所述膜结合元件与所述肽的半胱氨酸残基或赖氨酸残基缀合。

63. 根据权利要求34-62中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽通过二硫键缀合至N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC (SEQ ID NO:31)。

64. 一种融合多肽, 所述多肽包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少70%序列同一性的多肽序列。

65. 根据权利要求64所述的融合多肽, 其中所述IL-15是人IL-15。

66. 根据权利要求64或65所述的融合多肽, 其中所述IL-15包含与SEQ ID NO:2或3具有至少80%序列同一性的多肽序列。

67. 根据权利要求64-66中任一项所述的融合多肽, 其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少90%序列同一性的多肽序列。

68. 根据权利要求64-67中任一项所述的融合多肽, 其包含与SEQ ID NO:5、10或28具有至少95%序列同一性的多肽序列。

69. 根据权利要求64-68中任一项所述的融合多肽, 其包含多肽序列, 所述多肽序列包含SEQ ID NO:5、10或28。

70. 根据权利要求64-69中任一项所述的融合多肽, 由SEQ ID NO:5、10或28组成。

71. 根据权利要求64-70中任一项所述的多肽, 其中膜结合剂与所述多肽缀合。

72. 根据权利要求71所述的融合多肽, 其中所述膜结合剂包含脂肪族酰基。

73. 根据权利要求72所述的融合多肽, 其中所述脂肪族酰基为肉豆蔻酰基。

74. 根据权利要求71-73中任一项所述的融合多肽, 其中所述膜结合元件还包含亲水性肽。

75. 根据权利要求74所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性的肽序列。

76. 根据权利要求74或75所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的肽序列。

77. 根据权利要求74-76中任一项所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的肽序列。

78. 根据权利要求74-77中任一项所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽包含与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的肽序列。

79. 根据权利要求74-78中任一项所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽包括SEQ ID NO:6。

80. 根据权利要求74-79中任一项所述的融合多肽, 其中所述亲水性肽由SEQ ID NO:6组成。

81. 根据权利要求71-80中任一项所述的融合多肽, 其中所述膜结合元件与所述多肽的半胱氨酸残基或赖氨酸残基缀合。

82. 根据权利要求64-81中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽通过二硫键缀合至N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC (SEQ ID NO:31)。

83. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少70%序列同一性的核苷酸序列编码。

84. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少80%序列同一性的核苷酸序列编码。

85. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的核苷酸序列编码。

86. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少95%序列同一性的核苷酸序列编码。

87. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24的核苷酸序列编码。

88. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由由SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24组成的核苷酸序列编码。

89. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少70%序列同一性的多肽序列。

90. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的多肽序列。

91. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性的多肽序列。

92. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少95%序列同一性的多肽序列。

93. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽包含SEQ ID NO:7。

94. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述融合多肽由SEQ ID NO:7组成。

95. 一种核酸, 其编码根据权利要求1-94中任一项所述的融合多肽。

96. 根据权利要求95所述的核酸, 其中所述核酸包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少70%序列同一性的核苷酸序列。

97. 根据权利要求95或96所述的核酸, 其中所述核酸包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少80%序列同一性的核苷酸序列。

98. 根据权利要求95-97中任一项所述的核酸, 其中所述核酸包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

99. 根据权利要求95-98中任一项所述的核酸, 其中所述核酸包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。

100. 根据权利要求95-99中任一项所述的核酸, 其中所述核酸包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24。

101. 根据权利要求95-100中任一项所述的核酸, 其中所述核酸包含由SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:24组成的核苷酸序列。

102. 一种产生融合多肽的方法, 所述方法包括:

- a. 在宿主细胞中表达根据权利要求95-101中任一项所述的核酸序列; 和
- b. 分离融合多肽。

103. 一种融合多肽, 其通过权利要求102所述的方法获得。

104. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1-94或103中任一项所述的融合多肽和药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐。

105. 一种试剂盒,其包含:

a. 根据权利要求1-94或103中任一项所述的融合多肽或根据权利要求104所述的药物组合物;和

b. 所述试剂盒的使用说明书(例如在治疗癌症中)。

106. 根据权利要求1-94或103中任一项所述的融合多肽或根据权利要求104所述的药物组合物或根据权利要求105所述的试剂盒,用于治疗癌症。

107. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求1-94或103中任一项所述的融合多肽或根据权利要求104所述的药物组合物或根据权利要求105所述的试剂盒。

108. 根据权利要求1-94或103中任一项所述的融合多肽或根据权利要求104所述的药物组合物或根据权利要求105所述的试剂盒在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

109. 根据权利要求106-108中任一项所述的融合多肽、药物组合物或试剂盒的使用、方法或用途,其中所述癌症是实体瘤癌症。

110. 根据权利要求106-109中任一项所述的融合多肽、药物组合物或试剂盒的使用、方法或用途,其中所述癌症选自以下的一种或多种:前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、卵巢癌、胰腺癌、脑癌、头癌、颈癌、淋巴瘤和神经元癌。

111. 根据权利要求106-110中任一项所述的融合多肽、药物组合物或试剂盒的使用、方法或用途,其中所述融合多肽或组合物是肿瘤内施用的。

用于治疗癌症的IL-15融合肽

[0001] 本发明涉及多肽治疗剂,例如用于治疗癌症的多肽治疗剂。

[0002] 癌症是一个严重的持续公共卫生问题,在2005年全球5800万例死亡病例中占760万。此后,癌症发病率每年都在增加,预计到2030年将有1140万人死于癌症。

[0003] 实体瘤占上述癌症的大部分。实体瘤起源于异常组织块,不包含囊肿或液体区域。这样的肿瘤可以是良性的(非癌性的),但是在实体瘤癌症的情况下,实体瘤是恶性的(癌性的)。根据组成实体瘤的细胞类型,可将实体瘤分为三组:肉瘤;癌;和淋巴瘤。淋巴瘤在淋巴系统的腺体或淋巴结中逐渐形成,与被称为液体癌的白血病不同。肉瘤是起源于支持和结缔组织的癌症,例如骨、肌腱、软骨、肌肉和脂肪。癌是指上皮起源的恶性新生物或身体内或外壁(膜)(internal or external lining)的癌症。换言之,癌是上皮组织的恶性肿瘤。癌占有所有癌症病例的80-90%。

[0004] 一种这样的癌是前列腺癌。前列腺癌是男性最常见的癌症,年龄是一个关键风险因素,因为约99%的病例发生在50岁以上的男性中。早期前列腺癌通常无症状,但可能存在排尿功能障碍症状,例如尿频/排尿困难/尿痛、血尿和夜尿。随着前列腺癌的进展,症状可能包括性功能障碍。晚期前列腺癌与癌细胞转移相关,通常会导致骨和淋巴结中的继发性肿瘤。症状可包括骨痛、刺痛、腿部无力以及大小便失禁。前列腺癌经常通过各种筛查程序在早期局部阶段检测到,包括检测前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺成像、直肠指检和活检。在化学疗法、激素疗法和放射疗法之后或之前进行手术切除可能是有效的,并且已成为常规临床实践。然而,副作用可能仍然存在,包括免疫抑制、中性粒细胞减少和血小板增多。此外,超过50%的接受前列腺切除术的前列腺癌患者会出现泌尿生殖系统损伤。前列腺癌可能特别难治,特别是前列腺癌微环境具有免疫抑制性,从而降低了免疫系统靶向和破坏前列腺癌细胞的有效性。因此,需要改进的通常治疗癌症的治疗剂,特别是治疗前列腺癌的治疗剂。

[0005] TH1细胞因子,包括白细胞介素-2(IL-2)和白细胞介素-15(IL-15)已被用于治疗癌症。

[0006] IL-15是细胞因子四- α -螺旋束家族的成员,在通过与细胞表面受体结合介导的先天性和适应性免疫中发挥作用。所述受体包括三个亚基:IL-15受体(IL-15R) α 、IL-2R β (也称为IL-15R β 、CD122和p75)和 γ_c (也称为CD132和p65)。IL-15已被证明以反式发挥作用,其中受体由第一细胞的IL-15R α 亚基和第二细胞的IL-2R β 和 γ_c 亚基形成,或者以顺式发挥作用,其中受体由相同细胞上的IL-15R α 亚基、IL-2R β 亚基和 γ_c 亚基形成。

[0007] IL-15已被证明是一种特别有效的治疗剂,但与许多缺点相关,包括全身毒性。因此,需要一种具有改进功效的IL-15治疗剂,从而允许以较低剂量施用并降低全身毒性。

[0008] 本发明克服了一个或多个上述问题。

[0009] 本发明人惊奇地发现,将白细胞介素-15与IL-15活性促进肽融合改善了IL-15的活性。不希望受理论束缚,据信本发明的IL-15活性促进肽稳定IL-15与其受体之间的相互作用,任选地,为IL-15分子(以顺式或者反式构型)与其受体相互作用时提供了更大的移动自由。有利地,这允许在癌症治疗中施用较低剂量的本发明的融合多肽,从而减少使用野生

型IL-15相关的副作用,例如全身毒性。

[0010] 在一个方面,本发明提供了一种融合多肽(例如用于治疗癌症),所述多肽包含:

[0011] a. 白细胞介素-15 (IL-15); 和

[0012] b. IL-15活性促进序列,其中所述序列:

[0013] 长度为10至60个氨基酸残基; 和

[0014] 通过IL-15增加了CD8+T细胞的增殖。

[0015] 本发明的融合多肽包含白细胞介素-15。优选地,IL-15是成熟的IL-15,其缺少IL-15前体的信号肽(例如氨基酸1-29)和前肽(例如氨基酸30-48)。参照人IL-15前体在本文中显示为SEQ ID NO:1。

[0016] 本文中的IL-15可以是哺乳动物IL-15或其功能片段,例如人IL-15或其功能片段、灵长类IL-15或其功能片段、或鼠IL-15或其功能片段。IL-15优选是人IL-15或其功能片段。在一个实施方案中,IL-15包含多肽序列,所述多肽序列与SEQ ID NO:2或3具有至少70%的序列同一性。优选地,IL-15包含多肽序列,所述多肽序列与SEQ ID NO:2或3具有至少80%或90%的序列同一性。更优选地,IL-15包含多肽序列,所述多肽序列与SEQ ID NO:2或3具有至少95%的序列同一性。在一个特别优选的实施方案中,IL-15包含SEQ ID NO:2或3(更优选由其组成),更优选地IL-15包含SEQ ID NO:3(更优选由其组成)。

[0017] IL-15可以包含多肽序列(或由其组成),所述多肽序列与SEQ ID NO:25-27中的任一个具有至少70%的序列同一性。在一个实施方案中,本发明的IL-15包含多肽序列(或由其组成),所述多肽序列与SEQ ID NO:25-27中的任一个具有至少80%或90%的序列同一性。优选地,本发明的IL-15包含多肽序列(或由其组成),所述多肽序列与SEQ ID NO:25-27中的任一个具有至少95%的序列同一性。更优选地,本发明的IL-15包含SEQ ID NO:25-27中的任一个(更优选地由其组成)。

[0018] IL-15的功能片段是具有IL-15活性的IL-15的截断。在一个实施方案中,IL-15的功能片段具有促进CD8+T细胞增殖和/或分化的能力。在一个实施方案中,IL-15的功能片段具有促进自然杀伤(NK)细胞增殖和/或分化的能力。在一个实施方案中,IL-15的功能片段具有促进B细胞增殖和/或分化的能力。优选地,IL-15的功能片段具有促进CD8+T细胞增殖和/或分化、自然杀伤(NK)细胞增殖和/或分化、和/或B细胞增殖和/或分化的能力。

[0019] IL-15活性促进序列的长度为10至60个氨基酸残基。IL-15活性促进序列优选为肽序列。

[0020] 为避免任何疑问,在提及范围的情况下,所述范围包括形成其端点的数字。例如,长度为10至60个氨基酸残基的序列包括长度为10个氨基酸残基的序列以及长度为60个氨基酸残基的序列。

[0021] IL-15活性促进序列的长度可以为至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、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或59个氨基酸。IL-15活性促进序列的长度可以为小于60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11个氨基酸。

[0022] 优选地,IL-15活性促进序列的长度为至少32个氨基酸残基。

[0023] 在一个实施方案中, IL-15活性促进序列的长度至少为15、20、25或30个氨基酸残基, 并且长度可高达60、55或50个氨基酸残基。在一个实施方案中, IL-15活性促进序列的长度为25-55个氨基酸残基。优选地, IL-15活性促进序列的长度为40-50个氨基酸残基。更优选地, IL-15活性促进序列的长度为45-50个氨基酸残基, 例如长度为46个氨基酸残基。

[0024] IL-15活性促进序列可以包含至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基。优选地, IL-15活性促进序列包含至少一个半胱氨酸残基, 更优选地包含一个半胱氨酸残基。至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可位于或靠近(优选位于)活性促进序列的N-或C端(当指IL-15活性促进序列的初级多肽序列时)。至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基的位置可以适当地基于IL-15活性促进序列相对于IL-15的位置来确定。换言之, 当IL-15活性促进序列位于IL-15的C端时(当指融合多肽的一级多肽序列时), 至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可以位于或靠近(优选位于)活性促进序列的C端, 而当IL-15活性促进序列位于相对于IL-15的N端时(当指融合多肽的一级多肽序列时), 至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可以位于或靠近(优选位于)活性促进序列的N端。优选地, 至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基位于或靠近(优选位于)IL-15活性促进序列的C端。

[0025] 本发明的IL-15活性促进序列至少促进IL-15的CD8+T细胞增殖活性。换言之, 当与包含IL-15(优选由相同的IL-15多肽组成)且缺乏IL-15活性促进序列的等效多肽相比时, IL-15活性促进序列增加IL-15对CD8+T细胞的增殖。

[0026] 如本文所用, 术语“增加IL-15对CD8+T细胞的增殖”是指如使用本文所述的“CTLL-2测定法”体外测量的, CD8+T细胞的增殖增加。优选地, 增加是如使用本文所述的“CTLL-2测定法”体外测量的, CD8+T细胞的增殖在统计学上显著增加。

[0027] 本文中可以使用任何合适的技术确定统计学上的显著性, 优选使用单因素ANOVA或事后Newman-Keuls方法。

[0028] “CTLL-2测定法”通过以下方式进行:

[0029] a) 在37°C下、在与测试肽融合的IL-15多肽(IL-15-测试肽融合体)的存在下、在96孔板中培养浓度为 5×10^5 细胞/ml的鼠CTLL-2细胞(每孔中 5×10^4 细胞, 体积100 μ l) 72小时;

[0030] b) 将细胞与MTS (5-[3-(羧甲氧基)苯基]-3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑内盐)一起孵育3-4小时(在72小时时间点);

[0031] c) 通过比色法在490nm的吸光度下定量细胞数量;

[0032] d) 比较在步骤c)中定量的CTLL-2细胞数量与对照样品中的CTLL-2细胞数量, 该对照样品在相同条件下进行测定, 但存在野生型IL-15(例如SEQ ID NO:2或3); 和

[0033] e) 其中当在步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量大于(优选地统计学上显著大于)在对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量时, 测试肽增加IL-15对CD8+T细胞的增殖; 或者其中当在步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量基本上等于(例如, 没有统计学上显著的差异的情况, 优选地没有差异)或小于(优选地统计学上显著小于)在对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量时, 测试肽不增加或者降低IL-15对CD8+T细胞的增殖。

[0034] 在一个实施方案中, 当IL-15-测试肽融合体的浓度为0.1ng/ml-1ng/ml(优选0.2-0.5ng/ml, 更优选0.2-0.4ng/ml)时, 步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量大于对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量(其中对照样品的野生型IL-15以相同的浓度使用)时, 测试肽增加IL-15对CD8+T细胞的增殖; 或者当IL-15-测试肽融合体的浓度为0.1ng/ml-1ng/ml(优选

0.2-0.5ng/ml,更优选0.2-0.4ng/ml),步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量基本上等于或小于对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量(其中对照样品的野生型IL-15以相同的浓度使用时,测试肽不增加或降低IL-15对CD8+T细胞的增殖。

[0035] 如通过“CTLL-2测定法”所确定的,在测试肽确实增加(优选地统计学上显著地增加)IL-15对CD8+T细胞的增殖的情况下,所述测试肽是根据本发明的IL-15活性促进序列。

[0036] 如通过“CTLL-2测定法”确定的,在测试肽不增加或降低IL-15对CD8+T细胞的增殖的情况下,所述测试肽不是根据本发明的IL-15活性促进序列。优选地,如通过“CTLL-2测定法”确定的,在测试肽没有统计学上显著地增加或降低(优选地统计学上显著地降低)IL-15对CD8+T细胞的增殖的情况下,所述测试肽不是根据本发明的IL-15活性促进序列。

[0037] 在一个实施方案中,IL-15对CD8+T细胞增殖的增加是与包含IL-15(优选由相同的IL-15多肽组成)且缺乏IL-15活性促进序列的等效多肽相比时,增加至少1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或120%。

[0038] CTLL-2细胞可从LGC Standards,UK(ATCC®TIB-214™)商购获得。同样,MTS试剂可从Promega(CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)商购获得。

[0039] 技术人员将理解,可以修改CTLL-2测定法使得步骤d)中使用的对照是阳性对照,例如本文示例的融合多肽,例如SEQ ID NO:5。在这种情况下,当在步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量基本上等同于(例如,在没有统计学显著差异的情况下,优选没有差异)或大于(优选在统计学显著大于)在对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量时,测试肽被确定为增加IL-15对CD8+T细胞的增殖。类似地,当在步骤c)中定量的CTLL-2细胞的数量小于(优选在统计学显著小于)在对照样品中定量的CTLL-2细胞的数量时,测试肽被确定为不增加IL-15对CD8+T细胞的增殖。

[0040] 优选地,当与包含IL-15(优选由相同的IL-15多肽组成)但缺乏IL-15活性促进序列的等效多肽比较时,本发明的IL-15活性促进序列不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合。

[0041] 术语“不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合”是指IL-15活性促进序列基本上不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合,如使用本文描述的“细胞表面结合测定法”确定的。受体可以是野生型IL-15结合的任何受体,例如IL15R α 、IL2R β 、 γ C或其组合。

[0042] 在一个实施方案中,本文中增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合是指受体非依赖性与细胞表面结合的统计学上显著的增加,如使用本文描述的“细胞表面结合测定法”确定的。

[0043] “细胞表面结合测定法”通过以下进行:

[0044] a) 在25℃下孵育 8×10^6 Jurkat或绵羊红细胞与2ug与测试肽融合的IL-15多肽(IL-15-测试肽融合体)20分钟;

[0045] b) 用含有2%FCS(胎牛血清)的PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤细胞;

[0046] c) 在室温25℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0047] e) 在4℃下、在黑暗中孵育细胞与2ul小鼠抗人IL-15PE-缀合的抗体20分钟;

[0048] f) 用含有2%FCS的PBS洗涤细胞;

[0049] g) 在室温4℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0050] h) 用含有2%FCS的PBS洗涤细胞;

[0051] i) 在室温4℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0052] j) 在400μl含有2%FCS的PBS中重悬细胞;

[0053] k) 通过流式细胞术定量IL-15-测试肽融合体与细胞的结合;

[0054] l) 比较k) 中定量的结合与对照样品中定量的结合,该对照样品在相同条件下进行测定,但不存在IL-15-测试肽融合体或存在野生型IL-15(例如SEQ ID NO:2或3)(优选不存在IL-15-测试肽融合体);和

[0055] m) 其中,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合基本上等同(例如在没有统计学上显著差异的情况下,优选在定量的结合相同的情况下)或更少(优选统计学上显著更少)时,测试肽不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合;或者其中,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合显著更大(优选统计学上显著更大)时,测试肽增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合。

[0056] 如通过“细胞表面结合测定法”所确定的,在测试肽不增加(例如不在统计学上显著增加)或降低受体非依赖性多肽与细胞表面的结合时,所述测试肽可以被选为根据本发明的IL-15活性促进序列。

[0057] 如通过“细胞表面结合测定法”所确定的,在测试肽增加(例如在统计学上显著增加)受体非依赖性多肽与细胞表面的结合时,所述测试肽可以被排除,不作为根据本发明的IL-15活性促进序列。

[0058] 用于测定法中的PE缀合的抗体可从R&D Systems(目录号IC2471P)获得。

[0059] 用于测定法中的绵羊红细胞可从Antibodies-Online(目录号ABIN770405)获得。

用于测定法中的Jurkat细胞可从LGC Standards,UK(ATCC®TIB-152™)获得。

[0060] 技术人员将理解,可以修改细胞表面结合测定法使得步骤1)中使用的对照是阳性对照,例如本文示例的融合多肽,例如SEQ ID NO:5。在这种情况下,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合基本上等同(例如,在没有统计学上显著差异的情况下,优选在定量的结合相同的情况下)或更少(优选统计学上显著更少)时,测试肽被确定为不增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合。类似地,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合更大(优选统计学上显著更大)时,测试肽被确定为增加受体非依赖性多肽与细胞表面的结合。

[0061] IL-15活性促进序列可以位于IL-15的C端或N端(当指本发明的融合多肽的一级多肽序列时)。在一个优选的实施方案中,融合多肽包含N端IL-15和C端IL-15活性促进序列。优选地,在本发明融合多肽的一级多肽序列中,IL-15活性促进序列的N端氨基酸残基紧邻IL-15的C端氨基酸残基的C端。

[0062] 在一个实施方案中,本发明的IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,本发明的IL-15活性促进序列包含多肽序列(或由其组成),所述多肽序列与SEQ ID NO:4具有至少80%或90%的序列同一性。优选地,本发明的IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。更优选地,IL-15活性促进序列包含SEQ ID NO:4(更优选地由其组成)。

[0063] 在一个实施方案中,本发明的IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:9具有至少

70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,本发明的IL-15活性促进序列包含多肽序列(或由其组成),所述多肽序列与SEQ ID NO:9具有至少80%或90%的序列同一性。优选地,本发明的IL-15活性促进序列包含与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。更优选地,IL-15活性促进序列包含SEQ ID NO:9(更优选地由其组成)。

[0064] 虽然本发明的IL-15活性促进序列可以包含SEQ ID NO:4或9(或由其组成),但是,优选地,IL-15活性促进序列包含SEQ ID NO:4(或由其组成)。

[0065] 在一个方面,本发明提供了一种融合多肽,所述多肽包含:白细胞介素-15(IL-15)和肽,其中所述肽的长度为10至60个氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:4或9具有至少70%的序列同一性(优选与SEQ ID NO:4至少70%的序列同一性)。

[0066] 肽的长度可以为至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、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或59个氨基酸。肽的长度可以为小于60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11个氨基酸。

[0067] 优选地,肽的长度为至少32个氨基酸残基。

[0068] 在一个实施方案中,肽的长度至少为15、20、25或30个氨基酸残基,并且长度可高达60、55或50个氨基酸残基。在一个实施方案中,肽的长度为25-55个氨基酸残基。优选地,肽的长度为40-50个氨基酸残基。更优选地,肽的长度为45-50个氨基酸残基,例如长度为46个氨基酸残基。

[0069] 肽可以包含至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基。优选地,肽包含至少一个半胱氨酸残基,更优选地包含一个半胱氨酸残基。至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可位于或靠近(优选位于)肽的N-或C端(当指肽的初级多肽序列时)。至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基的位置可以适当地基于肽相对于IL-15的位置来确定。换言之,当肽位于IL-15的C端时(当指融合多肽的一级多肽序列时),至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可以位于或靠近(优选位于)肽的C端,而当肽位于相对于IL-15的N端时(当指融合多肽的一级多肽序列时),至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基可以位于或靠近(优选位于)肽的N端。优选地,至少一个半胱氨酸或赖氨酸残基位于或靠近(优选位于)肽的C端。

[0070] 本发明的融合多肽可包含与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:5具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。更优选地,本发明的融合多肽包含SEQ ID NO:5(更优选地由其组成)。

[0071] 本发明的融合多肽可包含与SEQ ID NO:10具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:10具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。更优选地,本发明的融合多肽包含SEQ ID NO:10(更优选地由其组成)。

[0072] 本发明的融合多肽可包含与SEQ ID NO:28具有至少70%序列同一性的多肽序列

(或由其组成)。在一个实施方案中,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:28具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,本发明的融合多肽包含与SEQ ID NO:28具有至少95%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。更优选地,本发明的融合多肽包含SEQ ID NO:28(更优选地由其组成)。

[0073] 虽然融合多肽可以包含SEQ ID NO:5、10或28(或由其组成),但是,优选地,融合多肽包含SEQ ID No:5(或由其组成)。

[0074] 本发明的IL-15活性促进序列有利地提供了方便的支架,一个或多个治疗相关的集团可以缀合到该支架上,而不显著影响融合多肽的IL-15部分的活性。

[0075] 在一个实施方案中,膜结合元件可以与IL-15活性促进序列缀合,从而提供能够以受体非依赖性结合细胞表面的融合多肽。因此,包含膜结合元件的融合多肽能够结合细胞膜,例如本文所述的癌细胞的细胞膜。有利地,这种融合多肽可以局部施用,使得融合多肽在特定位置具有作用而不是具有全身作用。

[0076] 膜结合元件可以是能够与细胞膜结合的任何合适的分子。这种分子可以使用如下修改的“细胞表面结合测定法”来鉴定:

[0077] a) 在25℃下孵育 8×10^6 Jurkat或绵羊红细胞和与本发明的融合多肽(例如SEQ ID NO:5)缀合的推定膜结合元件20分钟;

[0078] b) 用含有2%FCS(胎牛血清)的PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤细胞;

[0079] c) 在室温25℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0080] e) 在4℃下、在黑暗中孵育细胞与2 μ l小鼠抗人IL-15PE-缀合的抗体20分钟;

[0081] f) 用含有2%FCS的PBS洗涤细胞;

[0082] g) 在室温4℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0083] h) 用含有2%FCS的PBS洗涤细胞;

[0084] i) 在室温4℃下以1800rpm离心5分钟并去除任何上清液;

[0085] j) 在400 μ l含有2%FCS的PBS中重悬细胞;

[0086] k) 通过流式细胞术定量推定的膜结合元件-融合肽缀合物与细胞的结合;

[0087] l) 比较k)中定量的结合与对照样品中定量的结合,该对照样品在相同条件下进行测定,但具有融合肽而不存在推定的膜结合元件(例如SEQ ID NO:5);和

[0088] m) 其中,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合更大(优选统计学上显著更大)时,推定的膜结合元件被确认为膜结合元件;或者,其中当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合基本上等同(例如,在没有统计学上显著差异的情况下,优选地在定量的结合相同的情况下)或更少(优选地在统计学上显著更少)时,推定的膜结合元件被确认为不是膜结合元件。

[0089] 技术人员将理解,可以修改细胞表面结合测定法使得步骤l)中使用的对照是阳性对照,例如本文示例的融合多肽,例如SEQ ID NO:7。在这种情况下,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合基本上等同(例如,在没有统计学上显著差异的情况下,优选位于定量的结合相同的情况下)或更大(优选统计学上显著更大)时,推定的膜结合元件被确认为膜结合元件。类似地,当与对照样品中定量的结合相比较时,当定量的结合更少(优选统计学上显著更少)时,推定的膜结合元件被确认为不是膜结合元件。

[0090] 合适的天然存在的膜结合元件是本领域技术人员熟知的,其作为蛋白质组分介导

膜相互作用,或者作为膜组分如甾醇或鞘脂。

[0091] 膜结合元件应是足够亲水的,以确保当与本发明的融合多肽缀合时,所述多肽表现出足够水平的溶解度。

[0092] 膜结合元件优选选自:脂肪酸衍生物如脂肪酰基;碱性氨基酸序列;已知膜内在蛋白质的配体;源自针对膜蛋白表位的单克隆抗体的互补决定区的序列;以及通过随机化学或肽文库筛选鉴定的膜结合序列。

[0093] 源自已知的膜内在蛋白质配体的氨基酸序列的示例包括含RGD的肽,例如GRGDSP (SEQ ID NO:14),其是人血小板膜整联蛋白的 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的配体。另一个示例是DGPSEILRGDFSS (SEQ ID NO:15),其源自人纤维蛋白原 α 链,其与血小板中的GpIIb/IIIa膜蛋白结合。

[0094] 这种序列的其他示例包括已知参与膜蛋白如受体和主要组织相容性复合物之间相互作用的那些序列。这种膜蛋白配体的示例是序列GNEQSFRVDLRTLLRYA (SEQ ID NO:16),其已显示以中等亲和力结合主要组织相容性复合物1类蛋白(MHC-1)(L.Olsson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.91,9086-909,1994)。此类序列的进一步的示例采用T细胞特异性的膜插入地址(address)。这种序列来源于已知的T细胞抗原受体的跨膜螺旋与CD3的相互作用(Nature Medicine 3,84-88,1997)。示例是包含序列GFRILLKLV (SEQ ID NO:32)的肽,例如:SAAPSSGFRILLKLV (SEQ ID NO:17)和AAPSVIGFRILLKLVAG (SEQ ID NO:18)。膜内在蛋白的配体的示例是碳水化合物配体Sialyl Lewis^x,其已被鉴定为膜内在蛋白ELAM-1的配体(M.L.Phillips等人,Science,250,1130-1132,1990&G.Walz et al,Ibid,250,1132-1135,1990)。源自针对膜蛋白内表位的单克隆抗体的互补决定区的序列(参见,例如,J.W.Smith等人,J.Biol.Chem.270,30486-30490,1995),也是合适的膜结合元件,来自随机化学文库的结合序列也是合适的,例如以噬菌体展示形式产生并通过生物淘选操作在体外(G.F.Smith和J.K.Scott,Methods in Enzymology,217H,228-257,1993)或体内(R.Pasqualini&E.Ruoslahti,Nature,380,364-366,1996)选择的那些。任选地,可以使用以下机理,例如pH敏感性(静电开关)、通过金属离子结合的调节(使用内源性Ca²⁺、锌²⁺和在膜结合元件中掺入离子结合位点)和蛋白酶切割(例如,富含赖氨酸的膜结合序列的纤溶酶分解以释放和活化尿激酶原),将从膜的条件分离物并入本发明的衍生物中。

[0095] 在一个实施方案中,膜结合元件可以是已被衍生化以增加其水溶性的磷脂。例如,可以用亲水聚合物如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖或聚肌氨酸使磷脂被衍生化。其他合适的聚合物对技术人员来说是显而易见的。然而,优选的膜结合元件不是PEG。

[0096] 膜结合元件可包含糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚或其类似物(或由其组成)。合适的GPI锚和类似物为本领域技术人员所熟知,并描述于例如Paulick MG和Bertozzi CR (Biochemistry 47:6991-7000,2008)中。GPI锚的碳水化合物部分可以由任何合适的糖单体组成。合适的糖单体对于本领域技术人员来说是显而易见的,碳水化合物部分的长度也是如此。然而,优选的膜结合元件不是GPI锚。

[0097] 在一个替代实施方案中,膜结合元件可包含肽(或由其组成),所述肽能够与细胞的细胞外膜的一种或多种组分例如磷脂相互作用。优选地,肽为3至25个氨基酸。更优选地,肽为4至20个氨基酸。优选地,肽是亲水性肽。在一些实施方案中,亲水性肽包含至少三个带电荷的氨基酸。带电荷的氨基酸可以是赖氨酸。在一个实施方案中,肽包含3至8个赖氨酸残基,优选地,L-赖氨酸残基。合适的亲水性肽如SEQ ID NO:6所示。在一个实施方案中,亲水

性肽可以包含肽序列(或由其组成),所述肽序列与SEQ ID NO:6具有至少70%的序列同一性。在一个实施方案中,亲水性肽可以包含肽序列(或由其组成),所述肽序列与SEQ ID NO:6具有至少80%或90%的序列同一性。优选地,亲水性肽可以包含肽序列(或由其组成),所述肽序列与SEQ ID NO:6具有至少95%的序列同一性。更优选地,亲水性肽包含SEQ ID NO:6(更优选地由其组成)。包含在亲水性肽中的半胱氨酸残基可以是活化的半胱氨酸,例如(S-2-吡啶基二硫代)-C-酸。在与融合多肽缀合后,活化的半胱氨酸可发生化学变化,使得其变成与融合多肽的相应半胱氨酸残基二硫键合的标准半胱氨酸残基。

[0098] 肽的进一步合适的示例可以包括:DGPKKKKKKSPSKSSG(SEQ ID NO:19); GSSKSPSKKKKKKPGD(SEQ ID NO:20);SPSNETPKKKKKRFSFKKSG(SEQ ID NO:21); DGPKKKKKKSPSKSSK(SEQ ID NO:22);和SKDGKKKKKKSKTK(SEQ ID NO:23)。

[0099] 膜结合元件可以包含一个或多个能够与细胞膜的脂质双层核心相互作用的疏水基团(或由其组成)。合适的基团为本领域技术人员所熟知。在一个实施方案中,一个或多个基团可以是脂肪酰基,例如肉豆蔻酰基、棕榈酰基或硬脂酰基。

[0100] 本文的脂肪酸衍生物可以是氨基C₂₋₆烷硫醇的C₁₀₋₂₀脂肪酰基衍生物(任选C-取代的),例如N-(2-肉豆蔻酰基)氨基乙硫醇或N-肉豆蔻酰基L-半胱氨酸。

[0101] 合适的疏水基团的其他示例包括长链脂肪胺和硫醇、类固醇和法呢基衍生物。这种方法基于肉豆蔻酰静电开关(MES)的结构和功能(Thelen M等人,Nature 351:320-2, 1991)。在一个实施方案中,一个或多个基团是类异戊二烯基团,例如法呢基和香叶酰香叶酰残基。肉豆蔻酰基(12个亚甲基单元)不够大或疏水性不够,无法与膜以高亲和力结合。对肉豆蔻酰基化肽的研究(例如R.M.Peitzsch&S.McLaughlin,Biochemistry,32,10436-10443,1993))表明其在模型脂质系统中的有效解离常数约为10⁻⁴M,12个亚甲基中的大约10个被埋在脂质双层中。因此,具有约8-18个亚甲基单元,优选10-14个亚甲基单元的脂肪族酰基是合适的膜结合元件。合适的脂肪酸衍生物的其他示例包括长链(8-18,优选10-14亚甲基)脂肪胺和硫醇、类固醇和法呢基衍生物。

[0102] 优选地,本发明的膜结合元件包含脂肪族酰基,更优选包含肉豆蔻酰基或其衍生物。

[0103] 亲水性合成聚合物的合适示例包括聚乙二醇(PEG),优选 α , ω 官能化衍生物,更优选分子量在400和5000道尔顿之间的 α -氨基、 ω -羧基-PEG,其例如通过固相合成方法(氨基衍生化)或硫醇交换化学与多肽连接。

[0104] 膜结合元件可以是能够与细胞膜的脂质双层核心相互作用的多个基团。本发明的化合物可以包含一种或多种膜结合元件。优选地,化合物包含一种膜结合元件。

[0105] 在一个实施方案中,膜结合元件包含一个或多个能够与细胞膜的脂质双层核心相互作用的疏水基团,和能够与细胞膜的脂质双层核心相互作用的肽(例如本文所述的亲水性肽)的组合。优选地,所述基团位于或靠近所述肽的N端区域。

[0106] 膜结合元件可以是W0 98/02454或W0 2011/027175(两者均通过引用并入本文)中公开的一种或多种,并且可以使用W0 98/02454或W0 2011/027175中任一个的方法制备并将膜结合元件与本发明的融合多肽缀合。

[0107] 膜结合元件可以与IL-15活性促进序列的半胱氨酸残基或赖氨酸残基(优选半胱氨酸残基)缀合。在一个优选的实施方案中,膜结合元件的亲水性肽部分与IL-15活性促进

序列的半胱氨酸残基或赖氨酸残基缀合(优选半胱氨酸残基,通过膜结合元件的亲水性肽部分的半胱氨酸和IL-15活性促进序列之间的二硫键的方式缀合)。

[0108] 因此,在一些实施方案中,与膜结合剂缀合的融合多肽可以包含N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC,其通过二硫键与多肽连接。膜结合剂的半胱氨酸(缀合前)可以是活化的半胱氨酸(例如硫代吡啶化半胱氨酸)。膜结合剂可以是在Hill A等人(2006),Blood,107,2131-2137中描述和/或根据其教导制备的一种,该文献的全部内容通过引用并入本文。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的多肽可以具有以下结构(SEQ ID NO:7),其显示在膜结合元件的亲水性肽部分的半胱氨酸残基和IL-15活性促进序列之间存在二硫键:

MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS
LESGDASIHDTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSGSGSRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC

[0110]

|
S
|
S
|

N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC

[0111] 在一个实施方案中,本发明的多肽可以具有以下结构(SEQ ID NO:29),其显示在膜结合元件的亲水性肽部分的半胱氨酸残基和IL-15活性促进序列之间存在二硫键:

MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS
LESGDASIHDTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQM
FINTSGSGSRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC

[0112]

|
S
|
S
|

N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC

[0113] 在一个实施方案中,本发明的多肽可以具有以下结构(SEQ ID NO:13),其显示在膜结合元件的亲水性肽部分的半胱氨酸残基和IL-15活性促进序列之间存在二硫键:

MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS
LESGDASIHDTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGSGSHHHHHHC

[0114]

|
S
|
S
|

N-(α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKKPGDC

[0115] 包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ ID NO:7具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ

ID NO:7具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,包含膜结合元件的融合多肽可以包含至少具有SEQ ID NO:7的多肽序列(或由其组成)。更优选地,包含膜结合元件的融合多肽包含SEQ ID NO:7(更优选地由其组成)。

[0116] 包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ ID NO:13具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ ID NO:13具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,包含膜结合元件的融合多肽可以包含至少具有SEQ ID NO:13的多肽序列(或由其组成)。更优选地,包含膜结合元件的融合多肽包含SEQ ID NO:13(更优选地由其组成)。

[0117] 包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ ID NO:29具有至少70%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。在一个实施方案中,包含膜结合元件的融合多肽可以包含与SEQ ID NO:29具有至少80%或90%序列同一性的多肽序列(或由其组成)。优选地,包含膜结合元件的融合多肽可以包含至少具有SEQ ID NO:29的多肽序列(或由其组成)。更优选地,包含膜结合元件的融合多肽包含SEQ ID NO:29(更优选地由其组成)。

[0118] 虽然包含膜结合元件的融合多肽可以包含SEQ ID NO:7、13或29(或由其组成),但是,优选融合多肽包含SEQ ID NO:7(或由其组成)。

[0119] 在一些实施方案中,参与融合多肽与膜结合元件缀合的半胱氨酸是修饰的半胱氨酸残基(优选标准半胱氨酸残基)。修饰的半胱氨酸残基可以包括半胱氨酸的酰胺形式(半胱氨酸酰胺)。

[0120] 本发明还提供了编码本发明融合多肽(即本发明融合多肽的蛋白质组分)的核酸。核酸优选是DNA。

[0121] 本发明的核酸可以包含在用于在宿主细胞中表达的载体中。因此,本发明还提供了包含本发明核酸的载体和宿主细胞。载体可以包含与本发明的核酸可操作地连接的启动子并且可以进一步包含终止子。

[0122] 在一个实施方案中,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:8具有至少70%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。在一个实施方案中,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:8具有至少80%或90%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。优选地,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。更优选地,编码本发明的融合多肽的核酸包含SEQ ID NO:8(更优选地由其组成)。

[0123] 在一个实施方案中,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:24具有至少70%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。在一个实施方案中,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:24具有至少80%或90%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。优选地,编码本发明的融合多肽的核酸包含与SEQ ID NO:24具有至少95%序列同一性的核苷酸序列(或由其组成)。更优选地,编码本发明的融合多肽的核酸包含SEQ ID NO:24(更优选地由其组成)。

[0124] 可以使用任何合适的宿主细胞来产生本发明的融合多肽。宿主细胞可以是真核或原核宿主细胞。合适的真核细胞可以包括哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞或HeLa细胞)、酵母细胞(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*))或昆虫细胞(例如,杆状病毒感染的昆虫细胞)。

[0125] 在一个实施方案中,宿主细胞是原核宿主细胞,例如埃希氏菌属或芽孢杆菌属(例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))。优选地,宿主细胞是大肠杆菌(*Escherichia coli*)宿主细胞。

[0126] 在一个优选的实施方案中,载体具有选自以下的启动子:

	启动子	诱导剂	典型诱导条件
[0127]	Tac(杂合)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
	AraBAD	L-阿拉伯糖	0.2% (0.002-0.4%)
	T7-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)

[0128] 在另一个优选的实施方案中,载体具有选自以下的启动子:

	启动子	诱导剂	典型诱导条件
[0129]	Tac(杂合)	IPTG	0.2 mM (0.05-2.0mM)
	AraBAD	L-阿拉伯糖	0.2% (0.002-0.4%)
	T7-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)
[0130]	T5-lac 操纵子	IPTG	0.2 mM(0.05-2.0mM)

[0131] IPTG是指异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷。

[0132] 可以使用本领域已知的任何合适方法来制备本发明的核酸分子。在一个实施方案中,可以使用化学合成技术制备核酸分子。或者,可以使用分子生物学技术来制备本发明的核酸分子。

[0133] 本发明的DNA构建体可以在计算机上设计,然后通过常规DNA合成技术合成。

[0134] 根据将使用的最终宿主细胞(例如大肠杆菌)表达系统,任选地针对密码子偏好修饰上述核酸序列信息。

[0135] 术语“核苷酸序列”和“核酸”在本文中同义使用。优选地,核苷酸序列是DNA序列。

[0136] 在一个方面,本发明涉及一种制备融合多肽的方法,所述方法包括:

[0137] a. 在宿主细胞中表达编码本发明融合多肽的核酸序列;和

[0138] b. 分离融合多肽。

[0139] 分离的融合多肽可以不含替代多肽或细胞物质,例如基本上不含任何替代多肽或细胞物质。换言之,当本发明的融合多肽占存在的总多肽的至少90%时,优选地当本发明的融合多肽占存在的总多肽的至少95%、98%或99%(更优选至少99.9%)时,融合多肽可以被认为是“分离的”。可以使用本领域已知的任何合适的方法例如任何合适的纯化方法,例如色谱法来实现分离。合适的方法可以包括亲和色谱法、离子交换(例如阳离子或阴离子交换)色谱法和免疫亲和色谱法。优选地,纯化通过金属螯合物色谱法,更优选镍螯合物色谱法进行。在一些实施方案中,本发明的多肽可以进一步包含辅助纯化的标签,例如His-标签,其随后可以被去除,例如通过在标签和多肽之间工程化的切割位点,例如TEV切割位点去除。

[0140] 在一个相关方面,本发明提供了一种可通过本发明的方法获得的融合多肽。

[0141] 如本文所用的术语“可获得的”还包括术语“获得的”。在一个实施方案中,术语“可

获得的”是指获得的。

[0142] 本发明的融合多肽可以任何合适的方式配制。因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明的融合多肽和药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐。如本文所用，术语“药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐”是指可以施用于受试者而不对所述受试者造成伤害的载体、赋形剂、佐剂和/或盐。例如，适合于肿瘤内、静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内肌内和/或皮下施用的载体、赋形剂、佐剂和/或盐。在一个实施方案中，药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂和/或盐是可注射的载体、赋形剂、佐剂和/或盐，例如无菌生理盐水溶液。

[0143] 可用于本发明药物组合物中的药学上可接受的赋形剂包括但不限于：血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘油、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质、磷酸氢二钠、磷酸氢钾和氯化钠。本发明的药物组合物可以包含任何常规的无毒药学上可接受的载体或载剂。药物组合物可以是无菌可注射制剂的形式，例如作为无菌可注射水性或油质悬浮液。该悬浮液可以根据本领域已知的技术、使用合适的分散剂或润湿剂（例如吐温80）和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受载剂和溶剂包括甘露醇、水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的，可以使用任何温和的固定油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸，例如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备可注射剂，天然药学上可接受的油也可以，例如橄榄油或蓖麻油，尤其是其聚氧乙基化形式。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂。优选地，本发明的融合多肽存在于水性溶液中。

[0144] 可以添加到组合物中的其他药学上可接受的添加剂是本领域技术人员众所周知的。

[0145] 在一个方面，本发明还提供了一种试剂盒，其包含：本发明的融合多肽或药物组合物；和使用其的说明。适当地，说明书可以是关于如本文所述的试剂盒在治疗癌症中的用途。在一些实施方案中，说明书还详述了适当的给药方案（例如，如本文所述）。在一个实施方案中，说明书是关于所述试剂盒在治疗前列腺癌中的用途。

[0146] 本发明的融合多肽特别适用于治疗癌症。因此，在一个方面，本发明提供了一种用于治疗癌症的融合多肽。本发明还提供了本发明的融合多肽在制备用于治疗癌症的药物中的相关用途，以及治疗癌症的方法，所述方法包括向受试者施用本发明的融合多肽。还提供了药物组合物（或其他预期的制剂）的类似用途/方法。还提供了试剂盒的类似用途/方法。

[0147] 本发明的融合多肽可以抑制癌细胞的生长、增殖和/或转移。例如，本发明的融合多肽可以根除癌细胞、抑制癌细胞增殖和/或减小癌症的大小。

[0148] 用于治疗癌症优选不是血液癌症，例如白血病、淋巴瘤和/或多发性骨髓瘤。

[0149] 在一个实施方案中，癌症是实体瘤癌症，例如癌或肉瘤。

[0150] 实体瘤癌症可以是肉瘤，例如骨肉瘤或成骨肉瘤（骨）、软骨肉瘤（软骨）、平滑肌肉瘤（平滑肌）、横纹肌肉瘤（骨骼肌）、间皮肉瘤或间皮瘤（体腔膜层）、纤维肉瘤（纤维组织）、血管肉瘤或血管内皮瘤（血管）、脂肪肉瘤（脂肪组织）、神经胶质瘤或星形细胞瘤（脑中存在的神经源性结缔组织）、粘液肉瘤（原始胚胎结缔组织）或间充质或混合中胚层肿瘤（混合结缔组织类型）。

[0151] 优选地,癌症是癌。癌可以是腺癌(在器官或腺体中逐渐形成)或鳞状细胞癌(起源于鳞状上皮)。优选地,癌是腺癌。

[0152] 可替代地或另外地,实体瘤癌症可以是混合型,其包含来自一种或多种不同癌症类别的组分。混合型癌症的一些示例包括腺鳞癌、混合中胚层肿瘤、癌肉瘤和畸胎瘤。

[0153] 根据本发明治疗的癌症(例如实体瘤癌症)可以是选自以下的一种或多种:前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、卵巢癌、胰腺癌、脑癌、头癌、颈癌、淋巴瘤和神经元癌。

[0154] 在一个特别优选的实施方案中,癌症是前列腺癌。前列腺癌可以是导管前列腺癌或腺泡前列腺癌,优选导管前列腺癌。

[0155] 融合多肽或药物组合物可以治疗有效量或预防有效量施用于受试者。

[0156] 术语“受试者”和“患者”在本文中作为同义词使用。“受试者”可以是哺乳动物受试者,例如人、伴侣动物(例如宠物,如狗、猫和兔)、家畜(例如猪、绵羊、牛和山羊)和马。优选地,“受试者”是人受试者。

[0157] 如本文所用,术语“治疗”包括预防性治疗(例如,防止疾病发作)以及纠正性治疗(治疗已经患有疾病的受试者)。如本文所用,优选地“治疗”是指纠正性治疗。

[0158] 如本文所用,术语“治疗”是指病患和/或其症状。

[0159] “治疗有效量”是本发明的融合多肽或药物组合物的任何量,当单独或组合施用于受试者以治疗癌症(或其症状)时,所述“治疗有效量”足以实现对疾患或其症状的这种治疗。

[0160] “预防有效量”是本发明的融合多肽或药物组合物的任何量,当单独或组合施用于受试者时,所述“预防有效量”抑制或延缓癌症(或其症状)的发作或复发。在一些实施方案中,预防有效量完全防止癌症的发作或复发。“抑制”发作意味着减少癌症(或其症状)发作的可能性,或完全防止发作。

[0161] 合适的剂量范围是产生所需治疗效果的剂量范围(例如,其中融合多肽或药物组合物以治疗或预防有效量给药)。

[0162] 典型的治疗方案可以包括以高达1mg融合多肽的剂量(例如,静脉内或皮下),例如以0.1-1mg,例如0.2-0.5mg的剂量,向受试者施用本发明的融合多肽或药物组合物。

[0163] 待治疗的受试者可以每周一次、两次、三次、四次、五次或六次给药。或者,受试者可以每天给药(例如每天一次或两次)。在其他实施方案中,受试者可以每周或每两周一次给药。优选地,受试者可以每两周给药一次。

[0164] 技术人员将理解,可以基于受试者的需要和药物的功效来调整剂量。例如,在药物高度有效的情况下,可以降低剂量。

[0165] 治疗期限可以根据受试者对治疗的反应和/或癌症的类型和/或严重程度而变化。

[0166] 施用可以通过任何合适的技术或途径进行,包括但不限于肿瘤内、静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、肌内和/或皮下。尽管本发明考虑了不同的施用方法,但特别优选地,肿瘤内施用本发明的融合多肽。如此,肿瘤内施用可以通过肿瘤内注射来实现。

[0167] 可以用本发明的融合多肽或药物组合物与不同的癌症治疗剂(如化疗剂或免疫治疗剂)组合治疗受试者。换言之,融合多肽或药物组合物可以是辅助疗法。

[0168] 与本发明的各种融合多肽相关的实施方案旨在等同地应用于方法、用途、试剂盒

或药物组合物中,反之亦然。

[0169] 序列同源性

[0170] 多种序列比对方法中的任何都可以用于确定同一性百分比,包括但不限于全局方法、局部方法和混合方法,例如区段方法。确定同一性百分比的方案是本领域技术人员范围内的常规程序。全局方法从分子的开始到结束比对序列,并通过累加各个残基对的分数和通过施加空位罚分来确定最佳比对。非限制性方法包括,例如CLUSTAL W,参见例如,Julie D.Thompson等人,CLUSTAL W:Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting,Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice,22(22)Nucleic Acids Research 4673-4680(1994);和迭代改进,参见例如,Osamu Gotoh,Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments,264(4)J.Mol.Biol.823-838(1996)。局部方法通过鉴定所有输入序列共有的一个或多个保守基序来比对序列。非限制性方法包括,例如火柴盒(Match-box),参见例如Eric Depiereux and Ernest Feytmans,Match-Box:A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences,8(5)CABIOS 501-509(1992);Gibbs采样,参见例如C.E.Lawrence等人,Detecting Subtle Sequence Signals:A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment,262(5131)Science 208-214(1993);Align-M,参见,例如,Ivo Van Waillie等人,Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences,20(9)Bioinformatics:1428-1435(2004)。

[0171] 因此,通过常规方法确定序列同一性百分比。参见,例如,Altschul等人,Bull.Math.Bio.48:603-16,1986and Henikoff and Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-19,1992。简而言之,如下所示,使用空位开放罚分10,空位延伸罚分1,以及Henikoff和Henikoff的“blosum 62”评分矩阵(同上)对两个氨基酸序列进行比对,以优化比对得分(氨基酸由标准的单字母代码表示)。

[0172] 两个或更多个核酸或氨基酸序列之间的“序列同一性百分比”是该序列共有的相同位置数目的函数。因此,同一性%可以计算为相同核苷酸/氨基酸的数目除以核苷酸/氨基酸的总数,再乘以100。%序列同一性的计算也可以考虑需要引入以优化两个或更多个序列比对的空位的数目,以及每个空位的长度。可以使用本领域技术人员熟悉的特定数学算法(例如BLAST)进行序列比较和确定两个或多个序列之间的同一性百分比。

[0173] 确定序列同一性的比对得分

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

[0174] I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

[0175] 然后,百分比同一性计算为:

相同匹配的总数

x 100

[0176] **[较长序列的长度加上**

引入较长序列以比对两个序列的空位数目]

[0177] 基本上同源的多肽的特征在于具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。这些变化优选是不重要的,即,保守的氨基酸取代(见下文)和不显著影响多肽折叠或活性的其他取代;小的缺失,通常缺失1至约30个氨基酸;和小的氨基或羧基末端延伸,例如氨基末端氨基酸残基,最多约20-25个残基的小接头肽或亲和标签。

[0178] 保守氨基酸取代

[0179] 碱性:精氨酸

[0180] 赖氨酸

[0181] 组氨酸

[0182] 酸性:谷氨酸

[0183] 天冬氨酸

[0184] 极性:谷氨酰胺

[0185] 天冬酰胺

[0186] 疏水性:亮氨酸

[0187] 异亮氨酸

[0188] 缬氨酸

[0189] 芳香族:苯丙氨酸

[0190] 色氨酸

[0191] 酪氨酸

[0192] 小的:甘氨酸

[0193] 丙氨酸

[0194] 丝氨酸

[0195] 苏氨酸

[0196] 蛋氨酸

[0197] 除20个标准氨基酸外,非标准氨基酸(例如4-羟基脯氨酸、6-N-甲基赖氨酸、2-氨基异丁酸、异缬氨酸和 α -甲基丝氨酸)可以取代本发明多肽的氨基酸残基。有限数量的非保守氨基酸、不是由遗传密码子编码的氨基酸和非天然氨基酸可以取代多肽氨基酸残基。本发明的多肽还可以包含非天然存在的氨基酸残基。

[0198] 非天然存在的氨基酸包括但不限于,反式-3-甲基脯氨酸、2,4-甲醇基-脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基脯氨酸、N-甲基甘氨酸、别苏氨酸、甲基苏氨酸、羟乙基半胱氨酸、羟乙基高半胱氨酸、硝基谷氨酰胺、高谷氨酰胺、哌啶酸、叔亮氨酸、正缬氨酸、2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸和4-氟苯丙氨酸。用于将非天然存在的氨基酸残基并入蛋白质中的几种方法是本领域已知的。例如,可以使用体外系统,其中使用化学氨酰化的抑制子tRNA抑制无义突变。合成氨基酸和氨酰化tRNA的方法是本领域已知的。包含无义突变的质粒的转录和翻译是在无细胞系统中进行的,该系统包含大肠杆菌S30提取物以及可商购的酶和其他试剂。蛋白质通过色谱法纯化。参见,例如,Robertson等人,J. Am. Chem. Soc. 113:2722,1991;Ellman等人,Methods Enzymol. 202:301,1991;Chung等人,Science 259:806-9,1993;和Chung等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9,1993)。在第二种方法中,通过显微注射突变的mRNA和化学氨酰化的抑制子tRNA在非洲爪蟾卵母细胞中进行翻译(Turcatti等人,J. Biol. Chem. 271:19991-8,1996)。在第三种方法中,在不存在待替代的天然氨基酸(例如,苯丙氨酸)和存在期望的非天然存在的氨基酸(例如,2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸或4-氟苯丙氨酸)的情况下培养大肠杆菌细胞。将非天然存在的氨基酸并入多肽,代替其天然对应物。参见,Koide等人,Biochem. 33:7470-6,1994。可通过体外化学修饰将天然存在的氨基酸残基转化为非天然存在的物质。化学修饰可以与定点诱变组合使用,以进一步扩大取代范围(Wynn and Richards,Protein Sci. 2:395-403,1993)。

[0199] 有限数量的非保守氨基酸、不是由遗传密码子编码的氨基酸、非天然存在的氨基酸和非天然氨基酸可以取代本发明多肽的氨基酸残基。

[0200] 可以根据本领域已知的程序来鉴定本发明多肽中的必需氨基酸,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham and Wells,Science 244:1081-5,1989)。也可以通过结构的物理分析来确定生物相互作用的位点,如通过核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记等技术,结合假定的接触位点氨基酸突变来确定。参见,例如,de Vos等人,Science 255:306-

12,1992;Smith et al.,J.Mol.Biol.224:899-904,1992;Wlodaver等人,FEBS Lett.309:59-64,1992。还可以从与本发明多肽的相关组分(例如易位或蛋白酶组分)的同源性分析中推断出必需氨基酸的鉴定。

[0201] 可以使用诱变和筛选的已知方法进行多种氨基酸取代,并进行测试,例如 Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7,1988)或Bowie and Sauer (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2152-6,1989)中公开的那些方法。简而言之,这些作者公开了同时使多肽中的两个或更多个位置随机化,选择功能性多肽,然后对诱变的多肽进行测序以确定每个位置上允许取代的谱的方法。可以使用的其他方法包括噬菌体展示(例如,Lowman等人,Biochem.30:10832-7,1991;Ladner等人,美国专利号5,223,409;Huse,WIPO公开W0 92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire等人,Gene 46:145,1986;Ner等人,DNA 7:127,1988)。

[0202] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY,第20版,John Wiley and Sons,New York(1994),和Hale&Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY,Harper Perennial,NY(1991),为熟练的技术人员提供了本公开中使用的许多术语的通用词典。

[0203] 本公开内容不受本文公开的示例性方法和材料的限制,并且与本文描述的那些方法或材料类似或等同的任何方法和材料都可以用于本公开内容的实施方案的实践或测试。数字范围包括定义范围的数字。除非另有说明,否则任何核酸序列都以5'至3'的方向从左至右书写;氨基酸序列分别以氨基至羧基的方向从左至右书写。

[0204] 本文提供的标题不是对本公开的各个方面或实施方案的限制。

[0205] 在本文中,使用氨基酸名称、三字母缩写或单字母缩写来指代氨基酸。如本文所用,术语“蛋白质”包括蛋白质、多肽和肽。如本文所用,术语“氨基酸序列”与术语“多肽”和/或术语“蛋白质”同义。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“肽”同义。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“酶”同义。术语“蛋白质”和“多肽”在本文可互换使用。在本公开和权利要求中,可以使用氨基酸残基的常规单字母和三字母密码子。根据IUPACIUB生化命名联合委员会(JCBN)定义氨基酸的3个字母密码子。还应理解,由于遗传密码子的简并性,多肽可以被一个以上的核苷酸序列编码。

[0206] 术语的其他定义可能在整个说明书中出现。在更详细地描述示例性实施方案之前,应当理解,本公开不限于所描述的特定实施方案,并因此可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,而不旨在进行限制,因为本公开的范围仅由所附权利要求书限定。

[0207] 在提供值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另外明确指出,否则在该范围的上限和下限之间、每个居中值,至下限单位的十分之一,具体包括在本公开内。在指定范围内的任何指定值或居中值与该指定范围内的任何其他指定值或居中值之间的每个较小范围都包括在本公开中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或排除在该范围内,并且每个范围也包括在本公开内,其中包括在较小范围内的上下限之一、均不包括、或包括二者,以所述范围内的任何明确排除的限为准。在所述范围包括一个或两个限的情况下,排除这些限中所包括的任一个或两个的范围也包括在本公开中。

[0208] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式的“一个”,“一种”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“融合多肽”包括多种这样的候选试剂,并且提及“融合多肽”包括提及一种或多种融合多肽及本领域技术人员已知的其等同物,等等。

[0209] 本文所讨论的出版物仅在本申请的提交日期之前提供其公开内容。本文中的任何内容均不应解释为承认此类出版物构成了所附权利要求的现有技术。

附图说明

[0210] 现在将参考以下附图和实施例仅以举例的方式描述本发明的实施方案。

[0211] 图1显示:(A)各种Th1细胞因子(与磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照相比)在外周血单核细胞(PBMC)和前列腺癌细胞(PC3和LNCaP)的共培养物中扩增和活化自然杀伤(NK)细胞和CD8 T细胞的能力;和(B)通过膜联蛋白-FITC和碘化丙啶(PI)染色的穿孔素表达以及肿瘤细胞的凋亡和坏死,显示NK和CD8 T细胞的细胞毒性能力。

[0212] 图2显示了在如实施例所述的CTLL-2测定法中,与未修饰的野生型IL-15相比,修饰的IL-15(包含活性促进序列)的活性。

[0213] 图3显示了通过凝胶电泳、随后通过硝酸银染色、蛋白质印迹分析和荧光标记的尾化合物PTL3146的紫外光可视化,对有尾的IL-15的可视化。圈起来的条带代表主要的有尾蛋白质部分。泳道4包含新制备的修饰IL-15,其在银染色和抗IL-15蛋白印迹上是纯的。泳道图例:1=标志物;2、4=修饰的IL-15;3=带有FAM标记的尾的膜锚定修饰IL-15。

[0214] 图4通过流式细胞术显示膜锚定修饰IL-15(“有尾的IL-15”)和修饰IL-15(“无尾的IL-15”)的细胞膜结合:(A)30分钟和24小时后的Jurkat细胞;和(B)绵羊红细胞。

[0215] 图5显示了修饰的IL-15(“无尾”)与膜锚定修饰IL-15(“有尾”)和野生型未修饰的IL-15的活性。通过如实施例所述的CTLL-2测定法,在490nm的吸光度下测量增殖, $n=3$ 次实验。

[0216] 图6显示了用IL-2(100单位/ml)、野生型IL-15、修饰的IL-15(“无尾IL-15”)和膜锚定修饰IL-15(“有尾IL-15”) (各2.5ng/ml)处理的PBMC群中NK增殖的比较。A显示来自流式细胞术分析的代表性斑点印迹。斑点印迹的左上象限代表NK细胞(CD56+CD3⁻)。B显示测试的IL-15多肽使(人PBMC)显示人NK细胞的扩增的图。对照=仅PBS。

[0217] 图7显示在存在IL-2、野生型IL-15(IL-15_{pep.})、修饰的IL-15(“无尾的IL-15”)和膜锚定修饰IL-15(“有尾的IL-15”)的情况下,对与人NK细胞共培养的PC3细胞的杀伤。通过碘化丙啶(PI)对细胞的阳性染色表示细胞杀伤。 $n=2$, $*p<0.05$,单因素ANOVA和事后检验Newman-Keuls。对照=仅PBS。

[0218] 图8显示IL-15对TRAMP-C2前列腺肿瘤异种移植物生长的影响。在第0天和第3天,向具有约100mm³ TRAMP-C2肿瘤的小鼠肿瘤内注射载剂(100μl PBS, $n=10$)、10μg无尾IL-15($n=10$)或有尾的IL-15($n=10$),或腹膜内注射无尾的IL-15($n=6$)。(A)直到治疗后第14天的肿瘤体积。(B)治疗后治疗小鼠的生存曲线。生存终点是肿瘤达到最大直径15mm时。任何治疗均未引起副作用($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$,双因素ANOVA与Dunnett多重比较事后检验)。

[0219] 图9显示离体组织病理学评估TRAMP-C2前列腺肿瘤。在实验终点切除肿瘤,快速冷

冻,随后以10 μ m切片。(a) H&E染色切片的合成图像,显示同一图像的坏死区域和放大区域。(b) NK1.1 (NK细胞) 和CD3抗体染色切片的合成图像。(c) CD8和KLRA1 (NK细胞) 抗体染色的切片的合成图像。(d) 用CD4抗体染色的切片的合成图像。所有荧光切片中的细胞核都用DAPI染色。

[0220] 图10显示图9中“载剂”和“有尾的IL-15”组织病理学评估的定量:a) 坏死,b) CD8+染色,c) CD4+染色,d) CD3+染色,和e) NK1.1 (NK细胞) 染色。定量基于从每组中至少6只动物获得的结果。

[0221] 图11显示如通过IL-15ELISA所测量的,与不同浓度的野生型IL-15和修饰的IL-15多肽SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12孵育后,CTLL-2细胞的增殖。通过MTS测定法在490nm的吸光度下测量增殖。 $N=2$ 。 $*=p<0.05$,对SEQ ID NO:28与SEQ ID NO:10进行的T检验。SEQ ID NO:28的活性显著高于SEQ ID NO:12和所有浓度的野生型IL-15 ($p<0.05$,单因素ANOVA和Tukey检验)。

[0222] 图12显示如使用FACs Calibur (BD Biosciences) 通过流式细胞术所分析的,FITC标记的SEQ ID NO:28和野生型IL-15对CTLL-2细胞的结合。

[0223] 序列表

[0224] 在任何以下SEQ ID NO中指示初始Met氨基酸残基或相应的初始密码子时,所述残基/密码子是任选的。

[0225] SEQ ID NO:1 (全长白细胞介素-15)

MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKI

[0226] EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANN
SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS

[0227] SEQ ID NO:2 (成熟的白细胞介素15-氨基酸49-162)

[0228] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS

[0229] SEQ ID NO:3 (成熟的白细胞介素-15)

[0230] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS

[0231] SEQ ID NO:4 (活性促进序列)

[0232] GSGSRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC

[0233] SEQ ID NO:5 (融合多肽)

[0234] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS GSGSRGKSLTSKVP
PTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC

[0235] SEQ ID NO:6 (亲水性肽)

[0236] SSKSPSKKDDKKPGDC

[0237] SEQ ID NO:7 (包含膜结合元件的融合多肽)

[0238] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS GSGSRGKSLTSKVP
PTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC*

[0239] N-(α , ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸) SSKSPSKKDDKKPGDC*

[0240] *表示活性促进肽和膜结合元件之间的二硫键的位置。

[0241] SEQ ID NO:8 (编码SEQ ID NO:28的核酸序列)

- [0242] AACTGGGTGA ACGTTATCTC GGACCTGAAA AAAATCGAAG ACCTGATCCA AAGCATGCAC
ATTGACGCTA CGCTGTATAC GGAAAGCGAT GTGCATCCGT CGTGCAAAGT TACCGCGATG
AAATGTTTT TCCTGGAAC GCAGGTCATT TCGCTGGAAA GCGGCGATGC GAGTATCCAC
GACACCGTTG AAAACCTGAT TATCCTGGCC AACAATTCCC TGAGCTCTGG CAATGTGACG
GAATCAGGTT GCAAAGAATG TGAAGAACTG GAAGAGAAAA ACATCAAAGA ATTCCTGCAG
TCTTCGTCC ATATTGTGCA AATGTTTCATC AATACGAGTG GCTCCGGTTC ACGTGGTAAA
TCTCTGACCA GTAAAGTTCC GCCGACGGTC CAAAAACCGA CCACGGTGAA CGTCCGACC
ACCGAAGTCT CTCCGACCAG TCAGAAAACC ACCACCCACC ATCACCATCA TCATTGC
- [0243] SEQ ID NO:9 (活性促进序列2)
- [0244] GSGSHHHHHHC
- [0245] SEQ ID NO:10 (融合多肽2)
- [0246] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSL
SSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TSGSGSHHHHHHC
- [0247] SEQ ID NO:11 (比较融合序列)
- [0248] GSGSRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPPTTEVSPTSQKTTT KTTTPNAQATRSTPVSRTTKHHHHHHHC
- [0249] SEQ ID NO:12 (比较融合多肽)
- [0250] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSL
SSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TSGSGSRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPPTTEVSPTSQK
TTT KTTTPNAQATRSTPVSRTTKHHHHHHHC
- [0251] SEQ ID NO:13 (包含膜结合元件的融合多肽2)
- [0252] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSL
SSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TSGSGSHHHHHHC*
- [0253] N-(α , ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKKDDKPGDC**表示活性促进肽和膜结合元件之间的二硫键的位置。
- [0254] SEQ ID NO:24 (编码SEQ ID NO:28加Met的核酸序列)
- [0255] ATGAACTGGGTGA ACGTTATCTC GGACCTGAAA AAAATCGAAG ACCTGATCCA AAGCATGCAC
ATTGACGCTA CGCTGTATAC GGAAAGCGAT GTGCATCCGT CGTGCAAAGT TACCGCGATG
AAATGTTTT TCCTGGAAC GCAGGTCATT TCGCTGGAAA GCGGCGATGC GAGTATCCAC
GACACCGTTG AAAACCTGAT TATCCTGGCC AACAATTCCC TGAGCTCTGG CAATGTGACG
GAATCAGGTT GCAAAGAATG TGAAGAACTG GAAGAGAAAA ACATCAAAGA ATTCCTGCAG
TCTTCGTCC ATATTGTGCA AATGTTTCATC AATACGAGTG GCTCCGGTTC ACGTGGTAAA
TCTCTGACCA GTAAAGTTCC GCCGACGGTC CAAAAACCGA CCACGGTGAA CGTCCGACC
ACCGAAGTCT CTCCGACCAG TCAGAAAACC ACCACCCACC ATCACCATCA TCATTGC
- [0256] SEQ ID NO:25 (全长白细胞介素-15变体)
- [0257] MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKI
EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANN
SLSSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TS
- [0258] SEQ ID NO:26 (成熟的白细胞介素-15-氨基酸49-162变体)
- [0259] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TS
- [0260] SEQ ID NO:27 (成熟的白细胞介素-15变体)
- [0261] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TS
- [0262] SEQ ID NO:28 (融合多肽)
- [0263] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN TSGSGSRGKSLTSKVP
TVQKPTTVNVPPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC

- [0264] SEQ ID NO:29 (包含膜结合元件的融合多肽)
MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
- [0265] DTVENLIILANNSLSSGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSGSGSRGKSLTSKVPP
TVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTHHHHHHC*
- [0266] N- (α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸) SSKSPSKDDKKPGDC*
- [0267] *表示活性促进肽和膜结合元件之间的二硫键的位置。
- [0268] SEQ ID NO:31 (膜结合元件)
- [0269] N- (α, ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸) SSKSPSKDDKKPGDC*
- [0270] *表示活性促进肽和膜结合元件之间的二硫键的位置。

实施例

[0271] 实施例1

[0272] 细胞因子选择

[0273] 非贴壁PBMC与经照射的PC3细胞以8:1的比率培养7天,并使用ED₅₀剂量的IL-2、IFN- γ 、IL-12、IL-15或IL-21刺激(IFN γ 、IL-12、IL-15和IL-21为25ng/ml, IL-2为100单位/ml)。使用抗CD3、CD56、CD4、CD8、CD25和FOXP3抗体测量效应细胞的扩增。结果在FACSCalibur上进行分析。通过测量穿孔素来评估NK和CD8 T细胞的细胞毒性能力。使用膜联蛋白/PI试剂盒(Invitrogen),通过用膜联蛋白-FITC和碘化丙锭染色肿瘤细胞,评估凋亡和坏死的细胞死亡。

[0274] 结果表明,在PBMC和前列腺癌细胞的共培养物中,IL-15在活化和扩增NK、NKT和CD8 T细胞方面优于其他所选的Th1细胞因子(图1)。因此,IL-15被选择作为治疗癌症的适当治疗剂用于进一步表征和测试。

[0275] 实施例2

[0276] 修饰的IL-15(本发明的融合多肽)

[0277] 将人IL-15的成熟形式融合到如SEQ ID NO:4所示的延伸C端序列,并在大肠杆菌中重组表达。

[0278] 使用CTLL-2测定法(Soman G, Yang X, Jiang H, 等人, MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of Interleukin-15: Assay qualification, standardization and statistical analysis. Journal of immunological methods. 2009; 348(1-2): 83-94) 测试IL-15的修饰形式。简言之,在IL-15存在下生长CTLL-2细胞(小鼠CD8T细胞系)。所述细胞仅在暴露于白细胞介素-2或白细胞介素-15时才增殖。细胞以 1×10^4 细胞/ml的浓度在存在一系列剂量的IL-15的情况下,在96孔板中培养48小时。在48小时的时间点,使用MTS (5-[3-(羧甲氧基)苯基]-3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑内盐) 染色细胞,这与检测到的细胞数量相关。

[0279] 令人惊讶地,发现修饰形式的IL-15与未修饰的野生型IL-15相比具有改善的活性(参见图2)。因此,发现延伸的C端序列促进IL-15活性。不希望受理论束缚,据信IL-15活性促进序列可以稳定IL-15与其受体的相互作用,从而刺激CLL-2细胞增殖。

[0280] 实施例3

[0281] 膜锚定IL-15的制备

[0282] 为了进一步改善修饰的IL-15的治疗用途,决定引入额外的修饰以将多肽定位于细胞膜。为了实现这一点,采用了细胞位修饰(cytotopic modification)。该步骤使用疏水性膜插入的肉豆蔻酰基,其由亲水性带电荷的氨基酸和C端活化的二硫化物连接(这些组合称为“尾”),其直接连接到蛋白质或肽(通过游离硫醇基团)或间接(通过硫醇化的赖氨酸残基)连接到后者的结构中。该反应产生稳定的两亲性化合物,可与细胞膜的富含磷脂酰丝氨酸的区域栓系。栓系过程由两种非共价相互作用驱动:一种疏水性(肉豆蔻酰基)和一种(基于赖氨酸残基的)静电性。因此,这些药剂可以定位于它们被注射到的任何组织中。

[0283] 使用标准程序将实施例2的修饰的IL-15缀合至尾化合物,即,PTL3146N-(α,ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸)SSKSPSKDDKPGD(S-2-吡啶基二硫代)-C-酸(SEQ ID NO:30)(MW为3KDa):在温和的还原步骤后(在室温下与100 μ M TCEP过夜孵育),将修饰的IL-15与PTL3146在室温下以3:1的摩尔比孵育1小时,然后在4 $^{\circ}$ C下在1升PBS中过夜透析,以去除多余的尾。

[0284] 使用荧光团FAM(羧基荧光素)标记的尾,对无尾和有尾的蛋白质进行凝胶电泳,确认尾与修饰的IL-15连接,并使用识别活性蛋白质的IL-15抗体进行蛋白质印迹分析(图3)。

[0285] 实施例4

[0286] 确认膜锚定IL-15与细胞膜的结合

[0287] 为了测试实施例3的膜锚定IL-15(有尾的IL-15)与细胞膜结合的能力,利用了使用绵羊红细胞或Jurkat细胞的测定法。选择这些细胞类型是因为它们没有能够与IL-15结合的受体或蛋白质。使用藻红蛋白(PE)标记的IL-15抗体,通过流式细胞术分析评估有尾的IL-15与这些细胞的结合。简言之,将相关的IL-15多肽与Jurkat细胞或绵羊红细胞(目录号ABIN770405,antibodies-online)孵育。将细胞离心并重悬于4ml含有2%FCS的PBS中,至最终浓度为 2×10^6 细胞/ml。稀释后,将细胞在室温下以1800rpm离心5分钟,弃去上清液。细胞在室温下与2 μ g有尾或无尾的IL-15一起孵育20分钟。通过用含有2%FCS的PBS洗涤细胞,去除未结合的IL-15,然后在室温下以1800rpm离心5分钟。去除上清液,将细胞在4 $^{\circ}$ C下、在黑暗中与2 μ l小鼠抗人IL15 PE缀合抗体(目录号:IC2471P,R&D Systems)一起孵育20分钟。重复洗涤步骤两次,将细胞重悬于400 μ l含2%FCS的PBS中,并通过流式细胞术进行分析。

[0288] 图4显示在绵羊红细胞(b)或Jurkat细胞(a)上未观察到与无尾的IL-15的结合。相比之下,膜锚定IL-15(有尾的IL-15)表现出高水平的细胞结合,在Jurkat细胞(b)上孵育有尾的IL-15 30分钟或24小时获得了类似的结果,表明其可以通过分子的尾部在细胞膜保留相当长的一段时间。因此,内化是缓慢的,允许显著的细胞表面结合和活性呈递。

[0289] 实施例5

[0290] 膜锚定IL-15的体外活性研究

[0291] 使用CTLL2测定法比较了实施例3的膜锚定修饰的IL-15(有尾的IL-15)和实施例2的非锚定修饰的IL-15(无尾的IL-15)和未修饰的野生型对照IL-15的活性:

[0292] a) 在37 $^{\circ}$ C下,以 5×10^5 细胞/ml的浓度(每孔 5×10^4 细胞,体积为100 μ l)在96孔板中培养鼠CTLL-2细胞(LGC标准,英国[目录号ATCC®TIB-214™])72小时,其中存在有尾的IL-15、无尾的IL-15或仅抗体、或不存在任何IL-15多肽或抗体(未染色);

[0293] b) 将细胞与MTS(5-[3-(羧甲氧基)苯基]-3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑内盐)(Promega[CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay])一起孵育3-4小时(在72小时时间点);和

[0294] c) 通过比色法在490nm的吸光度下定量细胞数量。

[0295] 图5显示,与实施例2的结果一致,非锚定修饰的IL-15(无尾)比野生型IL-15显著更具有活性。然而,膜锚定修饰的IL-15(有尾)有利地比无尾或野生型更具活性。

[0296] 使用人和鼠NK淋巴细胞也证实了有尾IL-15的活性,这些淋巴细胞与有尾和无尾的IL-15一起孵育以诱导其扩增。培养7天后,通过流式细胞术分析NK细胞群,显示有尾的IL-15具有更强的扩增人NK细胞的能力(** $p < 0.05$,与无尾的IL-15或野生型IL-15相比,通过单因素ANOVA和Newman-Keuls事后检验, $n=5$) (图6)。

[0297] 实施例6

[0298] 修饰的IL-15和膜锚定修饰的IL-15对前列腺癌细胞的杀伤

[0299] 与未修饰的野生型(IL-15_{pep.})和IL-2相比,修饰的IL-15(无尾)和膜锚定修饰的IL-15(有尾)均有利地活化NK细胞介导的人前列腺癌细胞的杀伤(参见图7)。这些数据证实了含有IL-15活性促进序列的修饰的IL-15(没有膜锚)和膜锚定修饰的IL-15都对癌细胞,尤其是前列腺癌细胞有效,从而证实了治疗功效。

[0300] 实施例7

[0301] 修饰的IL-15多肽活性的体内研究

[0302] 本发明修饰的IL-15多肽抑制肿瘤生长的功效在C57BL/6小鼠的体内皮下前列腺癌模型中得到进一步证实。雄性6-8周龄C57BL/6小鼠皮下注射无菌PBS中的 5×10^6 TRAMP-C2肿瘤细胞。当肿瘤达到 100 mm^3 时,小鼠肿瘤内注射无菌PBS(载剂, $n=10$)、修饰的IL-15“无尾的IL-15”(n=10)、膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”(n=10),或腹膜内注射(i.p.)修饰的IL-15“无尾的IL-15”(n=6)。每周测量肿瘤生长多达3次,直到肿瘤达到15mm的最大直径,在此阶段动物被淘汰。

[0303] 与载剂注射相比,肿瘤内注射膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”和修饰的IL-15“无尾的IL-15”在第14天使肿瘤生长降低(分别为50%和32%)。与载剂相比,腹膜内注射修饰的IL-15“无尾的IL-15”可使肿瘤生长降低16% (图8A)。

[0304] 膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”和修饰的IL-15“无尾的IL-15”都增加了存活。与载剂组的17天相比,膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”显著增加了存活,至28天。修饰的IL-15“无尾的IL-15”在肿瘤内注射时将存活提高到25天,在腹膜内注射时提高到19天(图8B)。

[0305] 从动物获得的肿瘤组织的组织学分析显示,与PBS组相比,在用膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”和修饰的IL-15“无尾的IL-15”处理的那些动物中,如H&E染色所见的坏死增加,并且NK细胞、CD4和CD8 T的浸润增加(图9)。从图10中提供的定量结果可以看出,膜锚定修饰的IL-15“有尾的IL-15”的结果特别引人注目。

[0306] 实施例8

[0307] 替代修饰的IL-15多肽

[0308] 将替代的C端延伸与IL-15融合,并且在CTLL-2测定法中比较了其 SEQ ID NO:28 和野生型IL-15的活性。

[0309] 通过将IL-15与11个氨基酸的序列(SEQ ID NO:9)融合形成第一构建体,产生融合多肽SEQ ID NO:10。通过将IL-15与67个氨基酸的序列(SEQ ID No:11)融合形成第二(比较)构建体,产生比较融合多肽SEQ ID NO:12。

[0310] 表达和纯化融合多肽,随后根据实施例1在CTLL-2活性测定法中进行测试。

[0311] 结果

[0312] 根据制造商的说明,使用来自Biolegend (London UK) 的IL-15Elisa Max计算的蛋白质浓度比较蛋白质。IL-15Elisa测量样品中构象正确的IL-15(即,被IL-15抗体识别)。

[0313] 图11显示了在CTLL-2测定法中与SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12以及未修饰的野生型IL-15 (Peprotech,UK) 相比,SEQ ID NO:28的活性。与其他三种蛋白质相比,SEQ ID NO:28显著更具有活性,而含有11个氨基酸C端延伸的构建体(SEQ ID NO:10) 还显示出与野生型IL-15和比较构建体SEQ ID NO:12相比改善的活性。因此,11个氨基酸残基的序列也起到IL-15活性促进序列的作用,而包含67个氨基酸残基序列的融合体显示出与野生型IL-15相似的活性。

[0314] 实施例9

[0315] 修饰的IL-15与其受体的结合

[0316] 为了比较SEQ ID NO:28和野生型IL-15与CTLL-2细胞的结合,用异硫氰酸荧光素标记蛋白。简而言之,将100 μ g制备成浓度为4mg/ml的蛋白质在200mM pH 9.3的碳酸盐缓冲液中透析2小时;将制备成1mg/ml的FITC溶液缓慢添加到IL-15中,直到达到每1 μ g蛋白质100ng的量,然后将IL-15在4 $^{\circ}$ C缓慢旋转孵育2小时。然后使用PD10柱从结合的FITC中分离游离FITC。在分光光度计中通过IL-15ELISA和Abs Max 495nm测量蛋白质和FITC的浓度。将1%的BSA溶液添加到FITC标记的蛋白质中以稳定结合。

[0317] 通过用10%TSTIM试剂 (Thermofisher,UK) 培养来维持CTLL-2细胞。将100 μ l细胞以浓度为 1×10^6 细胞/ml分装到96孔板中,其中包含10%TSTIM试剂,然后在24小时后,用0.2M甘氨酸缓冲液/0.15M NaCl (pH=3) 洗涤细胞两次,然后孵育10分钟,然后PBS洗涤。然后用Fc Block (BD biosciences,UK) 将细胞封闭15分钟,然后与不同浓度的FITC缀合的SEQ ID NO:28或FITC缀合的野生型IL-15在4 $^{\circ}$ C在含有0.1%叠氮化钠的PBS中再孵育30分钟。然后用PBS洗涤细胞并用BD Cytofix (BD Biosciences,UK) 固定。在FACs Calibur流式细胞术 (BD Biosciences,UK) 上测量结合的IL-15的荧光强度。

[0318] 结果呈现在图12中,其显示通过向IL-15添加活性促进序列,与野生型IL-15相比,本发明的修饰的IL-15显示出改善的与其受体的结合。

[0319] 以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和主旨的情况下,本发明所描述的方法和系统的各种修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合特定的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的发明不应不适当地限于这样的特定实施方案。实际上,对于生物化学和生物技术或相关领域的技术人员而言,对描述的用于执行本发明的方式进行各种修改,使其落入以下权利要求的范围内,是显而易见的。

序列表

<110> 前列腺癌研究中心
伦敦大学国王学院

<120> 融合多肽

<130> P59446W0

<150> GB1913804.9

<151> 2019-09-25

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0001] <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> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

[0002]

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> 3

<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

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

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

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

[0003]

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

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

Asn Thr Ser
115

<210> 4
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 活性促进序列

<400> 4

Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro Pro Thr
1 5 10 15

Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val Ser Pro

	20	25	30
	Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr	His His His His His His	Cys
	35	40	45
<210>	5		
<211>	161		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	融合多肽		
<400>	5		
	Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu		
	1	5	10 15
	Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val		
	20	25	30
[0004]	His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu		
	35	40	45
	Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val		
	50	55	60
	Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn		
	65	70	75 80
	Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn		
	85	90	95
	Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile		
	100	105	110
	Asn Thr Ser Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val		
	115	120	125
	Pro Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu		
	130	135	140
	Val Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr His His His His His His		
	145	150	155 160

Cys

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 6

Ser Ser Lys Ser Pro Ser Lys Lys Asp Asp Lys Lys Pro Gly Asp Cys
1 5 10 15

<210> 7

<211> 161

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 包含膜结合元件的融合多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(161)

<223> 与膜结合元件的半胱氨酸结合的二硫键 (SEQ ID NO: 31)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

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

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

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

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

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

Asn Thr Ser Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val
115 120 125

Pro Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu
130 135 140

Val Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr His His His His His His
145 150 155 160

Cys

[0006]

<210> 8

<211> 477

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 核酸序列编码 SEQ ID NO: 28

<400> 8

aactgggtga acgttatctc ggacctgaaa aaaatcgaag acctgatcca aagcatgcac 60

attgacgcta cgtgtatatac ggaaagcgat gtgcatccgt cgtgcaaagt taccgcgatg 120

aaatgttttc tgctggaact gcaggtcatt tcgctggaaa gcggcgatgc gagtatccac 180

gacaccgttg aaaacctgat tatectggcc aacaattccc tgagctcttg caatgtgacg 240

gaatcagggtt gcaaagaatg tgaagaactg gaagagaaaa acatcaaaga attcctgcag 300

tctttcgtec atattgtgca aatgttcate aatacgagtg gctccgggtc acgtggtaaa 360

tctctgacca gtaaagttcc gccgacggtc caaaaaccga ccacggtgaa cgttccgacc 420

accgaagtct ctccgaccag tcagaaaacc accaccacc atcacatca tcattgc

477

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 活性促进序列 2

<400> 9

Gly Ser Gly Ser His His His His His His Cys

1 5 10

<210> 10

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽 2

[0007]

<400> 10

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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 Gly Ser Gly Ser His His His His His His Cys		
	115	120	125
<210>	11		
<211>	67		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	比较融合序列		
<400>	11		
	Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro Pro Thr		
	1	5	10
	Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val Ser Pro		
	20	25	30
[0008]	Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Pro Asn Ala Gln Ala		
	35	40	45
	Thr Arg Ser Thr Pro Val Ser Arg Thr Thr Lys His His His His His		
	50	55	60
	His His Cys		
	65		
<210>	12		
<211>	181		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	比较融合多肽		
<400>	12		
	Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu		
	1	5	10
	Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val		

	20	25	30
	His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu		
	35	40	45
	Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val		
	50	55	60
	Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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 Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro		
	115	120	125
	Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val		
[0009]	130	135	140
	Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Pro Asn Ala		
	145	150	155 160
	Gln Ala Thr Arg Ser Thr Pro Val Ser Arg Thr Thr Lys His His His		
	165	170	175
	His His His His Cys		
	180		

<210> 13

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含膜结合元件的融合多肽 2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (125)..(125)

<223> 与膜结合元件的半胱氨酸结合的二硫键 (SEQ ID NO: 31)

<400> 13

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

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

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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

[0010] Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser Gly Ser Gly Ser His His His His His His Cys
115 120 125

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Asp Gly Pro Ser Glu Ile Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Gly Asn Glu Gln Ser Phe Arg Val Asp Leu Arg Thr Leu Leu Arg Tyr
1 5 10 15

Ala

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

[0011] <400> 17

Ser Ala Ala Pro Ser Ser Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
1 5 10 15

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Ala Ala Pro Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 19

Asp Gly Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Pro Ser Lys Ser Ser Gly
1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 20

Gly Ser Ser Lys Ser Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15

[0012]

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 21

Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe
1 5 10 15

Lys Lys Ser Gly
20

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 22

Asp Gly Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Pro Ser Lys Ser Ser Lys
1 5 10 15

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲水肽

<400> 23

Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys
1 5 10

<210> 24

<211> 480

<212> DNA

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 核酸序列编码包含 Met 的 SEQ ID NO: 28

<400> 24

atgaactggg tgaacgttat ctcggacctg aaaaaaatcg aagacctgat ccaaagcatg	60
cacattgacg ctacgtgta tacggaaagc gatgtgcac cgtcgtgcaa agttaccgcg	120
atgaaatgtt ttctgctgga actgcaggtc atttcgctgg aaagcggcga tgcgagtatc	180
cacgacaccg ttgaaaacct gattatcttg gccacaatt cctgagctc tggcaatgtg	240
acggaatcag gttgcaaaga atgtgaagaa ctggaagaga aaaacatcaa agaattcctg	300
cagtctttcg tccatattgt gcaaattgtc atcaatacga gtggctccgg ttacgttgt	360
aaatctctga ccagtaaagt tccgccgacg gtccaaaaac cgaccacggt gaacgttccg	420
accaccgaag tctctccgac cagtcagaaa accaccacc accatcacca tcatcattgc	480

<210> 25
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 全长 IL-15 变体

<400> 25

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

[0014]

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 Gly Asn Val Thr
 115 120 125

Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys
 130 135 140

Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr
 145 150 155 160

Ser

<210> 26

<211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 成熟 IL-15 - 氨基酸 49-162 变体

<400> 26

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

[0015]

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Gly Asn Val Thr
 65 70 75 80

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

Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr
 100 105 110

Ser

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 成熟 IL-15 变体

<400> 27

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1	5	10	15
Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val			
20	25	30	
His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu			
35	40	45	
Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val			
50	55	60	
Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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			

[0016]

<210> 28
<211> 160
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合多肽

<400> 28

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu			
1	5	10	15
Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val			
20	25	30	
His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu			
35	40	45	
Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val			
50	55	60	

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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 Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro
115 120 125

Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val
130 135 140

Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr His His His His His His Cys
145 150 155 160

<210> 29

<211> 160

<212> PRT

[0017] <213> 人工序列

<220>

<223> 包含膜结合元件的融合多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (160)..(160)

<223> 与膜结合元件的半胱氨酸结合的二硫键 (SEQ ID NO: 31)

<400> 29

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

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

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

	50	55	60
	Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser 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 Gly Ser Gly Ser Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro		
	115	120	125
	Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val		
	130	135	140
	Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr His His His His His His Cys		
	145	150	155 160
[0018]	<210>	30	
	<211>	17	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	膜结合元件	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	Xaa 是 α , ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(17)..(17)	
	<223>	Xaa 是 (S-2-吡啶二硫基)-C-酸	
	<400>	30	
	Xaa Ser Ser Lys Ser Pro Ser Lys Lys Asp Asp Lys Lys Pro Gly Asp		
	1	5	10 15
	Xaa		

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 膜结合元件

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是 α , ϵ 双肉豆蔻酰基赖氨酸

<400> 31

[0019]

Xaa Ser Ser Lys Ser Pro Ser Lys Lys Asp Asp Lys Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15

Cys

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Gly Phe Arg Ile Leu Leu Lys Val
1 5

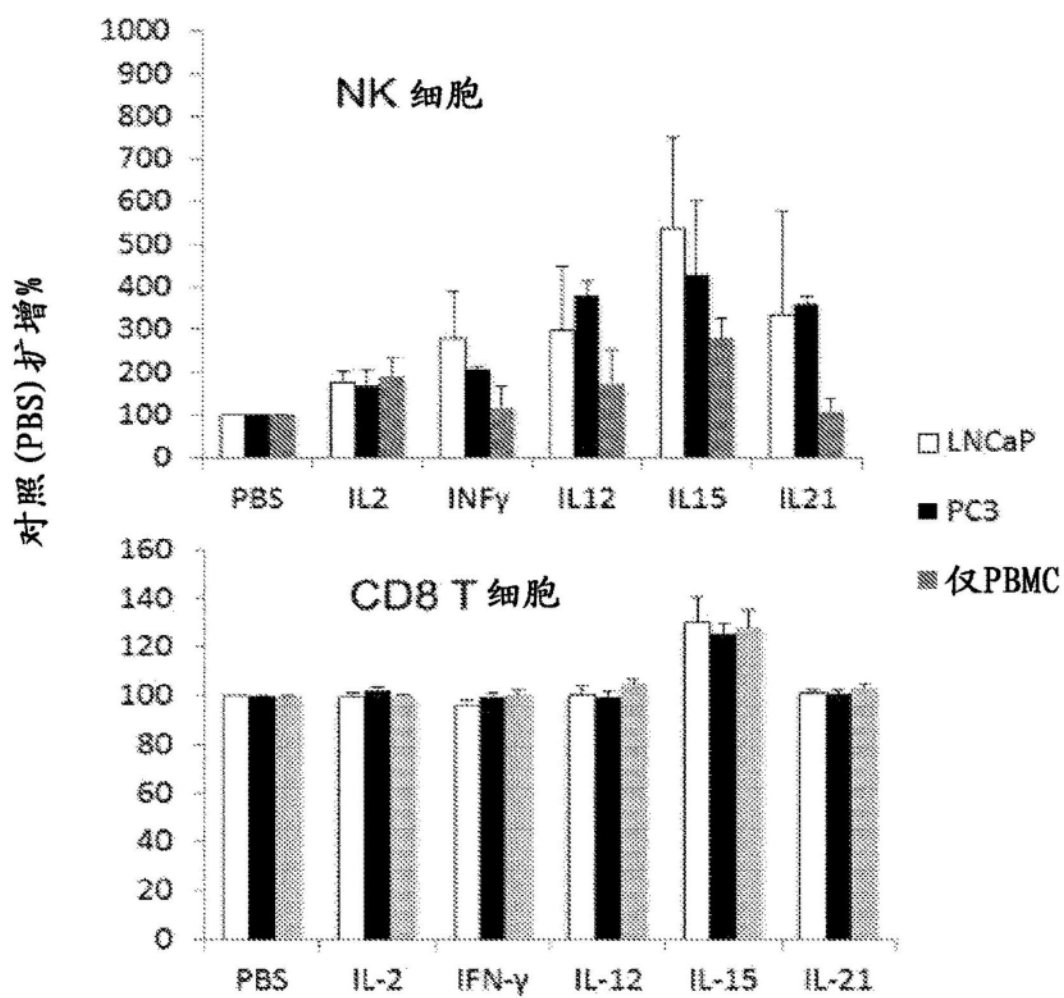
A

图1

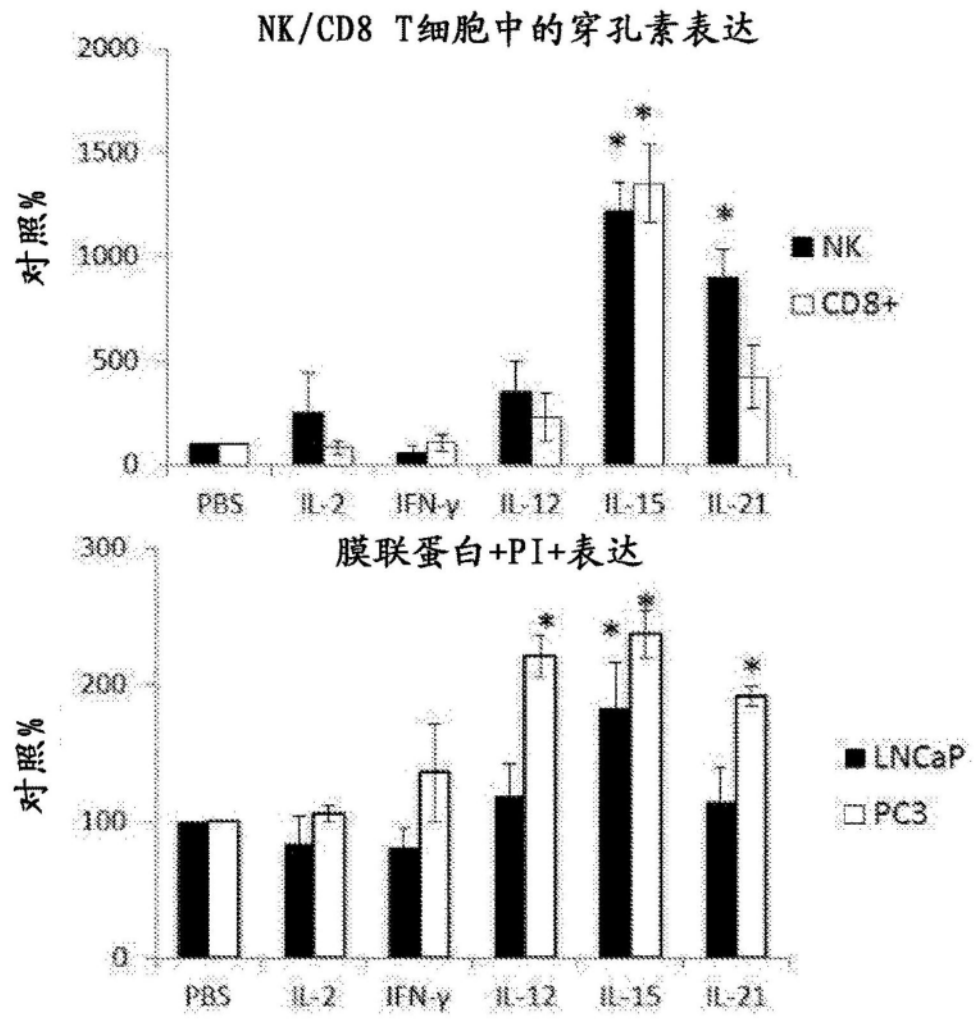
B

图1 (续)

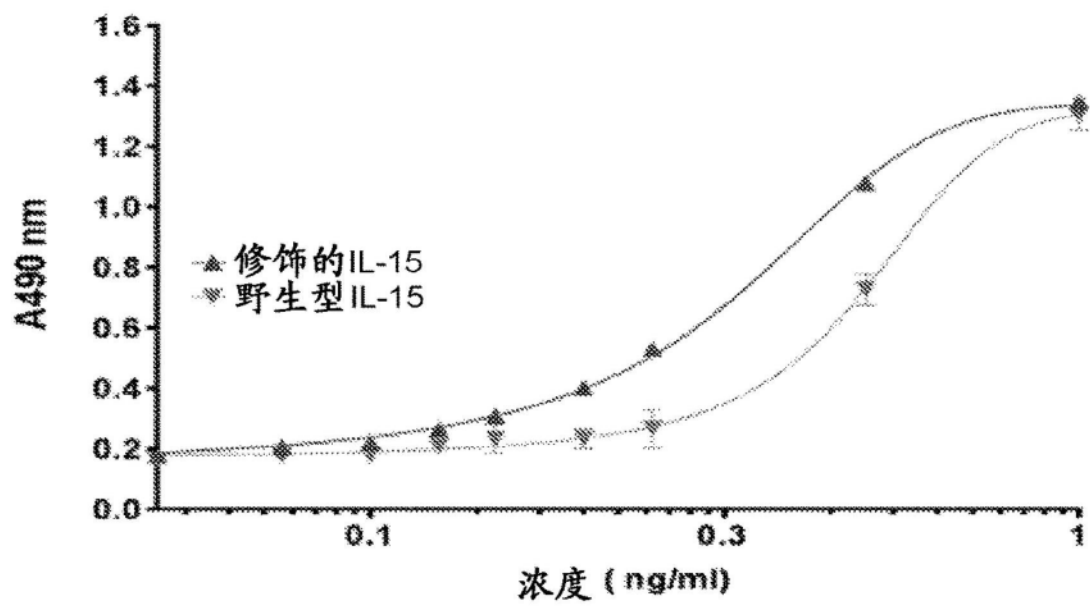


图2

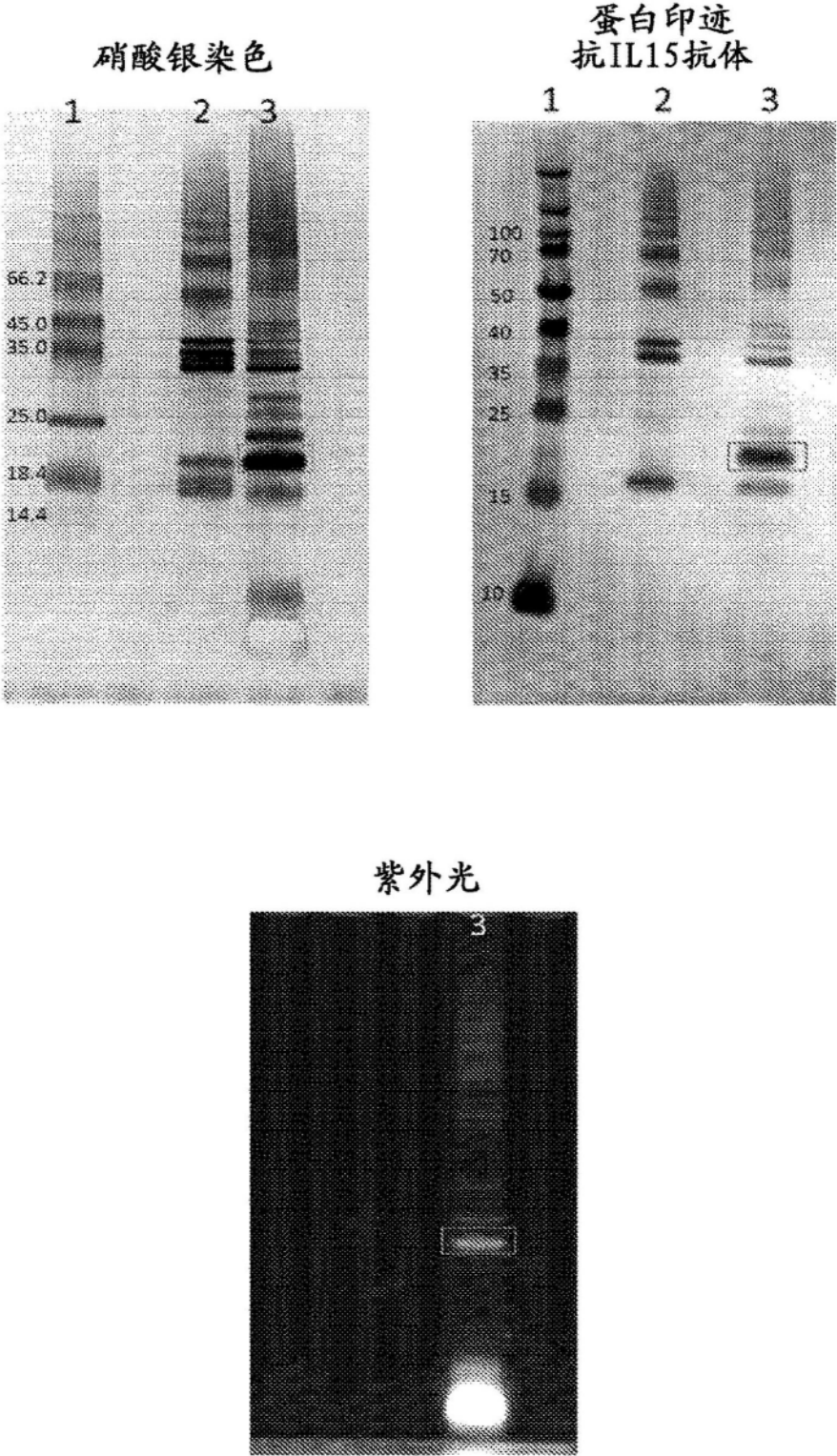


图3

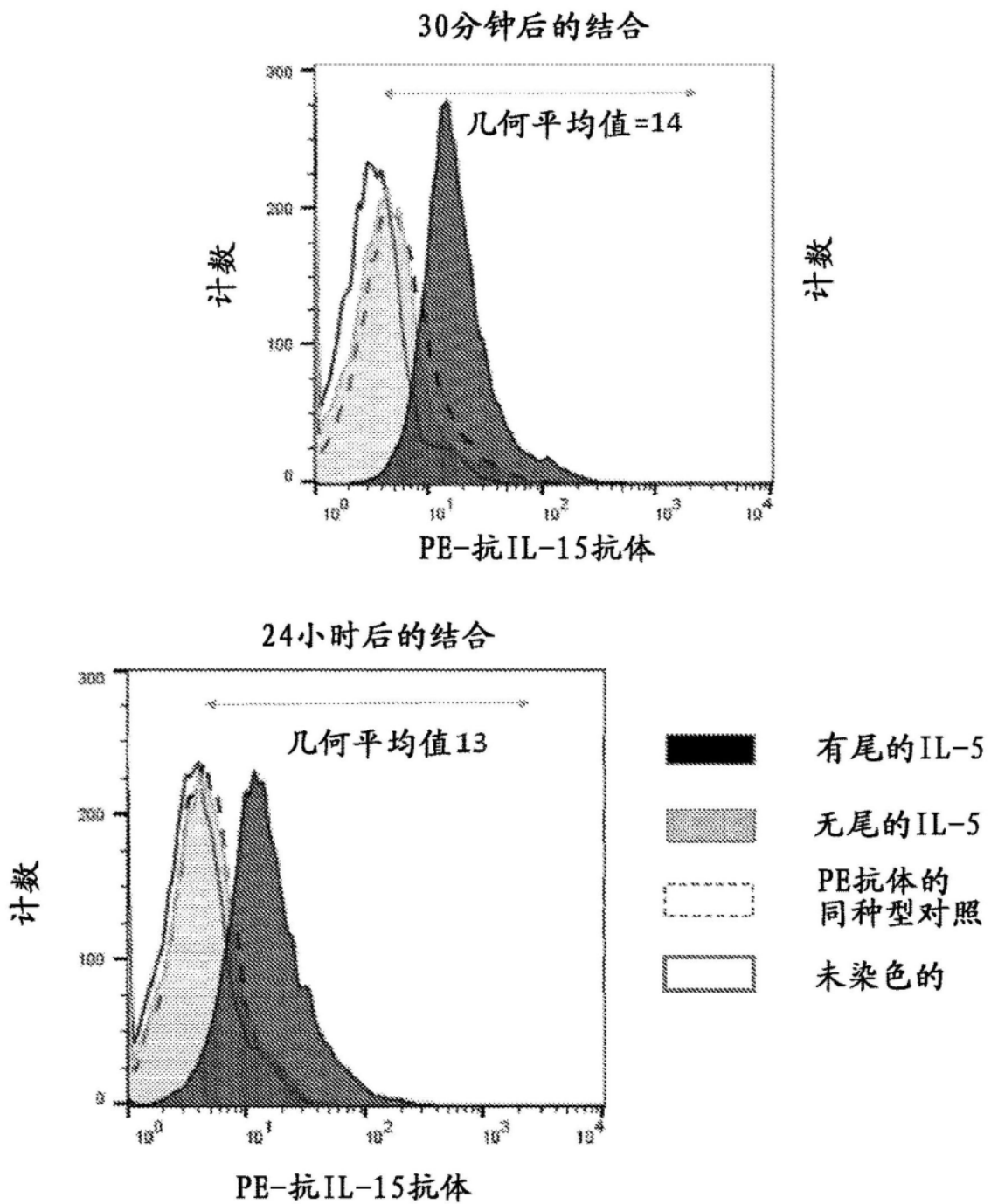
A

图4

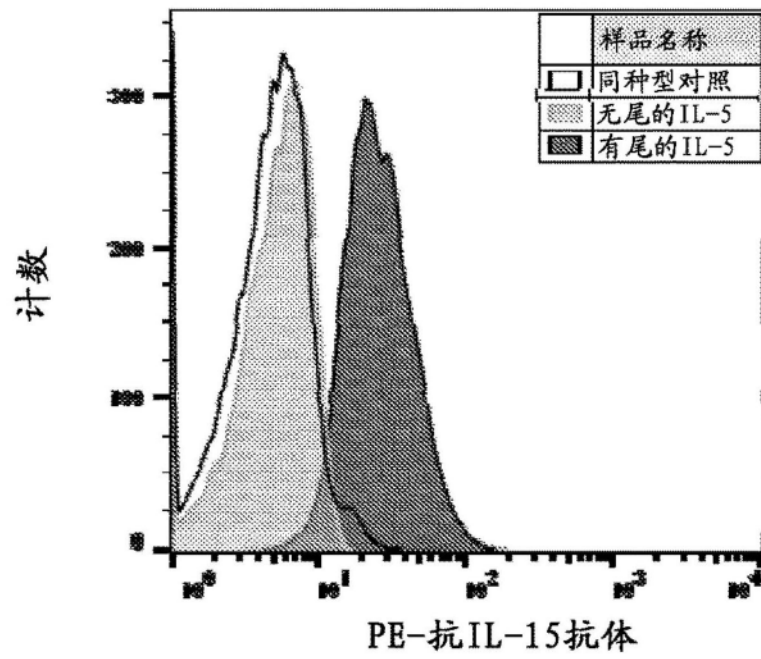
B

图4(续)

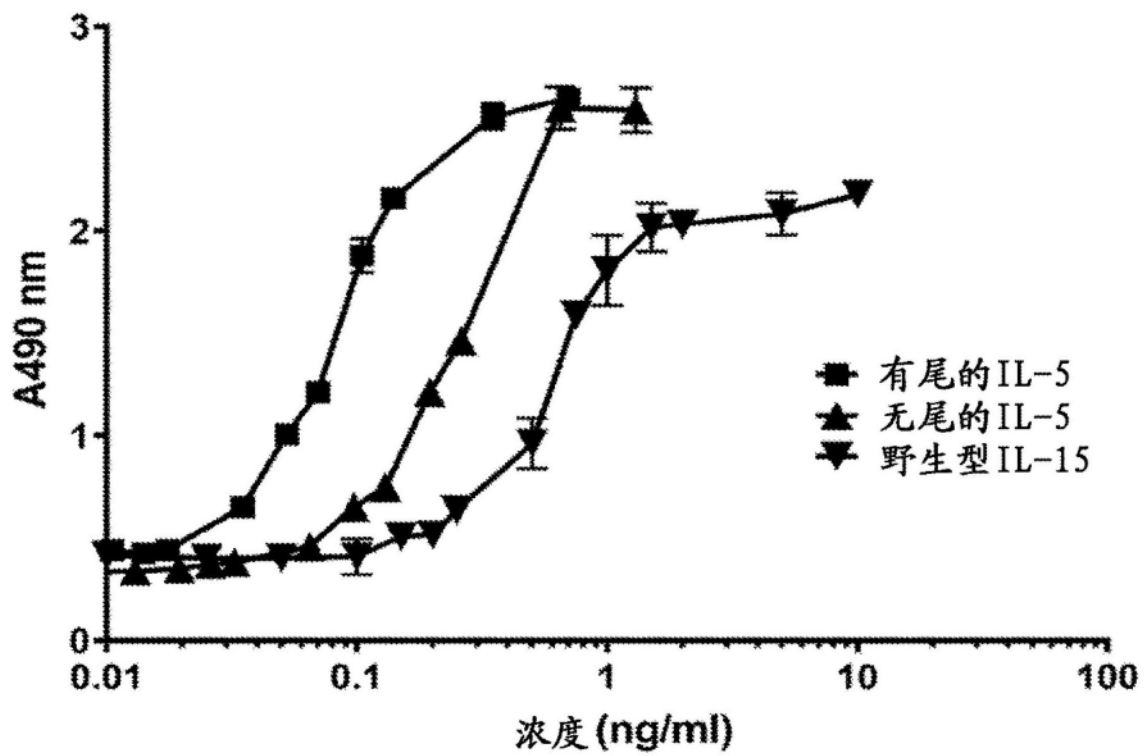


图5

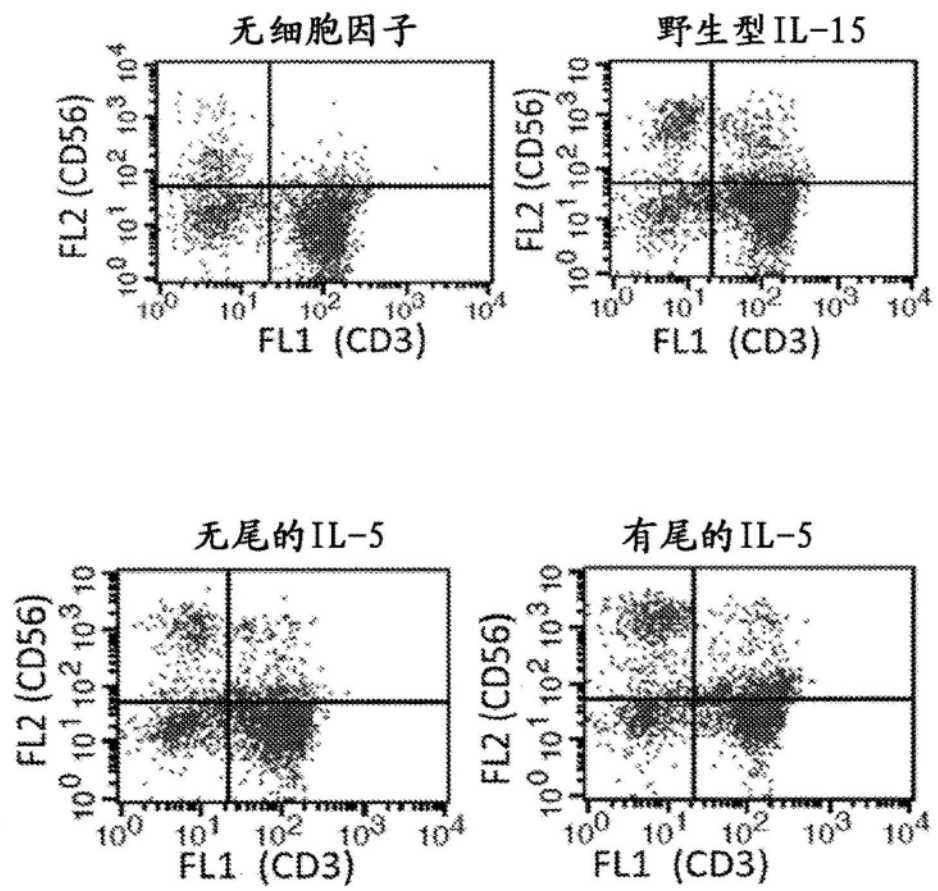
A

图6

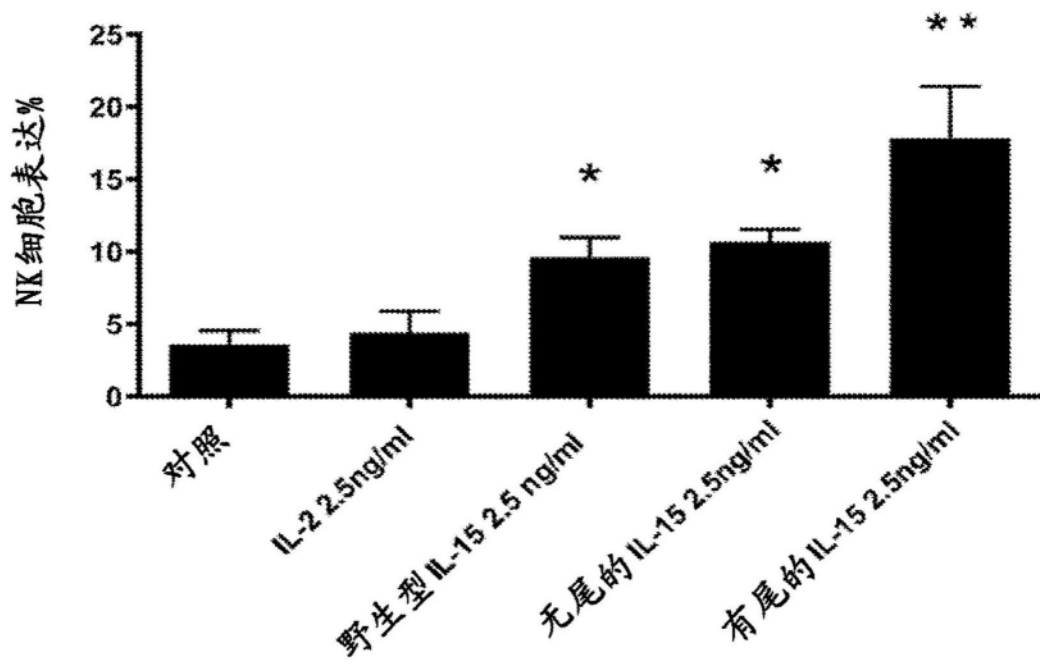
B

图6 (续)

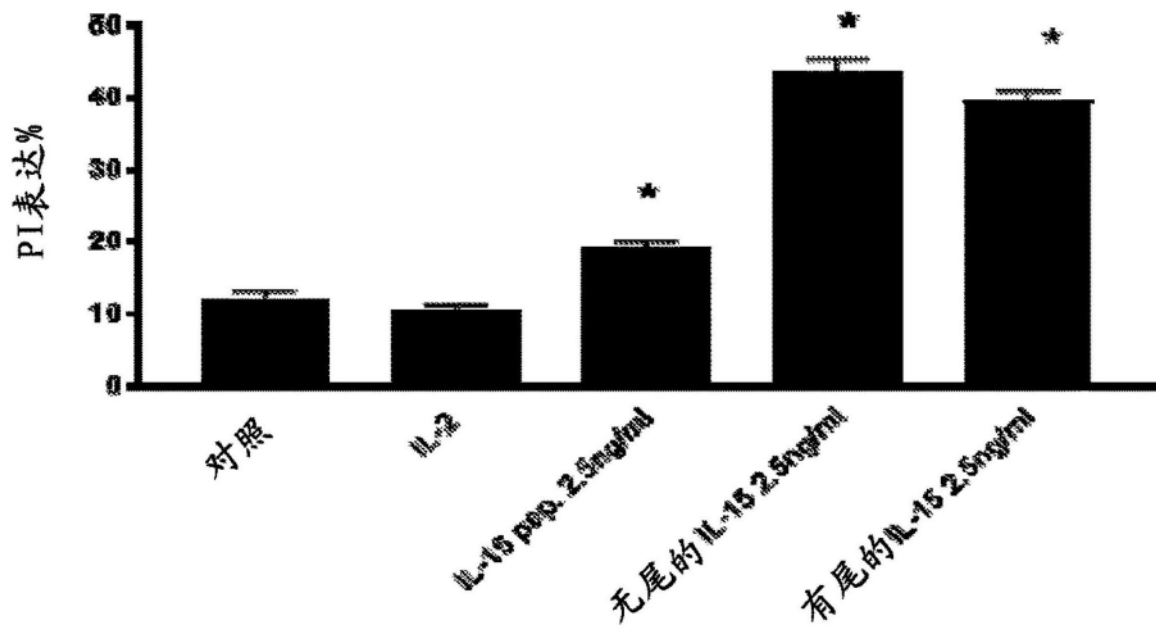


图7

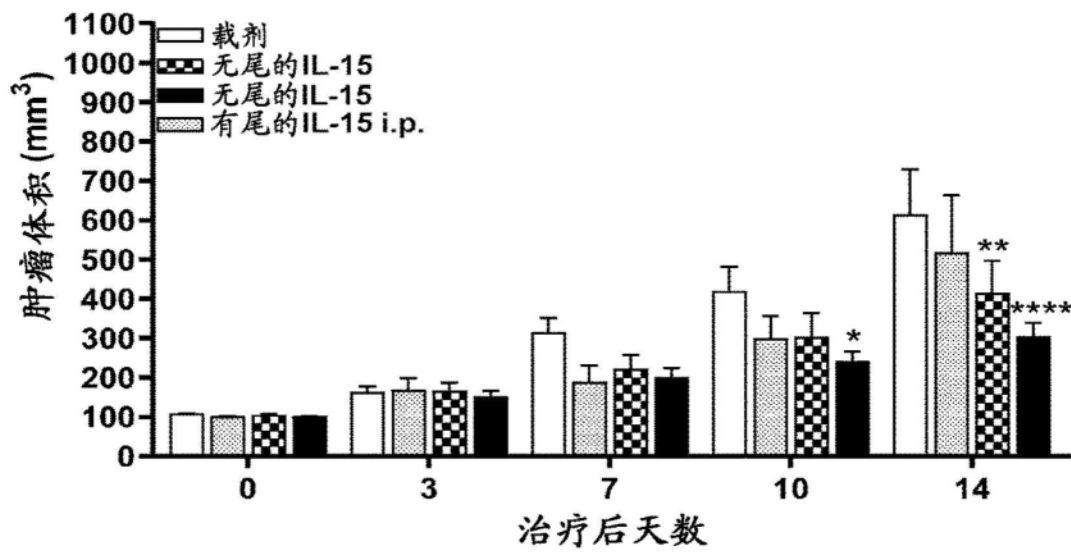
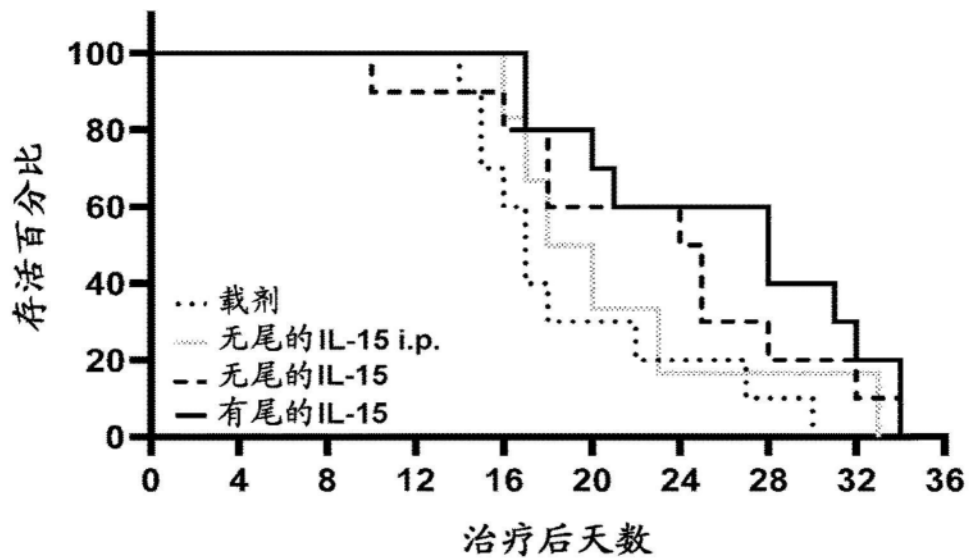
A**B**

图8

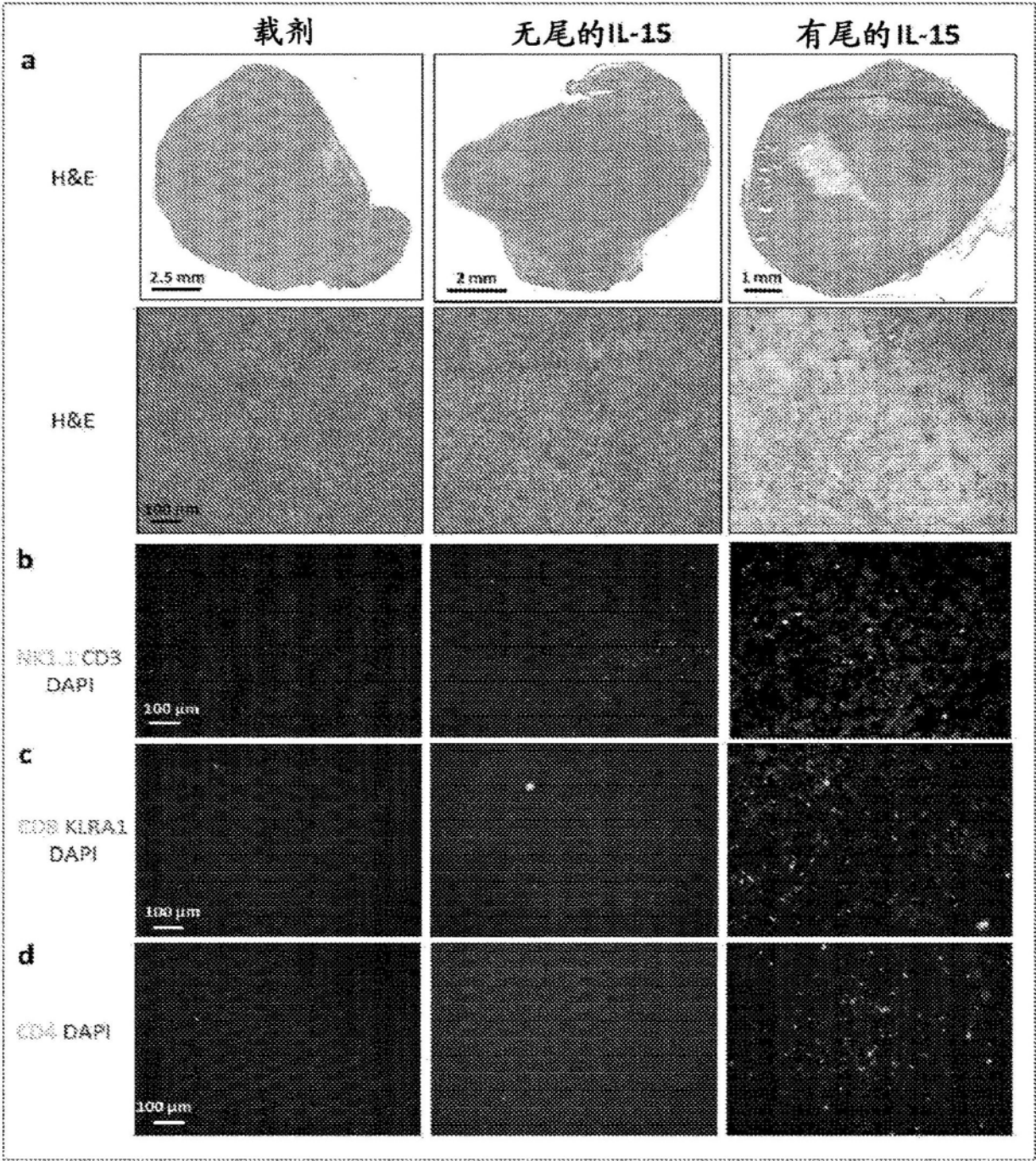


图9

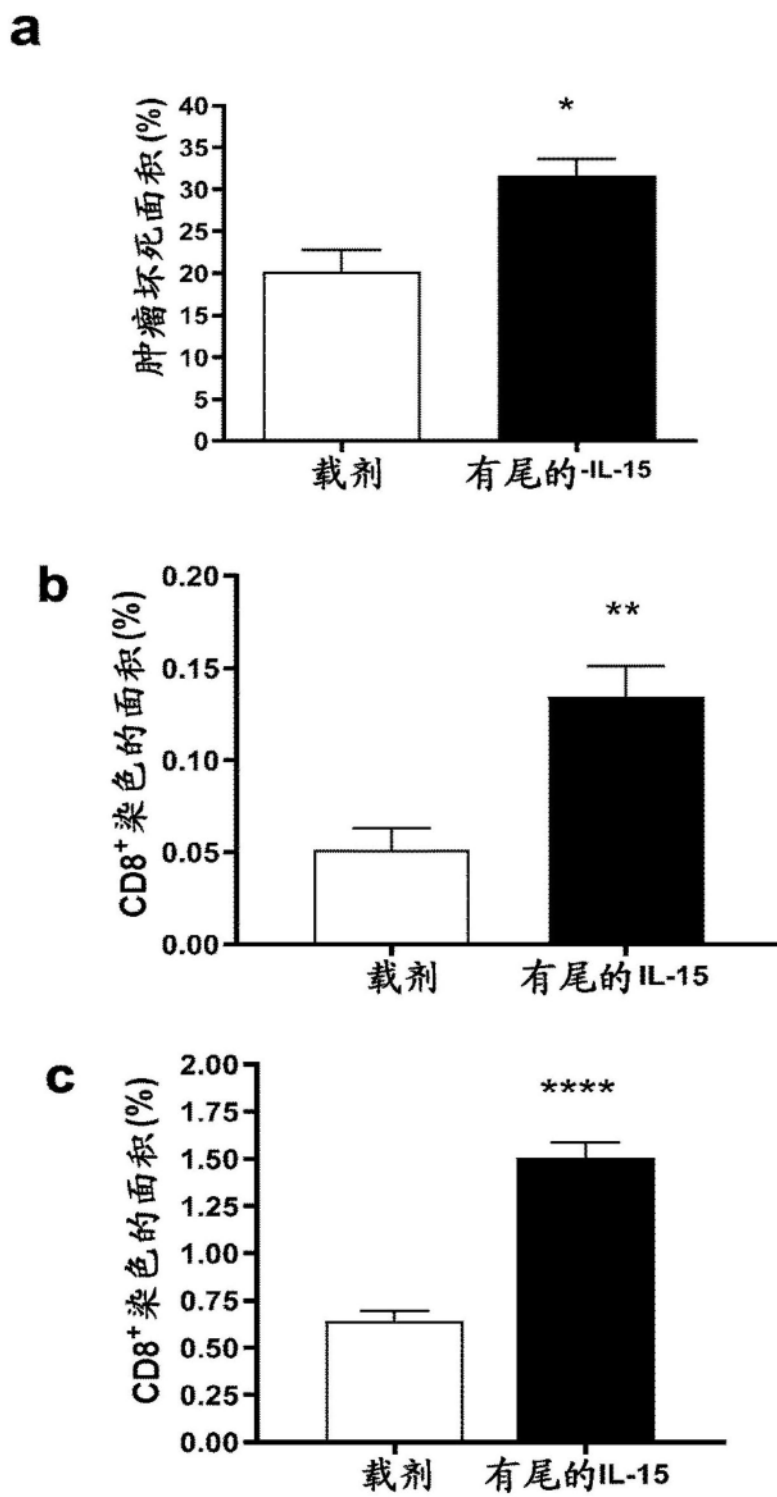


图10

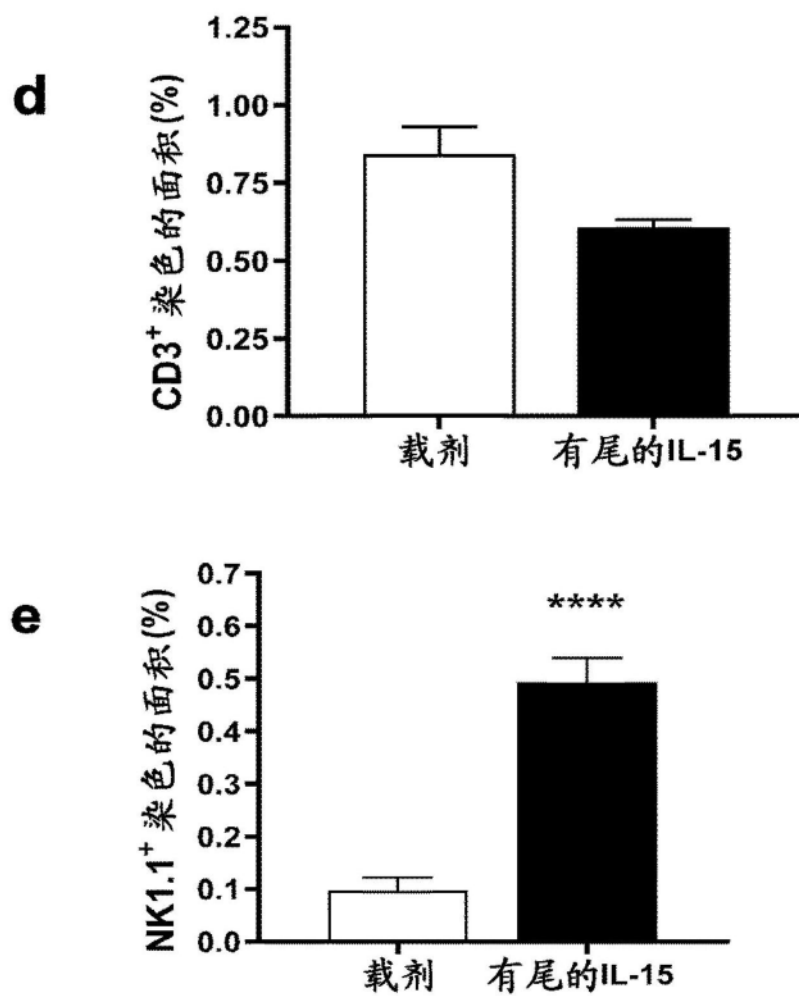


图10(续)

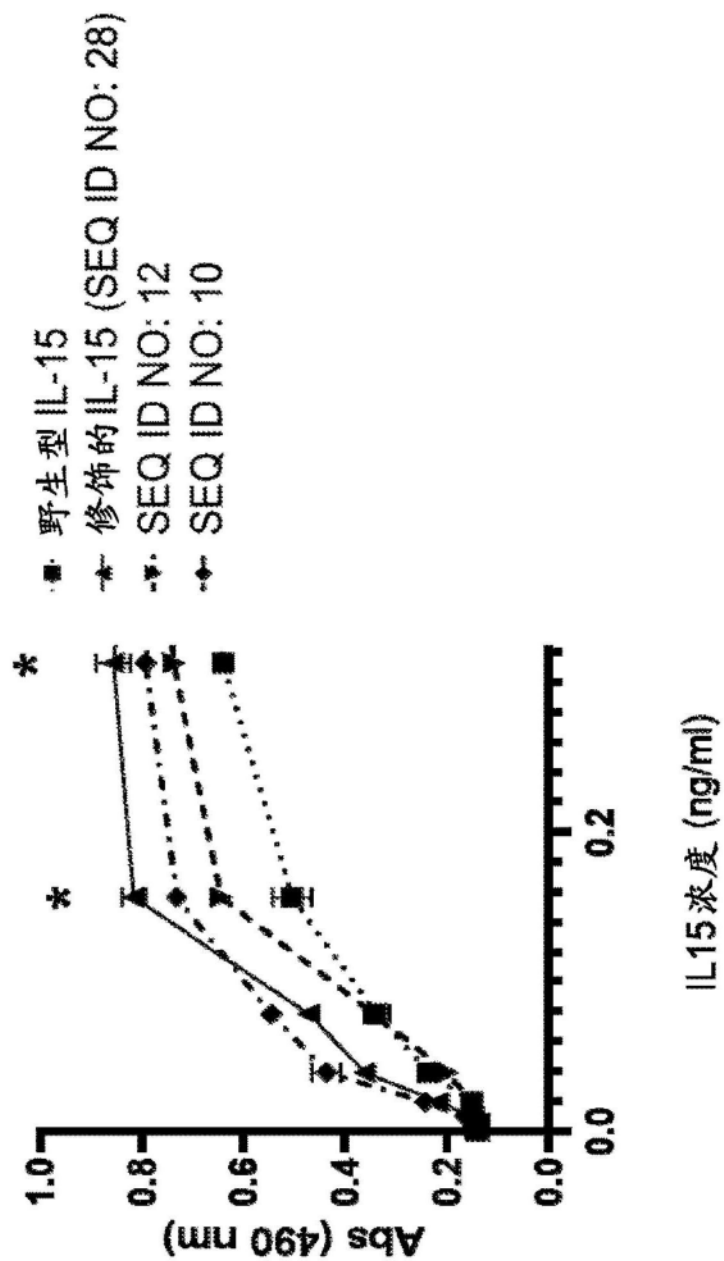


图11

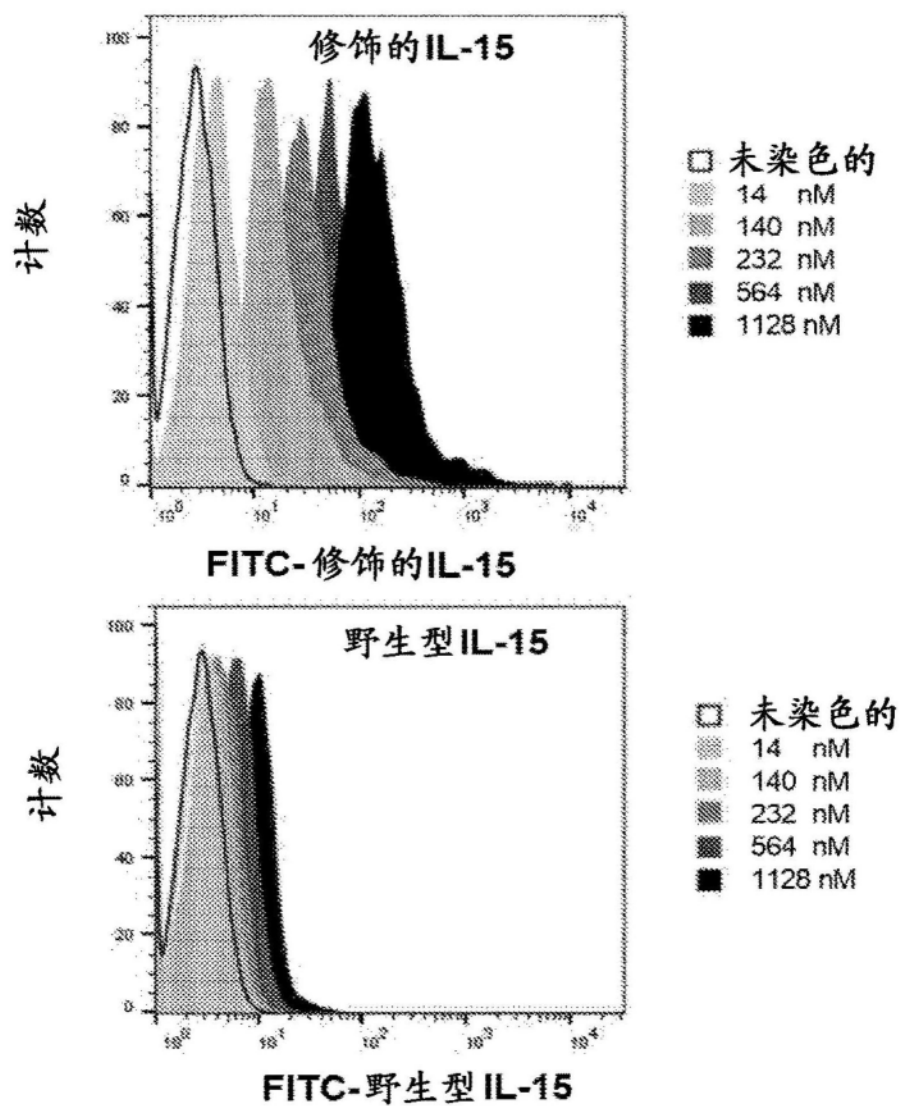


图12