(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0021311
(43) 공개일자 2021년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7036028
(22) 출원일자(국제) 2019년05월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년12월14일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2019/050462
(87) 국제공개번호 WO 2019/218015
국제공개일자 2019년11월21일
(30) 우선권주장
2018901672 2018년05월15일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
인터크 펩타이드 테라퓨틱스 리미티드
오스트레일리아 뉴사우스웨일즈 2066 레인 코브 웨스트 25 시리우스 로드 빌딩2
(72) 발명자
아그레즈 마이클 발렌타인
오스트레일리아 뉴사우스웨일즈 2780 카툼바 122 내로우 넥 로드
(74) 대리인
특허법인아주

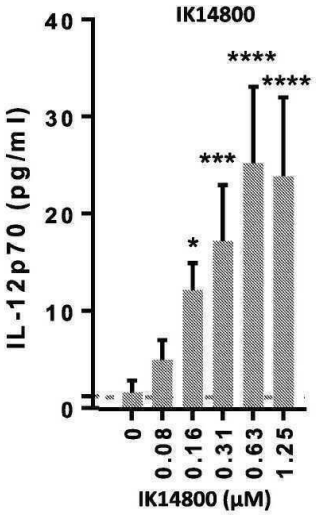
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 **활성화 제제**

(57) 요 약

본 발명은 생체내, 시험관내 및 생체외 사용을 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도16



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 9/12 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Lck(lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)를 활성화시키기 위한 펩타이드로서,

상기 펩타이드는 6개 초과의 인접한 양이온성 아미노산을 갖는 Lck-활성화 양이온성 아미노산 서열을 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산 서열은 8 내지 10개의 인접한 양이온성 아미노산을 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 오르니틴으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산 서열은 RRRRRRRR, rrrrrrrr, RRRRRRRRR 및 rrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택되는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드는 상기 양이온성 아미노산 서열로 이루어지는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 구조식 I 또는 이의 역전된 서열의 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티를 더 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드:

$R/K'-x^{1}-R/K-x^{2}-R/K-x^{3}-x^{4}-x^{5}-x^{6}-R/K"$ 구조식 I

식 중,

각각의 R/K는 독립적으로 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고;

R/K'는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고;

R/K"는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고;

x^{1} 내지 x^{6}은 각각 독립적으로 아미노산이되;

아미노산 x^{3} 내지 x^{6}은 총괄적으로 존재하거나 존재하지 않고, R/K"는 아미노산 x^{3} 내지 x^{6}이 존재하지 않은 경우 존재하지 않는다.

청구항 7

제6항에 있어서, 아미노산 x^{1} 내지 x^{6} 중 하나 이상은 소수성 아미노산인, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 아미노산 서열은 L 아미노산 잔기를 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 아미노산 서열은 D 아미노산 잔기를 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드 아미노산 서열은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr, RSKAK-RRRRRRRRR, r r r r r r r r r - y l p n k a k s r, IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG, RRRRRRRRR-SKAKNPLYR, RRRRRRRRR-YLPNKAKSR, RSKAKNPLY, RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, 분지형< RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR, RRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK, RVKVKVVVV-RRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRR, RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH, KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH 및 KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH.

청구항 12

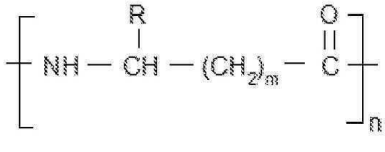
Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 아미노산 서열 RSKAKNPLY-RRRRR 또는 RSKAKNPLY-RRRRRR을 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 상기 펩타이드의 C-말단 단부에서 아마이드화된, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 하기 구조식 II의 화합물을 더 포함하는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드:



구조식 II

식 중,

n은 화합물의 단량체 단위의 수이고, 1 내지 5의 정수이며;

각각의 m은 독립적으로 0 내지 18의 정수이고;

각각의 R기는 독립적으로 H 또는 C_1 내지 C_{18} 측쇄이다.

청구항 15

제14항에 있어서, 각각의 단량체 단위의 R기는 독립적으로 C_1 내지 C_{18} 측쇄인, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 16

제15항에 있어서, 각각의 R기는 독립적으로 18 - m개 탄소 원자 길이이되, m은 0 내지 17의 값을 갖는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 화합물을 더 포함하되, 상기 화합물은 적어도 하나의 지방산인, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 18

제17항에 있어서, 적어도 4개의 지방산이 상기 양이온성 아미노산 서열의 상기 C-말단 단부에 커플링된, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 19

제18항에 있어서, 가장 윈위의 지방산이 아마이드화된, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 하나 초과의 지방산의 상기 커플링은 선형인, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 21

제19항에 있어서, 하나 초과의 지방산의 상기 커플링은 분지형인, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방산은 포화된, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방산은 카프로산, 카프릴산, 카프르산(데칸산) 및 라우르산(도데칸산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드.

청구항 24

펩타이드로서,

RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 25

펩타이드로서,

RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 26

활성 성분으로서 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

Lck 키나제의 활성도를 증가시키는 방법으로서,

Lck 키나제를 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, Lck 키나제의 활성도를 증가시키는 방법.

청구항 28

Lck 키나제의 Y394 포스포릴화를 증가시키는 방법으로서, Lck 키나제를 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, Lck 키나제의 Y394 포스포릴화를 증가시키는 방법.

청구항 29

세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-2 분비를 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-2 분비를 증가시키는 방법.

청구항 30

세포 또는 세포의 집단에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키는 방법.

청구항 31

세포 또는 세포의 집단에서 IL-2RB(CD122) 발현을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-2RB(CD122) 발현을 증가시키는 방법.

청구항 32

세포 또는 세포의 집단의 IL-2 반응성을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단의 IL-2 반응성을 증가시키는 방법.

청구항 33

세포 또는 세포의 집단에서 CD28 발현을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 CD28 발현을 증가시키는 방법.

청구항 34

세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-12 분비를 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-12 분비를 증가시키는 방법.

청구항 35

세포 또는 세포의 집단에서 IL-12R 발현을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-12R 발현을 증가시키는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 IL-12R은 IL-12RB1 및/또는 IL-12RB2인, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-12R 발현을 증가시키는 방법.

청구항 37

세포 또는 세포의 집단의 IL-12 반응성을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단의 IL-12 반응성을 증가시키는 방법.

청구항 38

세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-21 분비를 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-21 분비를 증가시키는 방법.

청구항 39

세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-15 분비를 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-15 분비를 증가시키는 방법.

청구항 40

세포 또는 세포의 집단에서 IL-15R 발현을 증가시키는 방법으로서, 세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-15R 발현을 증가시키는 방법.

청구항 41

세포 또는 세포의 집단의 IL-15 반응성을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단의 IL-15 반응성을 증가시키는 방법.

청구항 42

세포 또는 세포의 집단에서 IL-18R 발현을 증가시키는 방법으로서, 세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단에서 IL-18R 발현을 증가시키는 방법.

청구항 43

세포 또는 세포의 집단의 IL-18 반응성을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단의 IL-18 반응성을 증가시키는 방법.

청구항 44

세포 또는 세포의 집단으로부터 사이토카인 분비를 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단으로부터 사이토카인 분비를 증가시키는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 사이토카인은 IFNg인, 세포 또는 세포의 집단으로부터 사이토카인 분비를 증가시키는 방법.

청구항 46

세포 또는 세포의 집단의 증식을 유도하는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 또는 세포의 집단의 증식을 유도하는 방법.

청구항 47

세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법으로서,

세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법.

청구항 48

제27항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 세포 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이거나 또는 상기 세포의 집단은 상기 세포를 포함하는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 세포는 미경험 세포이거나 또는 상기 세포의 집단은 미경험 세포를 포함하는, 방법.

청구항 50

T 세포 기능을 향상시키는 방법으로서,

T 세포 또는 T 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 기능을 향상시키는 방법

청구항 51

세포독성 세포 기능을 향상시키는 방법으로서,

세포독성 세포 또는 세포독성 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포독성 세포 기능을 향상시키는 방법.

청구항 52

T 세포 또는 T 세포의 집단의 고갈을 감소시키는 방법으로서,

T 세포 또는 T 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 또는 T 세포의 집단의 고갈을 감소시키는 방법.

청구항 53

산화성 손상을 치료하는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 산화성 손상을 치료하는 방법.

청구항 54

세포 집단에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법으로서,

Treg 함유 세포 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 집단에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 Treg 세포는 Foxp3+ Treg 세포인, 세포 집단에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법.

청구항 56

면역관문 저해제의 존재 하에서 CD25 발현을 증가시키는 방법으로서,

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 면역관문 저해제의 존재 하에서 CD25 발현을 증가시키는 방법.

청구항 57

제26항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 생체내 또는 시험관내에서 수행되는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 수행되는, 방법.

청구항 59

세포 또는 세포의 집단을 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계에 의해서 얻어진 세포 또는 세포의 집단으로부터 유래된 세포 또는 세포의 집단.

청구항 60

제27항에 있어서, 상기 펩타이드 또는 약제학적 조성물은 대상체에게 투여되어 생체내에서 Lck의 활성도를 증가시키는, Lck 활성도를 증가시키는 방법.

청구항 61

대상체에서 Lck의 활성도를 증가시키는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Lck 활성도를 증가시키는 방법.

청구항 62

대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 63

Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을

치료 및/또는 예방하는 방법으로서,

대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기 Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태는 병원성 감염, 병원성 감염으로부터의 패혈증(예를 들어, 만성 패혈증), 면역 결핍성 장애, 감소된 면역 반응, 감소된 T 세포 수치, T 세포 이상, T-세포 고갈 및 T 세포 면역관문 차단으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 질환 또는 병태는 암인, 방법.

청구항 66

백신접종(vaccinating)을 필요로 하는 대상체에게 백신접종하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 백신과 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는, 백신접종하는 방법.

청구항 67

암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 백신과 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 68

대상체에서 면역억제를 감소시키는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제를 감소시키는 방법.

청구항 69

대상체에서 노화 관련 면역 기능장애(age related immune dysfunction)를 치료 및/또는 예방하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 노화 관련 면역 기능장애를 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 70

대상체에서 Th1 반응을 유도하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 제26항에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 Th1 반응을 유도하는 방법.

청구항 71

Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 치료 및/또는 예방하기 위한 투여 단위 형태(dosage unit form)로서,

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는, 투여 단위 형태.

청구항 72

암의 치료 또는 예방을 위한 단위 투여 형태로서,

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는, 투여 단위 형태.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Lck(림프구-특이적 단백질 타이로신 키나제(lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)) 활성의 자극 및 다양한 질환 또는 병태의 예방법 및 치료에서 사용하기 위한 Lck 활성화제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분자 생물학에서, CD4(분화 클러스터(cluster of differentiation) 4)는 면역 세포, 예컨대, T 헬퍼 세포, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포의 표면에서 발견되는 당단백질이다. CD4 + T 헬퍼 세포는 면역계의 필수 부분이며, 감염성 입자를 파괴하기 위해 CD8 살해 세포와 같은 다른 면역 세포에 신호를 보내는 백혈구이다. T 세포 수용체(TCR) 및 공동-수용체가 항원 펩타이드:주조직 적합 복합체(major histocompatibility complex: MHC)에 결합할 때 T 세포가 활성화되어 TCR 복합체가 클러스터를 유발하고, 세포내 캐스케이드를 유발한다. T 세포 활성화 시, 공동-수용체 CD4 및 CD8이 각각 클래스 II 또는 클래스 I MHC 분자에 결합하고, 항원에 대한 T 세포의 민감도가 증가한다.

[0003] Lck는 Src 패밀리 키나제의 구성원이며 T-세포 효과기 잠재력의 발달, 즉, 효과적인 사이토카인 전사와 함께 발달 중인 흉선세포 및 성숙한 T 세포의 증식 및 분화에 필수적이다(Lovatt M et al, Mol & Cell Biology, 2006, 26 (22): 8655-8665).

[0004] Lck에 의한 TCR의 포스포릴화는 세포질 키나제 ZAP70(제타-쇄-연관 단백질 키나제 70)을 세포막에 동원하는 결합 부위를 생성함으로써 하류 신호 전달을 개시한다(Iwashima M et al, Science, 1994, 263: 1136-1139). 보다 특별하게는, Lck는 Tyr 505를 포스포릴화시켜 Lck를 불활성화시키는 C-말단 Src 키나제(Csk), 활성 부위의 재배열을 통해서 Lck의 키나제 활성을 활성화시키는 Lck 활성화 루프 Tyr 394의 트랜스-자가-포스포릴화 및 포스파타제에 의한 탈-포스포릴화에 의해서 조절된다(Fulop T et al, Longevity & Healthspan, 2012, 1: 6).

[0005] TCR 자극 시, CD4/CD8-연관 Lck는 TCR/CD3 복합체에 근접하게 되고, CD3 분자의 면역-수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(tyrosine-based activation motif: ITAM)를 포스포릴화시킨다. ZAP70 키나제는 포스포릴화된 ITAM에 동원되고, 그 다음 Lck에 의해 활성화된다. 이는 결국 T 세포 활성화 및 IL-2 생산으로 이어지는 다중 경로의 활성화를 초래한다(Wang G et al, BioMed Research International, 2014, doi.org/10.1155/2014/682010).

[0006] 또한, Lck의 수지상 세포(DC)-매개된 활성화는 동족 펩타이드-MHC 클래스 II 항원 복합체에 대한 TCR 반응의 민감도와 크기를 극적으로 증가시키는 과정인 "TCR 라이센싱"으로 이어진다(Meraner P et al, 2007, J Immunol, 178(4): 2262-2271). 이러한 상피내 DETC 세포(수지상 표피 T 세포) 또는 감마/델타 T 세포는 항상성, 조직 수선, 염증 및 악성 종양으로부터의 보호에 중추적인 역할을 한다(Witherden DA & Havran WL, J Leukoc Biol, 2013, 94(1): 69-76).

발명의 내용

[0007] 일 실시형태에서, 본 발명은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 펩타이드는 6개 초과의 인접한 양이온성 아미노산을 갖는 Lck-활성화 양이온성 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 아미노산 서열은 8 내지 10개의 인접한 양이온성 아미노산을 포함한다.

[0008] 또 다른 실시형태에서, 양이온성 아미노산은 독립적으로 아르기닌, 라이신 및 오르니틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 아미노산 서열은 RRRRRRRR, rrrrrrrr, RRRRRRRRR 및 rrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0009] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드는 양이온성 아미노산 서열로 이루어진다.

[0010] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드는 하기 구조식 I 또는 이의 역전된 서열의 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티를 추가로 포함한다:

[0011] R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K" 구조식 I

[0012] 식 중,

[0013] 각각의 R/K는 독립적으로 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고;

[0014] R/K'는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고; R/K"는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고; x^1 내지 x^6은 각각 독립적으로 아미노산이되;

[0015] 아미노산 x^3 내지 x^6은 총괄적으로 존재하거나 존재하지 않고, R/K"는 아미노산 x^3 내지 x^6이 존재하지 않은 경우 존재하지 않는다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 아미노산 x^1 내지 x^6 중 하나 이상은 소수성 아미노산이다.

[0017] 또 다른 실시형태에서, Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된다.

[0018] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드 아미노산 서열은 L 아미노산 잔기를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 펩타이드 아미노산 서열은 D 아미노산 잔기를 포함한다.

[0019] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드 아미노산 서열은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

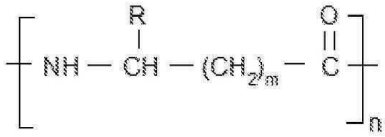
RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr, RSKAK-RRRRRRRRR, r r r r r r r r r - y l p n k a k s r, IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG, RRRRRRRRR-SKAKNPLYR, RRRRRRRRR-YLPNKAKSR, RSKAKNPLY, RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, 분지형 < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR, RRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK, RVKVKVVVV-RRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRR, RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH, KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH 및 KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH

[0020] .

[0021] 또 다른 실시형태에서, 펩타이드는 아미노산 서열 RSKAKNPLY-RRRRR 또는 RSKAKNPLY-RRRRRR을 포함한다.

[0022] 또 다른 실시형태에서, 아미노산 서열은 펩타이드의 C-말단 단부에서 아마이드화된다.

[0023] 또 다른 실시형태에서, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 하기 구조식 II의 화합물을 추가로 포함한다:



[0024] 구조식 II

[0025] 식 중,

[0026] n은 화합물의 단량체 단위의 수이고, 1 내지 5의 정수이며;

[0027] 각각의 m은 독립적으로 0 내지 18의 정수이고;

[0028] 각각의 R기는 독립적으로 H 또는 C_1 내지 C_{18} 측쇄이다.

[0029] 또 다른 실시형태에서, 각각의 단량체 단위의 R기는 독립적으로 C_1 내지 C_{18} 측쇄이다. 또 다른 실시형태에서, 각각의 R기는 독립적으로 18 - m개 탄소 원자 길이이고, m은 0 내지 17의 값을 갖는다.

[0030] 또 다른 실시형태에서, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 화합물을 추가로 포함하고, 여기서 화합물은 적어도 하나의 지방산이다. 또 다른 실시형태에서,

적어도 4개의 지방산이 양이온성 아미노산 서열의 C-말단 단부에 커플링된다.

[0031] 또 다른 실시형태에서, 가장 윈위의 지방산은 아마이드화된다. 또 다른 실시형태에서, 하나 초과의 지방산의 커플링은 선형이다. 또 다른 실시형태에서, 하나 초과의 지방산의 커플링은 분지형이다.

[0032] 또 다른 실시형태에서, 지방산은 포화된다.

[0033] 또 다른 실시형태에서, 지방산은 카프로산, 카프릴산, 카프르산(데칸산) 및 라우르산(도데칸산)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0034] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

[0035] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0036] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 활성 성분으로서 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0037] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 Lck 키나제의 활성도를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 Lck 키나제를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0038] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 Lck 키나제의 Y394 포스포릴화를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 Lck 키나제를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0039] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-2 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0040] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0041] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 IL-2RB(CD122) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0042] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단의 IL-2 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0043] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 CD28 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0044] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-12 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0045] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 IL-12R 발현을 증가시키는 방법을 제공하

며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0046] 또 다른 실시형태에서, IL-12R는 IL-12RB1 및/또는 IL-12RB2이다.

[0047] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단의 IL-12 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0048] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-21 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0049] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-15 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0050] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 IL-15R 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0051] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단의 IL-15 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0052] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 상에서 또는 세포의 집단에서 IL-18R 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0053] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단의 IL-18 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0054] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 사이토카인 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0055] 또 다른 실시형태에서, 사이토카인은 IFNg이다.

[0056] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단의 증식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0057] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포의 집단의 증식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0058] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 세포는 세포 CD4+ T

세포, CD8+ T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이거나 또는 세포의 집단은 상기 세포를 포함한다.

[0059] 또 다른 실시형태에서, 세포는 미경험 세포이거나 또는 세포의 집단은 미경험 세포를 포함한다.

[0060] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 T 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포 또는 T 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0061] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포독성 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포독성 세포 또는 세포독성 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0062] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 T 세포 또는 T 세포의 집단의 고갈을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포 또는 T 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0063] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 산화성 손상을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0064] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 집단에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 Treg 함유 세포 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0065] 또 다른 실시형태에서, Treg 세포는 Foxp3+ Treg 세포이다.

[0066] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 면역관문 저해제의 존재 하에서 CD25 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0067] 또 다른 실시형태에서, 접촉시키는 단계는 생체내에서 또는 시험관내에서 수행된다.

[0068] 또 다른 실시형태에서, 방법은 생체외에서 수행된다.

[0069] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물과 접촉시킴으로써 얻어진 세포 또는 세포의 집단으로부터 유래된 세포 또는 세포의 집단을 제공한다.

[0070] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 펩타이드 또는 약제학적 조성물은 대상체에게 투여되어 생체내에서 Lck의 활성도를 증가시킨다.

[0071] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 Lck의 활성도를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0072] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0073] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또

는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0074] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법을 제공하며, 여기서 Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태는 병원성 감염, 병원성 감염으로부터의 패혈증(예를 들어, 만성 패혈증), 면역 결핍성 장애, 감소된 면역 반응, 감소된 T 세포 수치, T 세포 이상, T-세포 고갈 및 T 세포 면역 관문 차단으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 질환 또는 병태는 암이다.

[0076] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 백신접종을 필요로 하는 대상체에서 백신을 접종하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0077] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0078] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 면역억제를 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0079] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 노화 관련 면역 기능장애를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0080] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 Th1 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0081] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 포함하는, Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 치료 및/또는 예방하기 위한 투여 단위 형태(dosage unit form)를 제공한다.

[0082] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 포함하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 투여 단위 형태를 제공한다.

[0083] 본 명세서 전체에서, 용어 "포함한다" 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 군을 포함하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계 또는 요소, 정수, 정수 또는 단계의 군을 제외하지 않는 것으로 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 시험관내에서 폴리펩타이드에 의한 Lck 활성화를 도시한 도면.

도 2는 다른 SFK와 비교한 Lck의 선택적인 활성화를 도시한 도면.

도 3은 Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Lck 포스포릴화를 증가시키고, Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Y394에서 Lck 포스포릴화를 증가시킨다는 것을 도시한 도면. A: 항-포스포 타이로신 항체 4G10로의 프로빙의 결과를 나타낸 현상된 웨스턴 블롯의 사진. Lck 효소의 포스포릴화의 수준은 펩타이드 활성물질 RRRRRRRR("8Arg"; 레인 7(1μM)과 비교하여 레인 8(10μM)) 및 RRRRRRRRRR("10Arg"; 레인 5(1μM)와 비교하여 레인 6(10μM))의 농도가 증가함에 따라서 증가하였다. B: 항-pY394 항체로의 프로빙 후 8Arg 및 10Arg 펩타이드에 의해서 유도된 타이로신 Y394에서 Lck의 자가-포스포릴화를 나타낸 현상된 웨스턴 블롯의 사진. 증가된 자가-포스포릴화는 8Arg(레인 7 내지 8) 및 10Arg(레인 5 내지 6) 폴리펩타이드의 농도 증가와 연관되었다.

도 4는 시험관내에서 폴리펩타이드에 의한 Lck 활성화를 도시한 도면.

도 5는 시험관내에서 폴리펩타이드에 의한 Lck 활성화를 도시한 도면.

도 6은 Lck가 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800") 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2("IK14804")와 접촉되는 경우 Lck 활성도의 용량 의존적인 활성화를 도시한 도면.

도 7은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR(IK00900")가 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. A: 야생형 주카트 세포(인간 T 림프구 세포의 불멸화된 주)를 항-CD28 항체 및 아비딘의 존재 하에서 바이오티닐화된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 자극하였다. 배양 기간(48시간 또는 72시간) 동안 세포를 시험 폴리펩타이드에 노출시켰다. 세포 상청액을 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트를 사용하여 48 또는 72시간 이후에 IL-2에 대해서 검정하였다. B: Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800")는 72시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도한다.

도 8은 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800")이 단리된 인간 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. 48시간 동안 항-CD3 및 항-CD28 자극 이후에 단리된 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포(건강한 인간 PBMC로부터의 면역자성 분리(immunomagnetic separation))로부터의 IL-2 생산에 대한 Lck 활성화 펩타이드의 효과. 데이터는 각각 비히클 대조군에 대해서 정규화된 3명의 공여자로부터의 평균 +/-SEM으로 나타낸다. 각각의 농도의 시험 펩타이드를 0.08μM과 비교하는 듀넷 사후 검정(Dunnett's post-test)과 함께 양측 ANOVA를 사용하여 통계적 비교를 수행하였다(*p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001). 점선은 정규화된 데이터에 대한 비히클 대조군 값을 나타낸다.

도 9는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800"), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR("IK15800") 및 D 아미노산만을 포함하는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(즉, rvkvkvvvv-rrrrrrrrr; "IKD15800")이 단리된 인간 T 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. 간략하면, 단리된 T 세포(CD3+)를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800"), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR("IK15800") 및 D 아미노산만을 포함한 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR("IKD15800")와 함께 5-농도 범위에 걸쳐서 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 72시간 동안 배양하였고, 그 후 상청액을 수집하고, ELISA에 의해서 IL-2에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 평균 IL-2pg/mℓ 및 배수 변화(비히클에 대해서 정규화됨)를 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터를 각각의 펩타이드 농도를 비히클과 비교하는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였거나 여기서 정규화된 시험 농도를 최저 시험 농도와 비교하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). 점선은 정규화된 데이터(우측)에 대한 비히클 대조군 값을 나타낸다.

도 10은 자극된 세포를 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14900"), HHHHH-RSKSKNPLY-RRRRRRRRR "IK11480"), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH("IK14820") 및 특히 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800")에 노출하였을 때 IL-2R 알파(CD25) 발현이 증가되었다는 것을 도시한 도면. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2mℓ 부피)당 1백만 개 세포로 시딩하고, PMA(50ng/mℓ) 및 이오노마이신(1μg/mℓ)으로 자극하였다. 이어서, 세포를 제시된 바와 같은 펩타이드로 처리하고, 이어서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL-12Rα 함량에 대해서 분석하였다.

도 11은 CD25의 발현이 IK14000(대조군)에 비해서, Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 IK14800(RSKAKNPLY-RRRRRRRRR) 및 IKD14800(rskaknply-rrrrrrrrr)로의 재자극 시 고갈된 CD4+ T 세포에서 증가된다는 것을 도시한 도면. 세포를 배양물 중에서 72시간 후 유세포 분석법을 위해서 염색하여 CD25를 평가하였다(MFI, 상단, 발현 및 빈도의 수준을 나타내기 위해서, 하단). 살아있는 집단 내에서, 세포를 게이팅하여 CD4+ 세포에 초점을 맞췄고, 이어서 CD25+ 집단에 대해서 게이팅하였다. 데이터는 절대 값(좌측)으로서 그리고 비히클에 대해서 정규화된(우측) 4개의 생물학적 복제물로부터의 평균 +/- sem으로서 제시된다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001). 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA를 사용하여 각각의 펩타이드를 각각의 시험 농도에서 대조군 펩타이드(IK14000)에 대해서 비교하였다.

도 12는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2(IK14800)의 첨가가 PD-1/PD-L1 상호작용에 의해서 유도된 IL-2R알파의 억제를 구제하였다는 것을 도시한 도면. 간략하면, 주카트 세포를 배양물 접시에 부착된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 활성화시켜 세포 예정사 수용체 1(programmed cell death receptor 1: PD-1)의 세포 표면 발현을 유도하였고, 48시간 동안 첨가제의 부재 하에서 또는 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2(2.5μM의 IK14800) 단독과 함께, 세포에서 면역관문 차단을 유도하기 위해서 5μg/mℓ의 재조합 PD-L1(PD-1에 대한 리간드) 단독과 함께 또는

IK14800 펩타이드와 재조합 PD-L1과 함께 배양하였다. 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트에 의해서 IL-2R알파(CD25)를 세포 용해물에서 측정하였다.

도 13은 항-CD3로 자극될 때 IL2Ra(CD25)의 발현이 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 증가된다는 것을 도시한 도면. 자극된 PBMC로부터의 CD4+(좌측) 및 CD8+(우측) 세포에서의 CD25 발현. 새로 단리된 PBMC를 제시된 농도(μM)의 시험 펩타이드 IK14800의 존재 하에서 항-CD3(1㎍/㎖)과 함께 또는 이것 없이(- aCD3) 24시간 동안 자극하였다. 데이터는 4명의 공여자로부터의 평균 +/- SEM으로서 제시되며(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001), 듀넷 사후 검정을 사용한 양측 ANOVA를 사용하여 각각의 펩타이드(또는 비자극된 세포)의 농도를 비히클(0)과 비교하였다.

도 14는 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨 것을 도시한 도면. A. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서, 세포를 단백질 IK14800으로 처리하고, 이어서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100ul, n=3)을 IL12 함량에 대해서 분석하였다. 도 14B는 대조군에 비해서 주카트 세포에서 IL-12 분비를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)의 능력은 Lck에 좌우된다는 것을 도시한 도면. 이러한 데이터는, Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)에 의한 인간 T 세포주에서 IL-12 분비는 Lck에 좌우된다는 것을 입증한다. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서, 세포를 단백질 IK14800으로 처리하고, 이어서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100ul, n=3)을 IL-12 함량에 대해서 분석하였다.

도 15는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 및 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(rskaknply-rrrrrrrrr)가 IL-12의 생산을 저해하는 항-CD40L 차단 항체의 존재 하에서 항-CD3 자극된 PBMC에 비해서, 항-CD3 자극된 PBMC에서 IL-12 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드 RRRRRRRRR은 또한 항-CD40L 차단 항체의 존재 하에서 항-CD3 자극된 PBMC에 비해서 항-CD3 자극된 PBMC에서 IL-12 분비를 유도하였다. 항-CD3 자극된 PBMC를 항-CD40L 차단 항체의 존재 하에서 그리고 이의 부재 하에서 24시간 동안 IK14800, IKD14800, IK15800 및 IKD15800과 함께 배양하였다. 상청액을 ELISA에 의해서 IL-12p70 수준에 대해서 평가하였다. 제시된 데이터는 IL-12p70 pg/㎖ 값을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터는 펩타이드 처리 단독을 펩타이드 + 항-CD40L과 비교하는 시닥 사후 검정(Sidak's post-test)과 함께 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). 점선은 평균 비히클 대조군을 나타낸다.

도 16은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 24시간에 대조군에 비해서 IL-12p70 분비를 유도하는 것을 도시하는 도면. PBMC를 24시간 동안 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 펩타이드와 함께 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐 배양하였고, 그 후 상청액을 수집하고, ELISA에 의해서 IL-12p70에 대해서 분석하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 평균 사이토카인 생산(pg/㎖)을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 데이터를 분석하였다(*P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001). 점선은 평균 비자극된 PBMC 발현을 나타낸다.

도 17은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 NK 세포($CD3^{neg}$ CD56+ 세포)의 집단에서 IL-12Rβ2 발현을 유도하는 것을 도시한 도면. 항-CD3 자극된 PBMC를 0.16μM의 IK14800과 비히클 대조군(0)과 함께 72시간 동안 배양하였고, 그 후 $CD3^{NEG}CD56^{+}$ NK 세포를 유세포 분석법에 의해서 IL-12Rβ2 발현에 대해서 분석하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 평균 각각의 IL-12Rβ2 발현($CD3^{NEG}$CD56+ NK 세포의 백분율)을 나타낸다.

도 18은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 비자극된 CD4+ T 세포에 비해서 IFN-γ 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 5-농도 범위에 걸쳐서 IK14800과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 평균 각각의 IFN-γ(비히클에 정규화된 pg/㎖ 값)를 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터를 IK14800 농도를 비히클과 비교하거나 최저 펩타이드 농도에 정규화되는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(**p<0.01, ***p<0.001).

도 19는 D 아미노산만을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IKD14800)가 비자극된 CD8+ T

세포에 비해서 자극된 인간 CD8+ T 세포에 의해서 IFN-γ 분비를 유도하는 것을 도시한 도면. 단리된 CD8+ T 세포를 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 IKD14800의 존재 하에서 항-CD3 항-CD28 코팅된 dynabeads(4:1 세포 대 비드 비) 자극과 함께 배양하였다. 24시간 후 상청액을 샘플링하고, ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 CD8+ T 세포 집단에서 평균 IFN-γ 생산(pg/㎖)을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터를 또한 비히클 대조군에 정규화하였고, 평균 배수 변화로서 나타낸다(n=3). 데이터를 듀넷 사후 검정과 함께 RM 일측 ANOVA에 의해서 분석하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). 유의미한 차이는 각각의 펩타이드 농도와 비히클 대조군 사이에 일어난 비교를 나타내거나 여기서 데이터는 최저 펩타이드 농도(0.08μM)에 정규화된다.

도 20은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 인간 CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 도시한 도면. 단리된 CD8+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안5-농도 범위에 걸쳐서 IK14800과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 배양하였고, 그 후 CD8+ T 세포를 유세포 분석법에 의해서 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 각각의 Ki67(MFI)(+/- SEM, n=4)를 나타낸다. 데이터를 펩타이드 농도를 비히클과 비교하는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(****p<0.0001). 점선은 평균 비자극된 대조군 값을 나타낸다.

도 21은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 인간 CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 도시한 도면. 자극 PBMC 검정에서 IK15800에 반응한 CD8+ T 세포에서의 Ki67(증식) 발현. 항-CD3 자극된 PBMC를 5-농도 범위에 걸쳐서 IKD15800과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 72시간 동안 배양하였고, 그 후 CD8+ T 세포를 유세포 분석법에 의해서 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 각각의 발현을 나타낸다(MFI)(+/- SEM, n=3). 데이터를 펩타이드 농도를 비히클과 비교하는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(**P<0.01). 점선은 비자극된 대조군 값을 나타낸다.

도 22는 펩타이드 대조군이 없는 것에 비해서 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 CD28 발현을 유도하는 것을 도시한 도면. A. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 IK14800과 함께 배양하였고, 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안 시험하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 CD28의 발현에 대해서 평가하였다. 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 CD8+ T 세포 집단에서 평균 각각의 발현을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터는 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 평가하였다(*p<0.05, ***P<0.001). 점선은 비자극된 세포를 나타낸다. B. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 시험 펩타이드와 함께 배양하였고, 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안 시험하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 CD28의 발현에 대해서 평가하였다. 제시된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 CD4+ T 세포 집단에서 평균 각각의 발현을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터는 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 평가하였다(**P<0.01, ***P<0.001 ****p<0.0001). 점선은 비자극된 세포를 나타낸다.

도 23A는 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 자극된 CD8+ T 세포로부터 IL-15R 발현 및 IL-15 분비를 증가시킨다는 것을 도시한 도면. A. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)과 함께 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안 배양하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 CD215(IL-15R)의 발현에 대해서 평가하였다. 제시된 데이터는 펩타이드 처리에 반응하지 않은 CD8+ T 세포 집단에서 평균 각각의 발현을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 데이터를 분석하였다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). 점선은 비자극된 PBMC 발현을 나타낸다. B. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)과 함께 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 배양하였다. 상청액을 수집하고, ELISA에 의해서 IL-15에 대해서 평가하였다(n=3 +/- SEM). 점선은 비자극된 PBMC 발현을 나타낸다(T 검정에 의해서, 0 펩타이드와 비교하여 1.25μM, *p<0.05). C. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)과 함께 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안 배양하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 CD215(IL-15R)의 발현에 대해서 평가하였다. 제시된 데이터는 펩타이드 처리에 반응하지 않은 CD8+ T 세포 집단에서 평균 각각의 발현을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 데이터를 분석하였다(*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001). 점선은 비자극된 PBMC 발현을 나타낸다.

도 24는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK4800)이 인간 CD28+/CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 도시한 도면. PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 펩타이드 IK15800 및 IK14800과 함께 배양하였고, 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안

시험하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 Ki67에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 CD8+ T 세포의 CD28+ 하위집단에서 평균 Ki67(증식의 지시인자) 발현을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터는 듀넷 사후 검정과 함께 양측 ANOVA에 의해서 평가하였다(*p<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001). 점선은 비자극된 세포를 나타낸다.

도 25는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL-12Rβ2 발현을 유도하는 것을 도시한 도면. 단리된 T 세포(CD3+)를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™으로 자극하고, 5-농도 범위에 걸친 IK15800과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 72시간 동안 배양하였고, 그 후 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포를 유세포 분석법에 의해서 IL-12Rβ2 발현에 대해서 평가하였다. 제공된 데이터는 펩타이드 처리에 반응한 IL-12Rβ2 발현(CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 %)을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터를 펩타이드 농도를 비히클과 비교하는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). 점선은 평균 비자극된 대조군 값을 나타낸다.

도 26은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 CD3negCD56+/dim NK 세포에서 IL-2Rβ 발현을 유도하는 것을 도시한 도면. 건강한 공여자로부터의 PBMC를 시험 펩타이드(0.08 내지 1.25μM) 또는 비히클 대조군의 존재 하에서 항-CD3(1㎍/㎖)로 72시간 동안 자극하였다. 배양 기간 후에, 세포를 수집하고, 유세포 분석법에 의해서 $CD3^{neg}CD56^{+/dim}$ NK 세포에서 IL-2Rβ(CD122) 발현에 대해서 측정하였다. 평균 IL-2Rβ(CD122) 발현(양성 세포% 또는 MFI)으로 표현된 데이터(+/- SEM, n=4). 시험 물질을 비히클 대조군과 비교하는 홀름-시닥 다중 비교 사후 검정(Holm-Sidak's multiple comparisons post-test)과 함께 양측 ANOVA의 반복 측정치를 사용하여 데이터를 분석하였다(**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). 청색 점선은 비자극된 샘플에서 평균 발현을 나타낸다.

도 27은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 PBMC 내에서 CD8+ 세포 집단의 확장을 유도하는 것을 도시한 도면. 건강한 공여자로부터의 PBMC를 IK15800(0.08 내지 1.25μM) 또는 비히클 대조군의 존재 하에서 TCR + IL-2를 통해서 10일 동안 자극하였다. 배양 기간 후에, 세포를 수집하고, 유세포 분석법에 의해서 CD8+ 세포 비율에 대해서 분석하였다. 데이터를 평균 백분율 발현으로서 나타낸다(+/- SEM, n=4). 시험 물질을 비히클 대조군과 비교하는 홀름-시닥 다중 비교 사후 검정과 함께 양측 ANOVA의 반복 측정치를 사용하여 데이터를 분석하였다(*p<0.05, ****p<0.0001). 점선은 비자극된 샘플에서 평균 발현을 나타낸다.

도 28은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 CD4+ T-세포에 의해서 IL-21 생산을 유도하는 것을 도시한 도면. CD4+ T 세포를 단리시키고, 항-CD3 항-CD28 자극 및 IK14800의 존재 하에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상청액을 ELISA에 의해서 IL-21에 대해서 평가하였다. 제시된 데이터는 48시간 배양 후 IL-21 생산(pg/㎖)(좌측)을 나타낸다(+/- SEM, n=1). 사이토카인은 1명의 공여자로부터의 상청액에서만 검출되었다(따라서 통계학 계산하지 않음). 대조군(우측)은 IL-21 분비에 대한 IL-6 증가를 나타낸다.

도 29는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 항원 자극 전에 투여되는 경우, 후속 항원 자극 시 인간 T 세포주에 의한 IL-2 생산을 증가시키는 것을 도시한 도면. 5백만개의 세포를 T25 플라스크에 시딩하고, 상기 표에 제시된 바와 같은 다양한 농도의 14800으로 1시간 동안 처리하고, 그 후 세포 현탁액을 원심분리시키고, 새로운 배지로 2회 세척하였다. 배지 500uL 중의 바이오틴-항-CD3과 아비딘(5: 1.25ug)의 혼합물을 12웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 10분 후, 세포를 웰당 1백만개로 시딩하고, 배지를 사용하여 세포 현탁액을 최대 2㎖ 부피로 만들었다. 그 다음 샘플을 항-CD28(5ug/㎖)로 추가로 자극하고, 48시간 37℃에서 인큐베이션시키고, 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL2 함량에 대해서 분석하였다.

도 30은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 루이스 폐암 마우스의 비장세포에서 CD28을 발현하는 CD4+ T 세포의 백분율 및 CD4+ T 세포에서 CD28의 상대적인 발현을 증가시키는 것을 도시한 도면. 데이터는, 유세포 분석법에 의해 측정되는 경우, 대조군 샘플(비히클)과 비교한, CD28에 대해 양성인 것으로 결정된 CD4+ T 세포의 비율(좌측) 및 CD4+ T 세포에서 CD28의 기하학적 평균(우측)을 나타낸다(양측 t-검정(two tailed *t*-test)에 의해서 결정되는 경우 ***p<0.001, ****p<0.0001).

도 31은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 루이스 폐암 마우스의 비장세포에서 CD28 및 CD215를 발현하는 CD8+ T 세포의 백분율을 증가시키는 것을 도시한 도면(양측 t-검정에 의해서 결정되는 경우 **p<0.01, ***p<0.001).

도 32는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 루이스 폐암 마우스로부터의 비장세포에서 NK 세포 상의 pSTAT4의 발현을 증가시키는 것을 도시한 도면. 이 데이터는 양측 t-검정에 의해서 결정된 바와

같은 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같이 NK 세포 상에서의 pSTAT4의 기하 평균을 나타낸다(**p<0.01).

도 33은 폴리펩타이드 DDDDDDDDD가 Lck의 활성도를 증가시키지 않는 것을 도시한 도면.

도 34는 대조군에 비해서, 주카트 세포에서 IL-2 분비를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR의 능력이 Lck에 좌우된다는 것을 도시한 도면. 이러한 데이터는, Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR에 의한 인간 T 세포주에서 IL-2 분비는 Lck에 좌우된다는 것을 입증한다. 주카트 세포(WT 및 Lck 결핍)를 PBS 중에서 제조된 CD3/CD28(각각 5ug/㎖) 200uL로 1시간 동안 37℃에서 자극하고, 세포를 웰당 1백만개로 시딩하고, IK14800으로 처리하였다.

도 35는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)로의 처리에 의한 IL-2 생산의 증가가 항원 자극의 부재 하에서 일어나지 않는 것을 도시한 도면. 간략하면, 12웰 플레이트를 PBS(200㎕)에서 제조된 항-CD3(5㎍/㎖) 용액으로 코팅하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서 항-CD3 용액을 흡인시키고, 웰을 배지(1㎖, 10분)로 2회 약간 세척하였다. 주카트 세포를 웰당 1백만개로 시딩하고, 항-CD28(5㎍/㎖)로 추가로 자극하고, 이어서 0시간에 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)(2.5μM)로 처리하였다. 세포를 72시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 상청액을 ELISA에 의해서 IL-2에 대해서 분석하였다.

도 36은 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)의 복강내 투여가 루이스 폐암 (LCC) 모델에서 종양 면적을 감소시키는 것을 도시한 도면. 접종(1×10^6개 세포)(코호트 당 n=8) 후 10일에 시작해서 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR을 암컷 C57 블랙 마우스에서 2주 동안 주당 2회 복강내로(200㎍) 투여하고, 그 후 H&E 절편을 종양 침윤의 증거에 대해서 평가하고, 종양 덩어리를 건강한 폐 조직의 백분율로서 계산하였다. 데이터 지점은 샘플당 종양 덩어리의 평균 면적을 도시한다(**p<0.005, 언페어드 t-검정(unpaired t-test)).

도 37은 지방산에 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨 것을 도시한 도면. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서, 세포를 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK14804)로 처리하고, 이어서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL-2 함량에 대해서 분석하였다.

도 38은 지방산에 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킴을 도시한 도면. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서 세포를 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK14804) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK15804)로 처리하였다. 이어서 세포를 48시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL-12 함량에 대해서 분석하였다.

도 39는 Lck 활성화 폴리펩타이드가 세포막에서 지질 과산화를 저해하는 것을 도시한 도면[# = 티올 산화환원 상태](터키 다중 비교 검정(Tukey's multiple comparisons test)과 함께 일측 Anova, *p < 0.05, **p < 0.01). 처리의 부재 하에서 모의 대조군(Sham)과 UV 조사 사이에서 TRS의 유의한 차이는 더 낮은 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800) 용량에 비해서 최대 농도(5μM)에서 125D 또는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)의 존재 하에서는 인지되지 않는다.

도 40은 총 Lck의 수준이 변하지 않고 유지되면서, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 펩타이드 무함유 대조군에 비해서, 항-pY394 항체에 의해서 검출된 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 증가시키는 것을 도시한 도면.

도 41A는 폴리펩타이드 RSKAKNPLYR("IK14000") 및 RSKAKNPLY("IK94000")가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨 것을 도시한 도면. 도 41B는 RSKAKNPLYR ("IK14000")이 아니라 rskaknply("IKD94000")가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨 것을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 비-수용체 Src 키나제 패밀리(Src kinase family: SKF)의 구성원은 포유동물에서 하기 8종의 키나제: Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Hck, Lck 및 Blk를 포함하고, 선택적인 Lck 활성화제는 식별된 적이 없다(Bae O-N et al, Journal of Neuroscience, 2012, 32(21): 7278-7286).

[0086] 본 발명은 부분적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 6개 초과의 인접한 양이온성 아미노산을 포함하는 다양이온성 펩타이드가 Lck의 활성도를 자극할 수 있다는 발견에 관한 것이다. 적어도 일부 실시형태에서, 본 발명에

따른 Lck 활성화제는 SKF 구성원 중에서 Lck 만의 활성화를 자극할 수 있다. Lck 활성화제 및 특히 특이적인 Lck 활성화제에 대한 필요성은 노화와 관련되거나 노화와 관련되지 않을 수 있는 광범위한 병태와 관련된다.

[0087] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 펩타이드는 6개 초과의 인접한 양이온성 아미노산을 갖는 Lck-활성화 양이온성 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "활성화"는 일반적으로 적어도 하나의 표적 단백질의 활성도를 증가시키는 것을 지칭한다. 키나제의 구체적인 맥락에서, 이러한 활성화는 적어도 하나의 표적 기질 또는 부위의 증가된 포스포릴화로 이어진다. 이러한 활성화는 단백질 키나제와 단백질 키나제의 결합 파트너 사이에 복합체가 형성될 확률을 증가시키거나 표적에 결합된 후 키나제의 활성도를 증가시키는 것을 포함하는(이에 제한되지 않음) 임의의 수단에 의해 발생할 수 있다. 이러한 활성화는 생체내 또는 시험관내에서 일어날 수 있다.

[0089] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드"는 "Lck 활성화 폴리펩타이드" 또는 "Lck 활성화제"와 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0090] Lck는 또한 LCK 원종양 유전자(proto-oncogene), 백혈구 C-말단 Src 키나제; 림프구 세포-특이적 단백질-타이로신 키나제; 단백질 YT16; 원종양 유전자 Lck; T 세포-특이적 단백질-타이로신 키나제; 및 p56-LCK로 지칭된다.

[0091] 인간에서 Lck에 대한 유전자 및 단백질 서열은 HUGO Gene Nomenclature Committee(HGNC)(http://www.genenames.org/)로부터 유래될 수 있다. 인간에서 Src(및 스플라이스 변이체)에 대한 HGNC 참조 번호는 진뱅크 수탁 번호(GenBank Accession number) 및 GeneID와 함께 하기 표 1에 열거되어 있다.

표 1

[0092]

HGNC 유전자 번호	진뱅크 수탁 번호 (아미노산)	진뱅크 수탁 번호(뉴클레오타이드)	유니프로트 참조	유전자 ID
HGNC:6524	NP_001036236.1 (아이소폼 a/변이체 1) NP_005347.3 (아이소폼 a/변이체 2) NP_001317397.1 (아이소폼 b)	NM_001042771.2 (아이소폼 a/변이체 1) NM_005356.5 (아이소폼 a/변이체 2) NM_001330468.1 (아이소폼 b)	P06239	HGNC:6524

[0093] Lck는 다수의 활성도를 갖는다. Lck는 양성 조절 부위 Tyr 394에서 자가포스포릴화시키고, CD3 수용체, CEACAM1, ZAP-70, SLP-76, IL-2 수용체, 단백질 키나제 C, ITK, PLC, SHC, RasGAP, Cbl, Vav1 및 PI3K를 비롯한 다수의 단백질을 포스포릴화시킨다. Lck는 ADAM15, CD2, CD44, CD4, COUP-TFII, DLG1, NOTCH1, PIK3CA, PTPN6, PTPRC, UNC119, SYK, UBE3A 및 ZAP70과 상호작용하는 것으로 밝혀져 있다.

[0094] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 활성화제가 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 포함하여 Lck의 활성도를 증가시키고, IL-2의 생산을 증가시킬 수 있다는 것을 입증하였다.

[0095] 따라서, 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "Lck의 활성"은 Y394에서 Lck의 포스포릴화, IL-2의 생산, CD3 수용체, CEACAM1, ZAP-70, SLP-76, the IL-2 수용체, 단백질 키나제 C, ITK, PLC, SHC, RasGAP, Cbl, Vav1 및/또는 PI3K의 포스포릴화; ADAM15, CD2, CD44, CD4, COUP-TFII, DLG1, NOTCH1, PIK3CA, PTPN6, PTPRC, UNC119, SYK, UBE3A 및/또는 ZAP70와의 상호작용 및/또는 TCR의 포스포릴화를 포함한다.

[0096] 전형적으로, 다양이온성 펩타이드는 7 내지 약 35개 아미노산 길이이다. 따라서 다양이온성 펩타이드는 예를 들어, 7, 8, 9, 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 또는 35개 아미노산 길이일 수 있다. 전형적으로, 다양이온성 펩타이드는 최대 약 25개 아미노산 길이이고, 보다 전형적으로, 최대 약 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 17 또는 16개 아미노산 길이이다.

[0097] 전형적으로, 다양이온성 펩타이드의 아미노산 전부는 양이온성 아미노산 잔기이다. 그러나, 상기에 기재된 바와 같은 또 다른 것 및 하나 이상의 비-양이온성 아미노산 잔기와 인접한 양이온성 아미노산을 포함하는 다양이온성 펩타이드가 본 발명을 위해서 또한 명확하게 제공된다. 전형적으로 이러한 실시형태에서, 다양이온성 펩타이드를 포함하는 아미노산 중 적어도 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, or 95% 이상은 양이온성 펩타이드이다. 이러한 다양이온성 펩타이드의 예는 하나 이상의 비-양이온성 아미노산 사이에 배치된 양이온성 아미노산을 포함할 수 있고/있거나 예를 들어, 각각의 N-말단 및/또는 C-말단 비-양이온성 아미노산 또는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이러한 모든 다양이온성 펩타이드는 본 명세서에 명확히 포함된다.

[0098] 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양이온성 펩타이드(PP)는 전형적으로 적어도 7개의 인접한 양이온성 아미노산, 및 보다 일반적으로는 적어도 8, 9 또는 10개의 인접한 양이온성 아미노산을 포함한다.

[0099] 특히 바람직한 실시형태에서 다양이온성 펩타이드는 전형적으로 8 내지 16개의 인접한 양이온성 아미노산, 보다 전형적으로 8 내지 12개의 인접한 양이온성 아미노산 및 가장 전형적으로 8 내지 10개의 인접한 양이온성 아미노산을 포함한다.

[0100] 다양이온성 펩타이드를 포함하는 양이온성 아미노산은 독립적으로 아르기닌(R), 라이신(K), 히스티딘(H) 및 오르니틴 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0101] 양이온성 아미노산 잔기의 다양한 서열 조합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양이온성 펩타이드는 다양이온성 펩타이드의 N-말단 단부에서 시작하여 그 다음 비-아르기닌 양이온성 아미노산(예를 들어, 히스티딘 또는 라이신 잔기)이 이어지거나 또는 그 역인 아르기닌 아미노산(예를 들어, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 그 초과의 아르기닌 잔기)의 선형 아미노 서열을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 비-아르기닌 아미노산의 서열은 전형적으로 최대 약 16개 아미노산 길이(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개 아미노산)이고, 이러한 모든 다양이온성 펩타이드의 사용이 본 명세서에 명확하게 포함된다.

[0102] 다른 실시형태에서, 양이온성 아미노산은 양이온성 펩타이드의 "이중항(couplet)" 또는 삼중항의 교번하는 시리즈, 예컨대, 아르기닌과 비-아르기닌 아미노산의 이중항 또는 삼중항(예를 들어, RH의 이중항) 또는 대안적으로 이중항의 아미노산의 위치가 역전된 이중항 또는 삼중항(예를 들어, HR의 이중항)으로 배열될 수 있다. 마찬가지로, 다양이온성 펩타이드는 양이온성 아미노산의 상이한 것의 이중항 또는 삼중항의 시리즈의 조합(예를 들어, RH 또는 HR의 이중항) 그 다음 및/또는 그 앞의 각각의 추가의 전형적으로 최대 약 16개 아미노산(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개 아미노산)의 양이온성 아미노산 또는 양이온성 아미노산 서열(예를 들어, 히스티딘 또는 폴리히스티딘 서열)을 포함할 수 있다. 이해될 바와 같이, 용어 "이중항"은 2개의 연속적인 아미노산을 의미한다. 마찬가지로, 용어 "삼중항"은 3개의 연속적인 아미노산을 의미한다. 반복되는 양이온성 아미노산 이중항(예를 들어, RH 또는 HR)을 갖는 적어도 일부 다양이온성 펩타이드에서, 다양이온성 펩타이드는 하나 이상의 추가의 각각의 양이온성 아미노산 잔기(예를 들어, HH, RR, KK, HHH, RRR, KKK, HHHH, RRRR, KKKK 등)의 적어도 하나의 이중항 또는 삼중항으로 시작하고/하거나 종결될 수 있다.

[0103] 본 발명에 따라서 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드는 예를 들어, 하기 비제한적인 예로부터 선택될 수 있다:

RRRRRRR (7Arg), RRRRRRRR (8Arg), RRRRRRRRR (9Arg), RRRRRRRRRR (10Arg), RRRRRRRRRRR (11Arg), RRRRRRRRRRRR (12Arg), RRRRRRRRRRRRR (13Arg), RRRRRRRRRRRRRRR (15Arg), RRRRRRRRRRRRRRRR(16Arg), KKKKKK (6Lys), RKKKKKKKKKHHHHHHHHHH(R8K10His); RHHHHHHHHHH (R10His), RRRRRRRRHHHHHHHHHH (8Arg10His) 및 RRRRRRRRRHHHHHHHHHH; (9Arg10His) RRRRRRRRRHHHHHHHHHHHHH (9Arg14His), RHRHRHRHRHRHRHRHRHH (9R/H-His), HRHRHRHRHRHRHRHRHH (8H/R-2H).

[0104]

[0105] 더 추가의 실시형태에서, 상기에 예시된 다양이온성 펩타이드 내의 아르기닌 잔기 중 하나 이상이 각각의 라이

신 잔기 대신 치환될 수 있다.

[0106] 상기 다양이온성 펩타이드의 역전된 아미노산 서열의 사용이 또한 명확하게 본 명세서에 포함된다. 다양한 다른 아미노산 서열 패턴이 또한 사용될 수 있고, 이러한 서열 패턴 모두는 명확하게 본 명세서에 포함된다. 바람직한 실시형태에서 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드가 선형 펩타이드일 수 있지만, 또한 다양이온성 펩타이드가 분지형 펩타이드인 실시형태가 또한 제공될 수 있다. 분지형 다양이온성 펩타이드는 예를 들어, 아미노산 또는 아미노산 서열을 다양이온성 펩타이드의 골격 내의 라이신 잔기에 커플링시킴으로써 제공될 수 있다. 이러한 분지형 이온성 펩타이드의 예는 RK[8Arg]HHHHHHHHHHH이며, 여기서 8Arg 서열(RRRRRRRR)은 라이신 잔기 K에 커플링된 측쇄이다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 분지형 양이온성 펩타이드의 측쇄는 최대 16개 아미노산 길이 또는 보다 양호하게는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15 또는 16개 아미노산 길이일 수 있다. 전형적으로, 다양이온성 펩타이드의 측쇄는 최대 10개 아미노산 길이, 보다 전형적으로 최대 약 9개 아미노산 길이, 가장 전형적으로, 최대 약 8개 아미노산 길이이다.

[0107] 전형적으로, 펩타이드 활성제의 양이온성 아미노산은 아르기닌(R), 라이신(K), 히스티딘(H) 및 오르니틴, 가장 전형적으로, 아르기닌(R), 라이신(K) 및 히스티딘(H)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 잔기 중에서, 인접한 아르기닌 잔기는 라이신 또는 히스티딘 잔기의 상응하는 서열보다 더 양호하게 Lck 활성을 자극하는 것을 발견하였다. 다양이온성 펩타이드가 아르기닌 및 비-아르기닌 아미노 잔기(예를 들어, 히스티딘)를 포함하는 경우, 다양이온성 펩타이드는 전형적으로 약 1.2 이하 또는 약 1.1 이하 또는 약 1.0 이하 또는 약 0.9 이하 또는 약 0.8 이하 또는 심지어는 약 0.7 이하의 아르기닌 잔기에 대한 비-아르기닌 아미노산 잔기의 비를 갖는다.

[0108] 적어도 일부 실시형태에서, 다양이온성 펩타이드는 단일 양이온성 산 잔기(예를 들어, 아르기닌)의 2개 이상의 이중항 또는 삼중항을 포함한다. 이중항 또는 삼중항은 서로와 나란히 존재할 수 있거나(따라서 양이온성 아미노산의 4 또는 6개의 인접한 잔기의 서열을 형성함) 또는 다양이온성 펩타이드를 포함하는 다른 인접한 양이온성 아미노산 중 하나(예를 들어, 인접한 양이온성 아미노산 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 등)에 의해서 서로로부터 이격될 수 있다.

[0109] 전형적으로, 다양이온성 펩타이드의 적어도 대부분의 양이온성 아미노산은 아르기닌 아미노산이다. 가장 전형적으로, 인접한 양이온성 아미노산은 모두 아르기닌 아미노산이다.

[0110] 바람직한 실시형태에서, 양이온성 아미노산 서열은 RRRRRRRR, rrrrrrrr, RRRRRRRRR 및 rrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 소문자는 우회전성("dextro") 아미노산을 나타낸다.

[0111] 본 발명에 포함된 Lck 활성화제는 다양이온성 펩타이드로 이루어질 수 있거나 다른 실시형태에서, 추가의 펩타이드 모이어티에 커플링된 다양이온성 펩타이드를 포함한다. 추가 펩타이드 모이어티는 다양이온성 펩타이드의 Lck 자극 활성을 예를 들어, 증가시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 다양이온성 펩타이드 단독은 Lck 활성을 자극하지 않을 수 있고, Lck의 활성도는 다양이온성 펩타이드가 추가 펩타이드 모이어티에 커플링된 경우 단지 자극된다.

[0112] 편의를 위해서, 상기에 기재된 바와 같은 본 발명의 적어도 일부 실시형태에서 다양이온성 펩타이드(PP)가 커플링된 증강(augmenting) 또는 다른 펩타이드 모이어티는 (AP/P)로서 하기의 설명에서 지칭된다.

[0113] 적어도 일부 실시형태에서, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 하기 구조식 I의 아미노산 서열 또는 이의 역전된 서열을 포함한다:

[0114] R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K"구조식 I

[0115] 식 중,

[0116] 각각의 R/K는 독립적으로 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고;

[0117] R/K'는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고;

[0118] R/K"는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고, 존재하거나 존재하지 않고;

[0119] x^1 내지 x^6은 각각 독립적으로 아미노산이되;

[0120] 아미노산 x^3 내지 x^6은 총괄적으로 존재하거나 존재하지 않고, R/K"는 아미노산 x^3 내지 x^6이 존재하는 경우 존재하지 않는다.

[0121] 전형적으로, 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)에서,

[0122] x^1, x^3 및 x^6은 독립적으로 선택된 아미노산이고; x^2, x^4 및 x^5는 각각 독립적으로 소수성 아미노산이다.

[0123] 적어도 일부 실시형태에서 x^1, x^3 및 x^6은 친수성 아미노산이고, x^2, x^4 및 x^5는 소수성 아미노산이다.

[0124] 다른 실시형태에서 x^3 및 x^6은 친수성 아미노산이고, x^1, x^2, x^4 및 x^5는 소수성 아미노산이다.

[0125] 다른 실시형태에서 x^1 및 x^3은 친수성 아미노산이고,

[0126] x^2, x^4, x^5 및 x^6은 소수성 아미노산이다.

[0127] 추가의 다른 실시형태에서, 아미노산 x^1 내지 x^6은 모두 소수성 아미노산이거나 적어도 대부분의 아미노산 x^1 내지 x^6은 소수성 아미노산이다.

[0128] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드의 친수성 아미노산 및 소수성 아미노산은 유전자 암호에 의해서 암호화될 수 있고/있거나 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 전형적으로, 아미노산은 유전자 암호에 의해서 암호화된다. 다양이온성 펩타이드의 친수성 아미노산은 극성, 염기성 및 산성 아미노산으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0129] 극성 아미노산은 예를 들어, 세린(S), 트레오닌(T), 타이로신(Y), 아스파라긴(N) 및 글루타민(Q) 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0130] 염기성 아미노산은 예를 들어, 라이신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H) 및 오르니틴으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0131] 산성 아미노산은 예를 들어, 글루탐산(E) 및 아스파트산(D)으로부터 선택될 수 있다.

[0132] 비-극성 소수성 아미노산은, 예를 들어, 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 아이소류신(I), 프롤린(P), 시스테인(C), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 트립토판(W) 및 글리신(G)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 전형적으로, 소수성 아미노산(들)은 알라닌(A), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)으로부터 선택될 것이다.

[0133] 전형적으로, 구조식 I의 펩타이드에서 R/K' 및 R/K" 중 적어도 하나가 존재한다.

[0134] 가장 전형적으로, 구조식 I의 아미노산 잔기 R/K'가 존재한다.

[0135] 전형적으로, 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0136] (a) R-x^1-K-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K";

[0137] (b) R-x^1-R-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K"; 및

[0138] (c) K-x^1-K-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K".

[0139] 전형적으로, 구조식 Ia의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)에서:

[0140] x^1, x^3 및 x^6은 친수성 아미노산이고;

[0141] x^2, x^4 및 x^5는 소수성 아미노산이다.

[0142] 구조식 Ia의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 적어도 일부 실시형태에서:

[0143] x^1, x^3 및 x^6은 극성 아미노산이고;

[0144] x^2, x^4 및 x^5는 비-극성 아미노산이다.

[0145] 전형적으로, 구조식 Ia의 정에서:

[0146] x^1은 세린이고;

[0147] x^2는 알라닌, 류신 또는 발린이며;

[0148] x^3은 아스파라긴이고;

[0149] x^4는 프롤린, 발린 또는 알라닌이며;

[0150] x^5는 류신, 발린 또는 알라닌이고;

[0151] x^6은 타이로신이다.

[0152] 가장 전형적으로, 구조식 Ia의 실시형태에서, x^2는 알라닌이고, x^4는 프롤린이며, x^5는 류신이다.

[0153] 전형적으로, 구조식 Ib의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)에서:

[0154] x^3 및 x^6은 친수성 아미노산이고;

[0155] x^1, x^2, x^4 및 x^5는 소수성 아미노산이다.

[0156] 구조식 Ib의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 적어도 일부 실시형태에서,

[0157] x^3 및 x^6은 극성 아미노산이고;

[0158] X^1, x^2, x^4 및 x^5는 비-극성 아미노산이다.

[0159] 전형적으로, 구조식 Ib의 실시형태에서:

[0160] x^1은 알라닌 또는 글루탐산이고;

[0161] x^2는 알라닌, 류신 또는 발린이며;

[0162] x^3은 아스파라긴이고;

[0163] x^4는 프롤린, 발린 또는 알라닌이며;

[0164] x^5는 류신, 발린 또는 알라닌이고;

[0165] x^6은 타이로신이다.

[0166] 가장 전형적으로, 구조식 Ib의 실시형태에서, x^2는 알라닌이고, x^4는 프롤린이며, x^5는 류신이다.

[0167] 대안적으로, 구조식 Ib의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 적어도 일부 실시형태에서,

[0168] x^1, x^3 및 x^6은 친수성 아미노산이고;

[0169] x^2, x^4 및 x^5는 소수성 아미노산이다.

[0170] 전형적으로, 구조식 Ib의 이러한 실시형태에서:

[0171] x^1은 세린이고;

[0172] x^2는 알라닌, 류신 또는 발린이며;

[0173] x^3은 아스파라긴이고;

[0174] x^4는 프롤린, 발린 또는 알라닌이며;

[0175] x^5는 류신, 발린 또는 알라닌이고;

[0176] x^6은 타이로신이다.

[0177] *가장 전형적으로, 구조식 Ib의 이러한 실시형태에서, x^2는 알라닌이고, x^4는 프롤린이며, x^5는 류신이다.

[0178] 구조식 Ic의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 적어도 일부 실시형태에서:

[0179] x^1 및 x^3은 친수성 아미노산이고;

[0180] x^2, x^4, x^5 및 x^6은 소수성 아미노산이다.

[0181] 전형적으로, 구조식 Ic의 실시형태에서:

[0182] x^1은 글루탐산, 발린 또는 알라닌이고;

[0183] x^2는 알라닌, 류신 또는 발린이며;

[0184] x^3은 아스파라긴이고;

[0185] x^4는 프롤린, 발린 또는 알라닌이며;

[0186] x^5는 류신, 발린 또는 알라닌이고;

[0187] x^6은 타이로신이다.

[0188] 추가 실시형태에서, 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 하기를 포함할 수 있다:

[0189] x^1은 발린, 알라닌, 글루탐산 및 세린으로부터 독립적으로 선택되고;

[0190] x^2는 발린, 알라닌 및 류신으로부터 독립적으로 선택되며;

[0191] x^3은 발린, 알라닌 및 아스파라긴으로부터 독립적으로 선택되고;

[0192] x^4는 발린, 알라닌 및 프롤린으로부터 독립적으로 선택되며;

[0193] x^5는 발린, 알라닌 및 류신으로부터 독립적으로 선택되며;

[0194] x^6은 발린, 알라닌, 페닐알라닌 및 타이로신으로부터 독립적으로 선택된다.

[0195] 일 실시형태에서, 구조식 I의 펩타이드(Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티)는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된다.

[0196] 적어도 일부 실시형태에서, 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 아미노산 서열 R/K'-S-R/K-A-R/K-N-P-L-Y-R/K"(예를 들어, R/K-SKAKNPLY-R/K") 또는 이의 역전된 서열을 포함한다.

[0197] *다른 실시형태에서, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K"의 변형된 또는 변이 서열 또는 변형된 또는 변이 서열의 역전된 서열을 포함하거나 이것으로 이루어지며, 식 중, 아미노산 x^1 내지 x^6은 펩타이드 R/K'-S-R/K-A-R/K-N-P-L-Y-R/K"의 상응하는 아미노산과 30% 초과, 보다 일반적으로 50% 이상, 보다 일반적으로 65% 초과, 가장 일반적으로는 80% 초과의 전체 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 이러한 펩타이드의 예는 KEKLKNPLFK 및 RAKAKNPLF를 포함한다.

[0198] 추가 실시형태에서, 구조식 R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K"의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 아미노산 x^1 내지 x^6은 알라닌(A), 발린(V), 세린(S), 트레오닌(T), 류신(L), 아이소류신(I) 및 글리신(G) 잔기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 적어도 일부 실시형태에서, 펩타이드는 위치 x^1에 세린(S) 또는 트레

오닌(T)(이들 둘 다는 극성 아미노산임)을 갖지 않는다. 전형적으로, 아미노산 x^1 내지 x^6 각각은 독립적으로 비-극성 아미노산이고, 가장 전형적으로, 알라닌, 발린 및 세린으로부터 선택된다. 전형적으로, 이러한 실시형태에서, 아미노산 x^1 내지 x^6 각각은 알라닌(A) 및 발린(V)으로부터 독립적으로 선택된다. 이러한 펩타이드의 예는 R/K'-AKAKAAAA-R/K" 및 R/K'-VKVKVVVV-R/K"를 포함한다.

[0199] 전형적으로, 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드의 아미노산 R/K"는 존재하지 않는다. 이러한 펩타이드의 예는 RSKAKNPLY를 포함한다.

[0200] 적어도 일부 실시형태에서, 아미노산 x^3 내지 x^6 및 R/K"는 존재하지 않는다.

[0201] 적어도 일부 실시형태에서, 아미노산 x^3 내지 x^6은 존재하고, R/K"는 존재하지 않는다.

[0202] 전형적으로, R/K'는 존재한다. 가장 전형적으로, R/K'는 아르기닌이다.

[0203] 전형적으로, 각각의 R/K는 각각의 라이신 아미노산이다.

[0204] 적어도 일부 실시형태에서, 아미노산 x^1 내지 x^6은 소수성 아미노산이다.

[0205] 특히 바람직한 실시형태에서, 아미노산 x^1 내지 x^6은 동일하다.

[0206] 추가의 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 증강 또는 다른 펩타이드 모이어티는 하기와 같은 구조식 I 또는 이의 역전된 서열의 펩타이드를 포함한다:

[0207] R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K 구조식 I'

[0208] 식 중,

[0209] R/K'는 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고;

[0210] 각각의 R/K는 독립적으로 아르기닌 또는 라이신 아미노산 잔기이고; x^1 및 x^2는 각각 독립적으로 상기에 기재된 바와 같은 구조식 I 및 이의 실시형태에 대한 아미노산이다.

[0211] 적어도 일부 실시형태에서, 구조식 I 또는 구조식 I'의 펩타이드는 R-x^1-K-x^2-K를 포함한다.

[0212] 특히 바람직한 실시형태에서, 구조식 I 또는 Ia의 펩타이드의 아미노산 x^1 및 x^2는 각각 독립적으로 소수성 아미노산(예를 들어, 발린(V) 또는 알라닌(A))이고, 전형적으로, 동일하다.

[0213] 따라서, 상기로부터, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 구조식 I 또는 I'의 펩타이드를 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다. 따라서, 구조식 I 또는 I'의 펩타이드를 포함하는 펩타이드는 또한 구조식 I 또는 I'의 펩타이드와 인접한 하나 이상의 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 펩타이드의 각각 하나 또는 두 단부(예를 들어, N-말단 단부 및/또는 C-말단 단부)에 커플링된 하나 이상의 독립적으로 선택된 아미노산을 포함할 수 있다. 예로서, 더 추가의 실시형태에서, 아미노산 서열 구조식 I 또는 I'를 포함하는 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는, 하기와 같은 구조식 I''에 예시된 바와 같이, 아미노산 R/K'가 존재하지 않는 실시형태에서 아미노산 x^1에 커플링되거나 또는 존재하는 경우 아미노산 R/K'에 커플링된 아미노산 모이어티(AA)를 추가로 포함할 수 있다:

[0214] AA-R/K'-x^1-R/K-x^2-R/K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K'' 구조식 I"

[0215] 식 중, AA는 아미노산 또는 아미노산 서열이고, 각각의 R/K, R/K', R/K" 및 아미노산 잔기 x^1 내지 x^6은 상기 구조식 I에 대한 것과 같다.

[0216] 마찬가지로, AA 모이어티가 대신에 구조식 I"의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 다른 말단 단부에 커플링된 실시형태가 제공될 수 있다.

[0217] 전형적으로, 존재하는 경우, 아미노산 모이어티 AA는 하나 이상의 독립적으로 선택된 양이온성 아미노산으로 이루어진다. 전형적으로, 아미노산은 아르기닌(R), 히스티딘(H), 라이신(K) 및 오르니틴 아미노산 잔기로부터 독립적으로 선택될 것이고, 가장 전형적으로, 아르기닌(R) 잔기일 것이다. 적어도 일부 실시형태에서 AA 모이어티

는 존재하는 경우 최대 30개 양이온성 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 양이온성 아미노산 잔기(들))의 양이온성 아미노산 서열로 이루어진다.

[0218] 특히 바람직한 이러한 실시형태에서, AA 모이어티는 존재하는 경우 적어도 2개의 양이온성 아미노산을 포함할 것이다. 이러한 AA 모이어티의 예는 폴리아르긴, 폴리히스티딘 및 폴리라이신 서열(예를 들어, HH(2His), HHH(3 His), HHHH(4 His), HHHHH(5 His); RRRRRRRR(8 Arg) 및 RRRRRRRRR(9Arg))을 포함한다. 다른 실시형태에서, AA 모이어티는 존재하는 경우 구조식 I'의 증강 펩타이드의 R/K' 아미노산에 커플링되거나 R/K' 아미노산 잔기가 존재하지 않는 경우 아미노산 잔기 x^1에 커플링된 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 양이온성 아미노산에서 종결되는 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0219] 본 발명에 따라서 Lck 활성화제에 존재하는 경우 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 전형적으로 최대 약 40개 아미노산의 길이를 가질 것이다. 적어도 일부 실시형태에서 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 적어도 5개 아미노산 길이(예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40개 아미노산)이다. 적어도 일부 실시형태에서, 증강 펩타이드는 약 25개 이하의 아미노산 또는 약 20, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 이하의 아미노산 길이를 가질 것이다. 특히 바람직한 실시형태에서, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 적어도 9개의 아미노산 길이를 가질 것이다. 또한 이해될 바와 같이, 5 내지 예를 들어, 40개 아미노산의 모든 범위가 본 명세서에 명확하게 제공된다.

[0220] 일 실시형태에서, Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티는 양이온성 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된다.

[0221] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "역전된 서열"은 아미노산 서열이 반전된 것을 의미한다. 예를 들어, RSKAKNPLY의 역전된 서열은 YLPNKAKSR이다. 따라서, 역전된 서열의 아미노산 서열은 반전된 순서로 존재하여, 본래 서열의 N-말단 단부는 역전된 서열의 C-말단 단부가 되고, 본래 서열의 C-말단 단부는 역전된 서열의 N-말단 단부가 된다. 전형적으로, 본 발명의 실시형태에 따라서 사용되는 펩타이드는 단백질분해성 절단에 대해서 보호하기 위해서 적어도 카복시 단부가 아마이드화되거나 이와 유사하게 처리된다. 그러나, 단백질분해성 절단에 대한 보호를 위한 임의의 적합한 N-또는 C-말단 변형이 또한 사용될 수 있다(예를 들어, 메틸화).

[0222] 하기에 추가로 기재된 바와 같이, 증강 또는 다른 펩타이드(A/P)의 아미노산은 L-아미노산 및/또는 D-아미노 아미노산일 수 있다. 따라서, 역전된 서열의 아미노산은 모두 L-아미노산이거나 모두 D-아미노산이며, 용어 "역전된 서열"은 아미노산 모두가 D-아미노산(이들로 제한되지 않음)인 레트로-인버소(retro-inverso) 펩타이드로 확장된다.

[0223] 일 실시형태에서, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr, RSKAK-RRRRRRRRR, r r r r r r r r r - y l p n k a k s r, IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG, RRRRRRRRR-SKAKNPLYR, RRRRRRRRR-YLPNKAKSR, RSKAKNPLY, RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, 분지형 < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR, RRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR, HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH, RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK, RVKVKVVVV-RRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRR, RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH, KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH, RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH 및 KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH.

[0224]

[0225] 또 다른 실시형태에서, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 아미노산 서열 RSKAKNPLY-RRRRR 또는 RSKAKNPLY-

RRRRRR을 포함한다.

[0226] 일 양상에서, 본 발명은 RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

[0227] 또 다른 양상에서, 본 발명은 RSKAKNPLYRRRRRRRRR, rskaknplyrrrrrrrrr, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 rvkvkvvvvrrrrrrrrr로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

표 2

서열 목록의 표

[0228]

서열 ID 번호		아미노산 서열*
서열번호	1	RRRR (IK00400)
서열번호	2	RRRRR (IK00500)
서열번호	3	RRRRRR (IK00600)
서열번호	4	RRRRRRRR (IK00800)
서열번호	5	rrrrrrrr(IKD00800)
서열번호	6	RRRRRRRRR (IK00900)
서열번호	7	RRRRRRRRRR (IK00100)
서열번호	8	RRRRRRRRRRR (IK01200)
서열번호	9	RRRRRRRRRRRRR (IK01400)
서열번호	10	rrrrrrrrrrrrr(IKD01400)
서열번호	11	RRRRRRRRRRRRR-OH (IK014OH)
서열번호	12	RRRRRRRRRRRRRRRRRR (IK00200)
서열번호	13	KKKKKKKKK (10Lys)
서열번호	14	HHHHHHHHHH (10His)
서열번호	15	OrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrn (10 Orn)
서열번호	16	HHH-RRRRRRRR-HHH (IK03930)
서열번호	17	HHHHH-RRRRRRRR-HHHHH (IK05950)
서열번호	18	KKKKKKKK-HHHHHHHHHH (IK00K10)
서열번호	19	RRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK00810)
서열번호	20	RRRRRRRR-HHHHHHHHHH(IK00910)
서열번호	21	DDDDDDDDD(IKD9)
서열번호	22	RRRRRRRR (IK00900)
서열번호	23	DSEAENPLY-DDDDDDDDD(IKDE800)
서열번호	24	RSKAKNPLY-RRRRRRRR-NH2(IK14800)
서열번호	25	RSKAK (IK5000)
서열번호	26	RSKAK-R (IK50100)
서열번호	27	RSKAK-RR (IK50200)
서열번호	28	RSKAK-RRR (IK50300)

서열번호	29	RSKAK-RRRR (IK50400)
서열번호	30	RSKAKNPLY (IK94000)
서열번호	31	RSKAKNPLYR(IK14000)
서열번호	32	RSKAKNPLY-RRRR(IK14300)
서열번호	33	RSKAKNPLY-RRRRR(IK14400)
서열번호	34	RSKAKNPLY-RRRRRR(IK14500)
서열번호	35	rskaknply-rrrrrr (ID94600)
서열번호	36	C-RSKAKNPLY-RRRRRR-C (고리화됨)(IK14500C)
서열번호	37	RSKAK-RRRRRRRRR (IK50900)
서열번호	38	rskaknply-rrrrrrrrrr(IKD14800)
서열번호	39	rrrrrrrrr-ylpnkaksr (IKR81400)
서열번호	40	IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IKM14800)
서열번호	41	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG(IK148MP9)
서열번호	42	RRRRRRRRR-SKAKNPLYR (IK9R94S)
서열번호	43	RRRRRRRRR-YLPNKAKSR (IK9R94Y)
서열번호	44	RSKAKNPLY-KKKKKKKKK (IK94K90)
서열번호	45	RSKAKNPLY-RHHHHHHHHHH(IK14010)
서열번호	46	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH(IK14510)
서열번호	47	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH(IK14810)
서열번호	48	분지형 < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (Br IK14810)
서열번호	49	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH(IK14820)
서열번호	50	HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK11480)
서열번호	51	HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR (IK59514)
서열번호	52	RRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR (IK81140)
서열번호	53	HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK51455)
서열번호	54	RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK (IK94RK0)
서열번호	55	RVKVKVVVV (IK95000)
서열번호	56	RVKVKVVVV-RRRRR(IK15400)
서열번호	57	RVKVKVVVV-RRRRRRRR(IK15700)
서열번호	58	RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)
서열번호	59	RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R (IK80150)
서열번호	60	RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)
서열번호	61	RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH (IK52820)
서열번호	62	KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)
서열번호	63	RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH (IK52820)
서열번호	64	KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH IKB2810
서열번호	65	RSKAKNPLYR-RRRRRRRR-(2Adod)4-NH2(IK14804)
서열번호	66	RVKVKVVVVR-RRRRRRRR-(2Adod)4-NH2(IK15804)

[0229]

[0230] *: 소문자는 우회전성("덱스트로(dextro)") 아미노산을 나타내고; 2Adod는 2-아미노-도데칸산(예를 들어, (S)-2-아미노도데칸산)을 나타내고; 12Adod는 12-아미노-도데칸산(예를 들어, (S)-12-아미노도데칸산)을 나타내고; -OH는 비-아마이드화된 것을 나타낸다.

[0231] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "아미노산 서열(들)"은 전형적으로 아마이드 결합에 의해서 연결된, 아미노산 단량체로 구성된 분자를 지칭한다. 이 용어는 본 개시내용의 방법 및 사용에서 기능성 활성을 유지하는, 이러한 서열의 "전구 약물", 이러한 서열의 하전된 형태 및 비하전된 형태, 이러한 서열의 약제학적으로 허용가능한 염 및 이러한 서열의 임의의 다른 변이체, 유도체 또는 서열의 골격 및/또는 말단에 대한 변형을 포함하는 변형을 포함한다.

[0232] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "서열"은 분자를 형성할 수 있는 아미노산의 수의 최대 길이를 암시적으로 명시하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 일부 실시형태에서, 최대 길이는 10개 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 최대 길이는 9개 아미노산이다.

[0233] 일부 실시형태에서, 서열은 단리되거나 정제된 서열이다.

[0234] 자연 또는 재조합 기술에 의해서 생산된 서열의 "단리" 및 "정제" 방법은 당업계에, 예를 들어, 문헌[C-H Lee,

A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification, Endocrinology and Metabolism; 2017, March; 32(1): 18]에 기재되어 있다. 추가로, 용어 "단리된" 또는 "정제된"은 합성된 서열 및 다른 인공적으로 생산된 서열을 포함한다. 서열의 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 서열은 하나의 아미노산의 카복실기를 또 다른 것의 아미노기에 대해서 축합 반응시킴으로써 화학적으로 합성된다. 서열의 화학적 합성은 용액상 기술 또는 고체상 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 합성 기술은 비천연 아미노산 서열을 혼입한 서열의 생산, 골격 변형 및 D-이성질체의 합성을 가능하게 할 수 있다.

[0235] 일부 실시형태에서, 본 발명의 서열은 변형된다. 일부 실시형태에서, 변형은 서열의 약리학적 특성을 변경시키는 변형일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형은 본 발명의 조성물 또는 서열의 반감기를 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 변형은 서열(및/또는 본 발명의 조성물)의 생물활성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형은 본 발명의 서열 또는 조성물의 선택성을 증가시키는 변형일 수 있다.

[0236] 일 실시형태에서, 변형은 보호기의 첨가이다. 보호기는 N -말단 보호기, C-말단 보호기 또는 측쇄 보호기일 수 있다. 본 발명의 서열은 이들 보호기 중 하나 이상을 가질 수 있다. 당업자는 아미노산을 이들 보호기와 반응시키기에 적합한 기술을 인식한다. 이러한 기는 당업계에 공지된 제조 방법에 의해서 첨가될 수 있다. 이러한 기는 서열에 남아있을 수 있거나 사용 또는 투여 이전에 제거될 수 있다. 보호기는 합성 중에 첨가될 수 있다.

[0237] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드의 아마이드화가 놀랍게도 Lck 활성도를 증가시킨다는 것을 입증하였다. 따라서, 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 제공하며, 여기서 아미노산 서열은 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티 또는 양이온성 아미노산 서열의 C-말단 단부에서 아마이드화되어 있다.

[0238] 또 다른 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 제공하며, 여기서 가장 원위 지방산이 아마이드화되어 있다.

[0239] 본 명세서에 사용된 바와 같이 폴리펩타이드 서열과 관련하여, "NH_2"는 폴리펩타이드가 예를 들어, C-말단에서 아마이드화되어 있는 것을 나타낸다. 예를 들어, C-말단 아미노산 또는 가장 원위 지방산이 아마이드화될 수 있다.

[0240] 본 명세서에 사용된 모든 펩타이드는 (예를 들어, -OH에 의해서) 달리 제시되지 않는 한, 폴리펩타이드 모이어티의 C-말단 단부에서 아마이드화되어 있다.

[0241] 또 다른 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 제공하며, 여기서 아미노산 서열은 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티의 C-말단 단부에서 아마이드화되어 있다.

[0242] *일부 실시형태에서, 서열은 C-말단에 아마이드화되어 있다. 아마이드화는 순차적인 엔도- 및 엑소단백질분해에 의한 글리신-연장된 기질의 N-산화성 절단의 과정을 지칭한다. 아마이드화된 서열을 시험관내에서 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, 효소 아마이드화; 재조합에 의해서 생산된 서열 및 단백질의 C-말단의 화학적 변형; 고체상 서열 합성에서 아마이드 수지를 사용하는 것; 암모니아의 존재 하에서 카복시펩티다제를 사용하는 것; 및 서열의 C-말단을 메틸 에스터로 전환시키고, 저온에서 암모니아를 첨가하는 것을 포함한다. 적합한 기술의 본 개시내용의 예는 문헌[DJ Merkler, *C-terminal amidated sequences: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended sequences and the importance of the amide to bioactivity;* Enzyme Microbial technology, 1994, June; 16(6): 450-6 및 V Cerovsky and M-R Kula *C-Terminal sequences Amidation Catalyzed by Orange Flavedo sequences Amidase;* Angewandte Chemie, 1998, August; 37(13-14): 1885]을 포함한다.

[0243] C-말단의 아마이드화는 비하전된 C-말단 단부를 생성하여, 변형된 서열은 네이티브 단백질을 더 유사하게 모방한다. 이것은 서열이 세포에 도입되는 능력 향상; 생체내에서 서열의 대사 안정성의 개선; 생체내에서 아미노펩티다제, 엑소펩티다제 및 합성효소에 의한 서열의 효소적 분해의 감소; 및 서열의 저장 수명의 개선을 비롯한 일련의 이점을 가질 수 있다.

[0244] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명자들 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 L 또는 D 아미노산을 포함할 수 있고, 생물학적 활성을 가질 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 기재하며, 여기서 아미노산 서열은 L-아르기닌 잔기를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 기재하며, 여기서 아미노산 서열은 D-아르기닌 잔기를 포함한다.

[0245] 당업계에 공지된 바와 같이, 알파 아미노산은 알파 위치에 카이럴 탄소를 포함한다. 결론적으로, 글리신을 제외한, 모든 알파 아미노산은 L- 또는 D-이성질체인 2개의 거울상이성질체로 존재할 수 있다. 일반적으로, L-아미노산 만 포유동물 세포에서 제조되고, 단백질에 혼입된다. D-아미노산은 인공적으로 합성될 수 있거나 박테리아 단백질에서 발견될 수 있다. L 및 D 규칙은 아미노산의 입체화학을 직접적으로 지칭하기 위해서 사용되지 않으며, 오히려, 그것은 아미노산의 배위와 관련하여 사용되며, 아미노산 자체의 광학 활성을 지칭하지 않지만, 오히려 아미노산이 합성될 수 있는 글리세르알데하이드의 이성질체의 광학 활성을 지칭한다(D-글리세르알데하이드는 우회전성이고; L-글리세르알데하이드는 좌회전성이다).

[0246] 적어도 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 RSKAKNPLY, RSKAKNPLYR, RSRARNPLY, RARAKNPLY, KEKLKNPLF, KEKLKNPLFK, RVKVKVVVV, RAKAKAAAA, RAKAKNPLF, RSKAK, RAKAK 및 RVKVK로 이루어진 군으로부터 선택된 펩타이드 활성물질을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

[0247] 다른 실시형태에서, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 역전된 서열 YLPNKAKSR, RYLPNKAKSR, YLPNRARSR, YLPNKARAR, FLPNKLKEK, KFLPNKLKEK, VVVVKVKVR, AAAAKAKAR, FLPNKAKAR, KAKSR, KAKAR 및 KVKVR로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0248] 가장 전형적으로, 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 RSKAKNPLY, YLPNKAKSR, RSKAK 또는 KAKSR을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0249] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드에 대한 적어도 하나의 지방산의 커플링이 놀랍게도 펩타이드에 Lck를 활성화시키는 증가된 능력을 부여하는 것을 입증하였다.

[0250] 따라서, 일부 실시형태에서, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 하나 이상의 연결된 지방산 모이어티(들)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Lck의 활성화제는 4개의 연결된 지방산 모이어티를 포함한다. 이러한 결과는 놀라운 것인데, 그 이유는, 그 자신에 대해서, 1 내지 4개의 연결된 지방산을 포함하는 지방산 모이어티는 Lck를 활성화시키지 않기 때문이다. 일부 실시형태에서, 연결된 지방산 모이어티(들)는 적어도 하나의 아미노-도데칸산 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방산 모이어티 모두가 아미노-도데칸산이다.

[0251] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 하나 초과의 지방산이 구조식 I의 폴리펩타이드 모이어티의 C-말단 단부에서 커플링된다. 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과의 지방산이 구조식 I의 폴리펩타이드 모이어티에 커플링된다.

[0252] 하나의 지방산 쇄의 아미노기 치환체와 그 다음 지방산의 말단 카복실기 사이에 각각의 아마이드 결합을 연속하여 형성하여 커플링된 지방산을 형성함으로써 지방산을 함께 커플링시킴으로써 적어도 하나의 지방산이 제공될 수 있다.

[0253] 따라서, 지방산의 α 또는 β 탄소 상에 아미노기(NH_2) 치환체를 갖는 지방산이 커플링에 특히 적합하다.

[0254] 바람직한 일 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 적어도 4개의 지방산이 활성화제의 C-말단 단부에 커플링된다.

[0255] 또 다른 바람직한 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 가장 먼 지방산이 아마이드화되어 있다.

[0256] 지방산의 커플링은 선형 및/또는 분지형일 수 있다. 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 적어도 4개의 지방산의 커플링은 선형이다. 또 다른 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 적어도 4개의 지방산의 커플링은 분지형이다.

[0257] 상기에 논의된 바와 같이, 지방산 모이어티(들)는 임의의 위치에서 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드에 커플링되어 지질펩타이드를 형성할 수 있다. 그러나, 바람직한 실시형태에서 지방산 모이어티(들)는 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 C-말단 단부에서 커플링된다. 아미노산 서열에 커플링된 지방산 모이어티(들)는 분지형 지방산 또는 선형 지방산일 수 있다.

[0258] 일부 실시형태에서, 지방산 모이어티(들) 중 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개는 선형이다. 예를 들어, 적어도 하나의 지방산의 커플링이 선형인 경우, 일 실시형태에서 적어도 하나의 지방산은 아마이드를 결합을 통해서 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 C-말단 단부에 커플링된다.

[0259] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 '선형'은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 골격에 혼입될 지방산의 탄화수소 쇄를 지칭한다. 예를 들어, 지방산은 오메가 탄소에 아미노기 치환체를 포함할 수 있다. 일 실시형태 12개의 아미노 라우르 지방산 아마이드(예를 들어, 12-아미노도데칸산; 'Adod')가 사용되고, 따라서 아마이드 결합은 탄소 12의 아미노산 치환체와 또 다른 기(예를 들어, 카복실기) 사이에 형성될 수 있다.

[0260] 따라서, 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 지방산의 커플링이 선형인 경우, 제1 지방산이 아마이드 결합을 통해서 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 C-말단 단부에 커플링되고, 지방산의 말단 카복실기와 추가 지방산(예를 들어, 아미노-도데칸산)의 아미노기 치환체 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 추가 지방산이 지방산에 커플링된다. 또 다른 실시형태에서, 추가 지방산의 말단 카복실기와 제3 지방산의 아미노기 치환체 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 제3 지방산이 추가 산에 커플링된다. 또 다른 실시형태에서, 제3 지방산의 말단 카복실기와 제4 지방산의 아미노기 치환체 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 제4 지방산이 제3 산에 커플링된다.

[0261] 하나의 지방산의 말단 카복실기와 또 다른 지방산의 아미노기 치환체 사이에 아마이드 결합를 형성하여 - 지방산 단량체로부터 - Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드에 커플링될 지방산의 선형 중합체 쇄를 형성함으로써 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 C 말단 단부에 임의의 수의 지방산이 커플링될 수 있다.

[0262] 다른 실시형태에서, 지방산의 탄화수소 쇄는 '선형'이 아니고, 예를 들어, 지방산의 탄화수소 쇄 중 전부 또는 일부는 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 골격의 일부가 아니다(예를 들어, Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 골격에 "수직임"). 예를 들어, 지방산은 지방산의 알파 또는 베타 탄소에 아미노기 치환체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서 2-아미노 라우르 지방산 아마이드(예를 들어, 2-아미노도데칸산; 'Adod')가 사용되고, 따라서 아마이드 결합은 탄소 2의 아미노 치환체와 또 다른 기(예를 들어, 구조식 I의 펩타이드 또는 다양이온성 펩타이드의 카복실기) 사이에 형성될 수 있다.

[0263] 본 명세서에 사용된 바와 같이 용어 Adod는 아미노도데칸산을 지칭하고, "2Adod"는 2-아미노 도데칸산을 지칭하며; "12Adod"는 12-아미노도데칸산을 지칭하고 그 등등이다. 하나 초과의 지방산이 커플링되는 경우, 커플링되는 지방산의 수는 아래 첨자로 기재된다. 예를 들어, "$(2Adod)_2$"는 2개의 2-아미노도데칸산을 지칭한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리아마이드 모이어티의 단일 단위는 하나의 2-아미노 도데칸산 잔기(본 명세서에서 "$(2Adod)_1$"이라고도 지칭됨)에 상응한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리아마이드 모이어티의 2개의 단위는 2개의 2-아미노 도데칸산 잔기(본 명세서에서 "$(2Adod)_2$"라고도 지칭됨)에 상응한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리아마이드 모이어티의 3개의 단위는 3개의 2-아미노 도데칸산 잔기 "$(2Adod)_3$"에 상응한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리아마이드 모이어티의 4개의 단위는 4개의 2-아미노 도데칸산 잔기 "$(2Adod)_4$"에 상응한다.

[0264] 다른 실시형태에서, 지방산은 지방산의 또 다른 탄소에 아미노기 치환체를 포함할 수 있다.

[0265] 다른 실시형태에서, 아미노 지방산이 하나 이상의 카이럴 중심을 갖는 카이럴인 경우, 2개의 가능한 거울상이성질체(예를 들어, R 및 S)가 존재할 것이다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드는 아미노 지방산의 하나의 거울상이성질체 또는 다른 거울상이성질체, 또는 하나 이상의 아미노 지방산의 하나 이상의 거울상이성질체를 포함할 수 있다.

[0266] 따라서, 본 발명은 선형 및/또는 비-선형(예를 들어, 분지형 방식으로)으로 커플링된 지방산을 포함하는 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공한다.

[0267] 본 명세서에 사용된 바와 같이 용어 "분지형"은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드의 골격에 '선형'이 아니거나 '수직이도록' 아미노산 잔기 또는 제1 지방산에 커플링될 하나 초과의 지방산을 포함한다.

[0268] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 지방산은 13 내지 21개의 탄소 원자를 함유하는 장쇄 지방산, 6 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 중간쇄 지방산 또는 6개 미만의 탄소 원자를 함유하는 단쇄이다. 바람직한 실시형태에서, 지방산은 약 6 내지 16개 탄소 원자 길이를 포함한다. 예를 들어, 지방산은 6 내지 16개 탄소, 8 내지 14개 탄소 또는 10 내지 12개 탄소를 포함한다.

[0269] 일 실시형태에서, 지방산은 6개의 탄소를 포함하고, 카프로산 또는 헥산산이다. 예를 들어, 일 실시형태에서 지방산은 아미노헥산산이다.

[0270] 또 다른 실시형태에서, 지방산은 8개의 탄소를 포함하고, 카프릴산 또는 옥탄산이다. 예를 들어, 일 실시형태에

서 지방산은 아미노옥탄산이다.

[0271] 또 다른 실시형태에서, 지방산은 10개의 탄소를 포함하고, 카프르산 또는 데칸산이다. 예를 들어, 일 실시형태에서 지방산은 아미노데칸산이다.

[0272] 또 다른 실시형태에서, 지방산은 12개의 탄소를 포함하고, 라우르산 또는 도데칸산이다. 예를 들어, 일 실시형태에서 지방산은 아미노도데칸산(예를 들어, (S)-2-아미노도데칸산)이다. 지방산은 포화되거나 또는 하나 이상의 이중 결합으로 불포화될 수 있다. 바람직하게는, 지방산은 포화된다.

[0273] 일 실시형태에서 본 발명은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 펩타이드는 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 화합물을 추가로 포함하고, 화합물은 적어도 하나의 지방산이다.

[0274] 일 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 적어도 4개의 지방산이 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티의 C-말단 단부에 커플링된다.

[0275] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 하나 초과의 지방산의 커플링은 선형이다.

[0276] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 하나 초과의 지방산의 커플링은 분지형이다.

[0277] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 지방산은 포화된다.

[0278] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 지방산은 카프로산, 카프릴산, 카프르산(데칸산) 및 라우르산(도데칸산)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

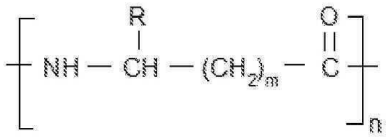
[0279] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 가장 먼 지방산이 아마이드화되어 있다.

[0280] 일 실시형태에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드를 제공하며, 여기서 아미노산 서열은 Lck 활성화 폴리펩타이드 모이어티의 C-말단 단부에서 아마이드화되어 있다.

[0281] 특히 바람직한 실시형태에서, 세포 화합물은 최대 20개 이상의 원자 길이의 포화 또는 불포화 지방족, 지방산, 폴리아마이드 또는 다른 골격을 포함할 수 있는데, 이것은 하나 이상의 측쇄를 가질 수 있다. 전형적으로, 골격 쇄는 약 6 내지 20개 원자 길이(즉, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 원자)의 범위의 길이를 가질 것이고, 하나 이상의 헤테로원자(예를 들어, N, O, S 및 P로부터 독립적으로 선택됨)를 포함할 수 있다. 분지형인 경우, 골격 쇄는 일반적으로1 내지 5개의 측쇄(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 측쇄)를 가질 것인데, 이들 각각은 독립적으로 최대 18개 원자 길이(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개 원자 길이)이다. 전형적으로, 각각의 측쇄는 독립적으로 포화 또는 불포화 지방족 탄소 쇄(예를 들어, C_1 내지 C_{18} 쇄)이다. 가장 전형적으로, 촉진자 모이어티는 지방족 또는 폴리아마이드 골격을 갖는다.

[0282] 적어도 일부 실시형태에서, 화합물은 3 내지 5개의 반복 단위를 갖는 폴리아마이드이고, 각각의 반복 단위는 독립적으로 3 내지 9개 원자 길이(즉, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개 원자 길이)이고, 측쇄를 갖지 않거나 단일 측쇄를 갖는다. 전형적으로, 각각의 반복 단위는 3 내지 6개 원자 길이이고, 보다 전형적으로 3 내지 6개, 3 내지 5개 또는 3 내지 4개 원자 길이이고, 가장 전형적으로, 3개 원자 길이이다. 각각의 반복 단위의 측쇄의 길이는 전형적으로 독립적으로 4 내지 18개의 탄소 원자 길이(즉, C_4-C_{18}), e.g., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개 탄소 원자 길이, 보다 일반적으로 8 내지 18, 8 내지 16, 8 내지 14, 8 내지 12 또는 8 내지 10개 탄소 원자 길이이다. 각각의 반복 단위의 측쇄는 전형적으로 독립적으로 반복 단위의 α 또는 β 탄소 원자로부터 연장된다.

[0283] 전형적으로, 본 발명의 실시형태에 따라서 커플링될 화합물은 하기와 같은 구조식 II의 화합물을 포함한다:

[0284]  구조식 II

[0285] 식 중,

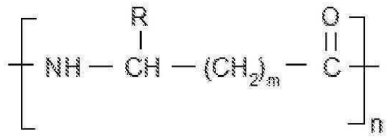
[0286] n은 화합물의 단량체 단위의 수이고, 1 내지 5의 정수이며;

[0287] 각각의 m은 독립적으로 0 내지 18의 정수이고;

[0288] 각각의 R기는 독립적으로 H 또는 C_1 내지 C_{18} 측쇄이다. 전형적으로, 단량체 단위의 R 측쇄의 길이는 단량체 단위의 m의 값과 실질적으로 반비례한다. 일반적으로, 각각의 R기는 독립적으로 18 - m개 탄소 원자 길이일 것이고, m은 0 내지 17의 값을 갖는다. 예를 들어, m이 0이면, R은 C_{18} 측쇄일 것이고, m이 2이면, R은 C_{16} 측쇄일 것이고, m이 4이면, R은 C_{14} 측쇄일 것이고 그 등등이다.

[0289] 전형적으로, n은 구조식 II의 화합물에서 2 내지 5이고; 각각의 m은 독립적으로 0, 1, 2 또는 3이고; 각각의 R은 독립적으로 탄소 쇄이다.

[0290] 전형적으로, 각각의 R은 독립적으로 4 내지 18개 탄소 원자 길이의 탄소 쇄이다. 따라서, 적어도 일부 실시형태에서, 본 발명에 따라서 Lck 활성화제의 화합물은 하기와 같은 구조식 IIa의 폴리아마이드 모이어티(PM)이다:

[0291]  구조식 IIa

[0292] 식 중,

[0293] n은 화합물의 단량체 단위의 수이고, 3 내지 5의 정수이며;

[0294] 각각의 m은 독립적으로 0, 1, 2 또는 3이고;

[0295] 각각의 R기는 독립적으로 4 내지 18개 탄소 원자 길이의 탄소 쇄이다.

[0296] 전형적으로, 구조식 II 또는 구조식 IIa의 화합물에서, 각각의 m은 독립적으로 0, 1 또는 2이다. 가장 전형적으로, m은 0 또는 1이다. 가장 전형적으로, m은 0이다.

[0297] 이해될 바와 같이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 구조식 II의 화합물의 단량체 단위는 화합물의 다른 단량체 단위 중 하나 이상과 상이할 수 있다.

[0298] 구조식 II 또는 구조식 IIa의 화합물/폴리아마이드 모이어티는, 예를 들어, 하나의 지방산 쇄의 아미노기 치환체와 그 다음 지방산의 말단 카복실기 사이에 각각의 아마이드 결합을 연속하여 형성함으로써 각각의 지방산의 R기가 측쇄로서 연장된 폴리아마이드 골격을 제공함으로써, 구조식 $R\text{-}CHNH_2\text{-}(CH_2)_m\text{-}COOH$의 지방산(이것은 도시된 바와 같은 아미노기 치환체를 갖고, R 및 m은 상기에 기재된 바와 같음)을 함께 커플링시킴으로써 제공될 수 있다. 즉, 생성된 폴리아마이드 모이어티의 각각의 단량체 단위의 R기 측쇄는 폴리아마이드 모이어티의 골격이 형성된 각각의 지방산의 나머지이다.

[0299] 지방산의 α 또는 β 탄소 상에 아미노기(NH_2) 치환체를 갖는 지방산이 폴리아마이드 모이어티(PM)의 합성에서 사용하기에 특히 적합하고, 이에 의해서 생성된 폴리아마이드 모이어티는 α 또는 β 폴리아마이드 골격을 갖는다. 가장 전형적으로, 구조식 II의 화합물에서, 각각의 단량체 단위의 m은 0이다. 따라서, 폴리아마이드 모이어티는 지방산 각각의 탄소 원자가 아미노기로 치환된 지방산으로부터 형성될 수 있다.

[0300] 본 발명의 실시형태에서, 각각의 지방산 모이어티는 6 내지 16개의 탄소, 8 내지 14개의 탄소 또는 10 내지 12개의 탄소를 포함한다. 일부 실시형태에서 적어도 하나의 지방산 모이어티는 포화되거나, 불포화되거나 다중불포화(polyunsaturated)된다. 바람직한 실시형태에서, 지방산 중 1개, 2개, 3개 또는 4개는 포화된다. 일부 실시형태에서, 지방산은 카프로산(헥산산), 카프릴산(옥탄산), 카프르산(데칸산) 및 라우르산(도데칸산)으로 이루어

진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 지방산은 도데칸산 (아미노도데칸산/adod)이다.

[0301] 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 Lck 활성화제의 실시형태에서, 구조식 II의 화합물의 각각의 R기의 탄소 쇄는 독립적으로 선형 또는 분지형일 수 있고, 포화되거나 하나 이상의 이중 결합으로 불포화될 수 있다. 전형적으로, 각각의 R기는 포화된 탄소 쇄이다.

[0302] 전형적으로, 구조식 II의 화합물의 각각의 R기는 독립적으로 8 내지 18, 8 내지 16, 보다 바람직하게는 8 내지 14, 가장 바람직하게는, 8 t내지 12개 탄소 원자 길이의 탄소 쇄이다. 가장 전형적으로, 각각의 R기는 독립적으로 8 내지 10개 탄소 원자 길이의 탄소 쇄이다.

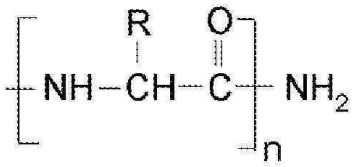
[0303] 따라서, 예를 들어, 2-아미노-카프르 및 라우르 지방산(각각 10개 탄소 원자 길이 및 12개 탄소 원자 길이임)이 본 명세서에 기재된 바와 같은 구조식 II의 화합물을 제공하는 데 사용하기에 특히 적합하다. 이해될 바와 같이, 카프르 지방산의 경우, 구조식 II의 생성된 화합물의 단량체 단위의 R기는 8개 탄소 원자 길이이되, 단 카프르 지방산 쇄 중 탄소 1 및 2(α 탄소)는 화합물의 골격에 혼입되어 있다. 마찬가지로, 라우르 지방산의 경우, 생성된 화합물의 단량체 단위(n=1)의 R기는 10개 탄소 원자 길이이다.

[0304] 구조식 II의 화합물의 R기의 탄소 쇄의 길이는 독립적으로 화합물의 하나의 단량체 단위에서부터 그 다음 단량체 단위까지 달라질 수 있다. 전형적으로, 구조식 II의 화합물의 R기의 탄소 쇄는 서로 동일한 길이다. 구조식 II의 화합물을 제공하는 데 있어서 2-아미노 라우르 지방산 아마이드의 사용이 특히 바람직하다. 따라서, 이러한 예에서 화합물의 각각의 단량체 단위의 R기는 10개 탄소 원자 길이이다.

[0305] 전형적으로, 구조식 II의 화합물에서, n은 3, 4 또는 5이고, 보다 전형적으로 n은 3 또는 4이고, 가장 전형적으로, n은 4이다.

[0306] 그러나, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 구조식 II의 화합물의 모든 변형이 명확하게 포함된다.

[0307] 전형적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 구조식 II의 화합물은 하기 화학식 1에 도시된 바와 같이 아미노기(NH_2)에서 종결된다.

[0308] 

[0309] 화학식 I: 구조식 II의 화합물

[0310] 다른 실시형태에서, 수소 원자 또는 NH_2 이외의 말단 기에서 종결되는 구조식 II의 화합물(화학식 1에서와 같음)이 또한 사용될 수 있고, 본 발명은 생리학적으로 허용 가능한 염을 비롯한, 모든 적합한 생리학적으로 허용 가능한 이러한 화합물을 포함하는 치료제의 사용으로 명확하게 확장된다.

[0311] 본 발명에 따라서 사용되는 구조식 II의 화합물은 예를 들어, NH_2, H, COOH, OH, 할로(예를 들어, F, Cl, Br, I), SH, 알킬, 저급 알킬, 알켄일, 저급 알켄일, OR, NHR' 및 NR'R"로부터 선택된 단부 말단기를 가질 수 있고, 식 중 저급 알킬기, 저급 알켄일기, OR, NHR' 및 NR'R"는 선택적으로 치환되고, R, R' 및 R"는 각각 독립적으로 선택적으로 치환된 저급 알킬 또는 저급 알켄일이다.

[0312] 저급 알킬, 저급 알켄일, OR, NHR' 및 NR'R"기의 선택적인 치환체(들)는 예를 들어, OH, 할로(예를 들어, F, Cl, Br, I), C_1-C_3 알킬(예를 들어, 메틸), COOH 등으로부터 선택될 수 있다.

[0313] "저급 알킬"은 C_1-C_6 알킬(예를 들어, 선형 또는 분지형일 수 있는 메틸, 에틸 또는 프로필기 등)을 의미한다.

[0314] 마찬가지로, "저급 알켄일"은 가장 긴 쇄에 하나 이상의 이중 결합을 포함하는 C_2-C_6 알켄일기를 의미한다.

[0315] *전형적으로, 그러나, 구조식 II의 화합물은 NH_2 또는 COOH기로 종결될 것이다.

[0316] 전형적으로, 그 자체로 본 발명에 따른 Lck 활성화제인 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양이온성 펩타이드(PP)는 적어도 6개의 인접한 양이온성 아미노산을 포함할 것이다. 마찬가지로, 6개 미만의 인접한 양이온성 아미노산 길이를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양이온성 펩타이드는 전형적으로 구조식 I 또는 화합물

(C) 또는 구조식 II의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)에 커플링될 것이다.

[0317] 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 변형된 형태 또는 변이 형태와 야생형 또는 모 펩타이드(예를 들어, RSKAKNPLY) 간의 아미노산 차이는 전형적으로 보존적 아미노산 변화이다. 보존적 아미노산 치환은, 아미노산 잔기가 유사한 입체화학 특성(예를 들어, 구조, 전하, 산도 또는 염기도 특징)을 갖고, 입체배좌 도는 특징적인 생물학적 기능의 목적하는 양상 또는 양상들에 실질적으로 영향을 미치지 않는 또 다른 아미노산으로 대체되는 것을 의미한다. 예를 들어, 산성 아미노산, 예컨대, 아스파트산(D)은 글루탐산 잔기(E)에 의해서 대체될 수 있고, 극성 아미노산, 예컨대, 세린(S)은 또 다른 극성 아미노산, 예컨대, 트레오닌(T) 또는 아스파라긴(N)에 의해서 대체될 수 있고, 그 등등이다.

[0318] 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열 간의 서열 동일성은, 서열이 비교 목적을 위해서 최적으로 정렬된 경우 서열의 각각의 위치의 아미노산을 비교함으로써 결정될 수 있다. 서열의 정렬은 임의의 적합한 프로그램 또는 알고리즘을 사용하여, 예를 들어, 니들만 및 번취 알고리즘(Needleman and Wunsch algorithm)(Needleman and Wunsch, 1970)에 의해서 수행될 수 있다. 50의 갭 생성 페널티 및 3의 갭 연장 페널티를 갖는 디폴트 스코어링 매트릭스와 함께 표준 소프트웨어 프로그램, 예컨대, Wisconsin Package Version 10.1(지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 부분인 GAP을 사용하여 컴퓨터 보조 서열 정렬을 편리하게 수행될 수 있다. 비교를 위해서 아미노산 서열을 정렬하는 다른 방법, 예컨대, 비제한적으로 스미쓰 및 워터만(Smith and Waterman, (1981)) 및 피어슨 및 리프만(Pearson and Lipman (1988))의 알고리즘, 이러한 알고리즘의 컴퓨터 구현(예를 들어, BESTFIT, FASTA 및 BLAST) 및 서열의 수동 정렬 및 조사가 또한 널리 공지되어 있다.

[0319] 본 명세서에 기재된 바와 같은 실시형태에서, Lck 활성화제는 하기 구조식 III 및 구조식 IV에 도시된 바와 같은 다양이온성 펩타이드(PP)의 N-말단 또는 C-말단 단부에 커플링된 상기에 기재된 바와 같은 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드(AP/P)를 포함할 수 있다.

[0320] 다른 실시형태에서, 화합물, 예컨대, 구조식 II의 화합물은 하기 구조식 V 및 구조식 VI에 예시된 바와 같이 다양이온성 펩타이드(PP)의 N-말단 단부 또는 C-말단 단부에 커플링될 수 있다.

[0321] 상기에 기재된 바와 같은 구조식 I의 증강 또는 다른 펩타이드 또는 다른 펩타이드 모이어티가 다양이온성 펩타이드(PP)의 N-말단 단부 또는 C-말단 단부에 커플링된 추가의 다른 실시형태에서, 구조식 II의 화합물 (C)은 하기 구조식 VII 및 구조식 VIII에 예시된 바와 같은 다양이온성 펩타이드(PP)의 N-말단 또는 C-말단 단부 중 나머지에 커플링될 수 있다.

AP/P-PP	구조식 III
PP-AP/P	구조식 IV
C-PP	구조식 V
PP-C	구조식 VI
AP/P-PP-C	구조식 VII
C-PP-AP/P	구조식 VIII

[0322]

[0323] 성분, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드(PP), 화합물(C) 및/또는 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 일반적으로 서로에 직접 커플링되고, 그 경우는 각각의 펩타이드 결합 또는 다른 적합한(예를 들어, 공유 또는 이온성) 결합에 의해서 이루어질 수 있다. 다른 실시형태에서, 다양이온성 펩타이드(PP)는 각각의 링커기(LG)를 통해서 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P) 및/또는 화합물(C)에 커플링될 수 있다. 링커기는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 링커기는 예를 들어, 1 내지 10개 또는 그 초과의 원자(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 원자)의 길이를 포함하거나 이들로 이루어질 수 있고, 여기서 연결 원자 또는 원자 중 하나 이상은 예를 들어, N, S 및 O로부터 독립적으로 선택된 비-탄소일 수 있다. 그러나, 임의의 적합한 링키지 시스템이 사용될 수 있다.

[0324] 상기로부터, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 적어도 일부 실시형태는 지질펩타이드이거나 이를 포함한다.

[0325] 구조식 III 내지 구조식 VIII 중 임의의 것에서 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 구조식 I의 증강 펩타이드의 역전된 서열일 수 있다는 것이 또한 이해될 것이다.

[0326] 더 추가의 실시형태에서, 본 발명에 따른 Lck 활성화제는, Lck 활성제를 표적 세포에 표적화 전달하기 위해서 표적화 모이어티에 Lck 활성화제를 커플링시키기 위해서 링커 모이어티(LM)에 그리고/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다른 Lck 활성화제에 커플링될 수 있다. 링커기는 예를 들어, 하기 구조식 IX 내지 XI에 도시된 바와 같은 구조식 III 내지 VIII 중 임의의 것의 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드(PP) 또는 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)에 커플링될 수 있다.

[0327]

LM-AP/P-PP	구조식 IX
PP-AP/PA-LM	구조식 X
C-PP-LM	구조식 XI
LM-PP-C	구조식 XII
LM-AP/P-PP-C	구조식 XIII
C-PP-AP/P-LM	구조식 XIV
AP/P-PP-LM	구조식 X
AP/P-PP-C-LM	구조식 XI

[0328] 일부 실시형태에서, 링커 모이어티는 Lck 활성화제를 표적화 모이어티에 직접 커플링시킬 수 있다.

[0329] 다른 실시형태에서, 링커 모이어티는 한 쌍의 Lck 활성화제를 함께 커플링시키기 위한 브리징 모이어티를 포함할 수 있고, 여기서 Lck 활성화제는 서로 동일하거나 상이하다.

[0330] 링커 모이어티(LM)는 표적 세포의 표면에서 또는 표적 세포 내의 세포내에서 효소적으로 절단되어 Lck 활성화제(들)를 방출하기 위해서 하기에 예시된 바와 같은 하나 이상의 효소 절단 부위를 암호화하는 아미노산 서열을 선택적으로 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

[0331] 전형적으로, 링커 모이어티는 링커 모이어티를 표적화 모이어티에 커플링시키기 위한 커플링 모이어티를 포함한다.

[0332] 커플링 모이어티는 임의의 적합한 아미노산 또는 표적화 모이어티에 대한 연결을 위한 아미노산 서열, 예컨대, 시스테인(C) 아미노산 잔기(표적화 모이어티에 의해서 제공된 말단 시스테인 잔기와 함께 다이설파이드 브리지를 형성하기 위해서), 라이신 잔기(K), 또는 예를 들어, KAA, CAA(링커 모이어티의 효소 절단 부위(존재하는 경우)로부터 라이신(K) 또는 시스테인(C) 잔기를 이격시키기 위함, 여기서 A는 알라닌 아미노산 잔기임)로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 스페이서 아미노산 서열은 추가로 선택된 표적화 모이어티에 대한 부착을 결정하기 위한 마커로서 작용할 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 커플링 모이어티는 하나 이상의 β 아미노산(예를 들어, KAA 및 CAA의 경우 알라닌 잔기는 β 아미노산일 수 있음)을 포함할 것이다.

[0333] 일 실시형태에서, 커플링 모이어티는 아자이드 모이어티이다.

[0334] 또 다른 실시형태에서, 커플링 모이어티(예를 들어, 아자이드 모이어티)는 다이벤조사이클로옥틴(DBCO)에 커플링된다.

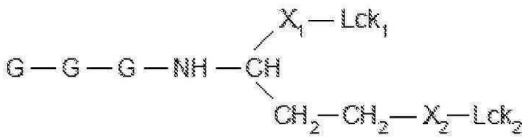
[0335] 링커 모이어티(LM)의 하나 이상의 효소 절단 부위는 카텝신 절단 부위, 예를 들어, GFLGFK(예를 들어, 문헌

[Amino Acids, 2011, 41(2):469-483] 참고), 기질 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase: MMP) 절단 부위(이의 예는 MMP-9 및 MMP-2에 대한 절단 부위를 포함함), 예컨대, GPLGIAGQ, PAGLLGC 및 GPLGLWAQ(예를 들어, 문헌[Kratz F. et al., *Bioorg Med Chem Letters,* 2001, 11:2001-2006] 참고), 전립선 특이 항원(prostate specific antigen: PSA) 절단 부위, 예컨대, KGISSQY 및 SSKYQL(문헌[Kumar SK et al., *Bioorg Med Chem,* 2008, 16(6): 2764-2768; Niemela P et al., *Clin Chem,* 2002, 48(8):1257-1264]) 및 세포내 효소, 예컨대, 글루타티온-s-트랜스퍼라제에 의해서 절단 가능한 다이설파이드 브리지(-S-S-)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 이들 모두의 사용은 본 명세서에 명확히 포함된다.

[0336] 따라서, 링커 모이어티(LM)는, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 커플링 모이어티 및/또는 효소 절단 부위의 다양한 조합을 포함하거나 이들로 이루어지는데, 이것은 특히 GFLGFK, KAAGFLGFK, CAAGFLGFK, GPLGIAGQ, KAAGPLGIAGQ, CAAGPLGGIAGQ, PAGLLGC, KAAPAGLLGC, CAAPAGLLGC, GPLGLWAQ, KAAGPLGLWAQ 및 CAAGPLGLWAQ로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적어도 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 링커 모이어티(LM)는 하나 초과의 효소 절단 부위를 포함할 수 있다.

[0337] 중요하게는, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 펩타이드가 MMP9에 의해서 절단되지 않는다는 것을 입증하였다(데이터 나타내지 않음).

[0338] 본 명세서에 기재된 바와 같은 실시형태에 따라서 링커 모이어티(LM)에 의해서 함께 커플링된 한 쌍의 Lck 활성화제의 예는 하기 화학식 II에 도시되어 있다.



[0339]

[0340] 화학식 II - Lck 활성화제의 예

[0341] 화학식 II에 도시된 이량체 Lck 활성화제는 브리징 모이어티에 의해서 함께 커플링된 Lck 활성화제 Lck1 및 Lck2를 포함한다. 이러한 예에서, 브리징 모이어티는 글루탐산(Glu) 모이어티를 통해서 3개의 글리신(G) 아미노산 잔기의 서열(Gly^3)에 연결되어 하기에 추가로 기재된 바와 같은 소르타제(Sortase) A-매개된 결찰에 의해서 Lck 활성화제를 표적화 모이어티에 커플링시키기 위한 커플링 모이어티를 형성하는 효소 절단 부위 X_1 및 X_2(예를 들어, PSA 및/또는 MMP 아미노산 절단 서열)를 포함한다. 효소 절단 부위 X_1 및 X_2는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. Lck1 및 Lck 2는, 예를 들어, 각각 독립적으로 상기 구조식 III 내지 VIII 중 어느 하나로부터 선택된 Lck 활성화제일 수 있고, 여기서 브리징 모이어티는 예를 들어, 각각의 다양이온성 펩타이드(PP), 증강 모이어티 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 단부에, 또는 이량체의 각각의 Lck 활성화제의 화합물(C)에 커플링된다.

[0342] Gly^3 이외의 커플링 모이어티가 또한 본 발명의 실시형태에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 3 내지 5개 글리신 아미노산 잔기의 서열, 또 다른 아미노산 서열(예를 들어, 3 내지 5개 아미노산 길이), 또는 다른 적합한 링커 쇄를 포함할 수 있다.

[0343] 추가의 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, Lck 활성화제의 이량체 또는 다른 다량체는 덴드리머 또는 다른 적합한 생리학적으로 허용 가능한 스캐폴딩/프레임워크에 의해서 하나 이상의 다른 개별 Lck 활성화제 또는 Lck 활성화제 다량체에 커플링될 수 있다.

[0344] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 세포내로의 도입은 외부 세포막을 통한 확산을 통한 것을 비롯한 다수의 기전을 통해서 또는 예를 들어, 카텝신 효소가 풍부한 리소좀을 통한 것을 비롯한 수용체 매개된 수송 또는 내재화를 통해서 일어날 수 있다.

[0345] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제(들)의 표적화를 위한 표적화 모이어티는 표적화 모이어티, 예컨대, 리간드, 결합 펩타이드, 항체 또는 이의 결합 단편(예컨대, Fab 및 $F(ab)_2$) 또는 세포 표면 또는 표적 세포의 조직 환경에서 발현되는 수용체 또는 다른 분자에 결합하는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 사용하여 달성될 수 있다. 항체 표적화 모이어티의 예는 항-CD3 및 항-CD4 항체(예를 들어, TRX1, Ng CH et al, Pharmaceutical Research, 2006, doi: 10.1007/s11095-005-8814-3), 및 BT-061(Humblet-Baron S & Baron F, Immunology & Cell Biology, 2015, doi:10.1038/icb.2014.120)을 포함한다. 이용될 수 있는 표적화 모이어티는 또한 다른 것

들 중에서도 트랜스페린, 바이오틴, 엽산 및 히알루론산을 포함한다(예를 들어, 전문이 본 명세서에 상호 참조에 의해서 포함된 문헌[Ojima I. *et al., Future Med Chem,* 2012, 4(1):33-50] 참조).

[0346] 예를 들어, HIV(예를 들어, HIV-1)는 T-세포로의 도입을 위해 바이러스 엔벨로프 단백질 gp120을 통해 T-림프구에서 발현된 CD4에 결합한다. CD4에 결합한 후 gp120 단백질의 결과적인 입체배좌 변화는 바이러스가 림프구의 공동 수용체 CCR5 및/또는 CXCR4에 결합할 수 있게 하여 바이러스와 세포의 융합을 가능하게 한다. CD4, CCR5 및 CXCR4는 본 발명에 따른 치료제(들)를 림프구로 전달하기 위해 본 발명의 실시형태에 따라 표적화될 수 있는 세포 표면 수용체의 예이다. 본 발명에 따라 표적화될 수 있는 표적 세포상의 세포 표면 수용체 또는 표면 발현 분자의 다른 예는 CD2, CD3, CD8, CD28 및 CD45(예를 들어, CD45RA, CD45RB 및 CD45RO 아이소폼)를 포함한다.

[0347] 본 발명의 실시형태에 따라서 표적 세포로 치료제(들)를 전달하기 위해 표적화될 수 있는 추가 분자의 예는 인테그린 패밀리의 구성원 및 그의 소단위, 세포간 접착 분자(intercellular adhesion molecule: ICAM) 호르몬 수용체, 신경전달물질 수용체, 수용체 타이로신 키나제 수용체, G-단백질 연결 수용체, 성장 인자 수용체, 막관통 프로테아제 수용체, 세포 표면 프로테오글리칸, CD44, CD55, Fcy 수용체, 암 배아 항원(carcinoembryonic antigen: CEA), 히알루로네이트 수용체, 트랜스페린 수용체, 엽산 수용체, 전립선 특이적 막 항원, 혈관 세포 접착 분자, 매트릭스 단백질, 예컨대, 피브로넥틴, 콜라겐 비트로넥틴 및 라미닌을 포함한다.

[0348] 화학치료제 이발리주맙(이전 TNX-355)(Bruno CJ and Jacobson JM, J Antimicrobial Chemotherapy, 2010, doi: 10.1093/jac/dkq261)은 CD4를 표적화하고, 본 발명에 따라서 암 또는 다른 질환 또는 병태의 치료를 위한 다른 약물과 마찬가지로 본 발명에 따라서 Lck 활성화제(들)를 표적 세포에 전달하기 위한 표적화 모이어티로서 사용될 수 있다. 마찬가지로 CD4(예를 들어, OKT4) 또는 CXCR4에 결합하는 항체 또는 이의 항체 결합 단편이 또한 사용될 수 있다.

[0349] 일부 실시형태에서, Lck 활성화제는 치료 표적화 항체와 함께 개별적으로 투여되거나 항체-약물 접합체(ADC)로서 표적화 항체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 예정사 리간드(Programmed death ligand-1: PD-1) 수용체에 대한 항체 또는 T 세포 활성화 및 IL-2 생산에 대한 이들 수용체의 저해 효과를 저해하는 종양-특이적 T 세포에서 발현되는 세포독성 T -림프구-연관 단백질 4(CTLA4) 수용체, 예컨대, 각각 트레멜리무맙/이필리무맙(Yervoy) 또는 MSB0010718C는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제에 접합되어 이러한 항체에 의해서 표적화된 암, 예컨대, 흑색종, 신장암 및 폐암의 치료에 사용하기 위한 ADC를 형성할 수 있다(Ott PA, OncLive, published online February 21, 2014).

[0350] 저해제로부터 T 세포의 활성화제로의 CTLA-4 수용체의 전환은 Lck 활성화를 통해 그 효과를 매개하는 이중특이적 탠덤 scFv 리간드를 사용하여 이전에 설명되었다(Madrenas J et al, J Immunol, 2004, 172: 5948-5956 and Teft WA et al, BMC Immunology, 2009;doi: 10.1186/1471-2172-10-23, Teft WA et al, BMC Immunology, 2009; doi: 10.1186/1471-2172-10-23). 따라서, scFv의 본 명세에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제에 대한 접합은 본 발명의 실시형태에 따라 T 세포 활성화를 추가로 촉진시킬 수 있다. 추가의 예로서, 당업계에 공지된 이중 특이적 항체는 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 PEG-접합 Lck 활성화제를 예를 들어, CD28과 같은 세포 표면 수용체에 대한 항체에 연결시키는 데 사용될 수 있다.

[0351] 본 발명의 실시형태에서 표적화 모이어티로 사용되는 항체 또는 이의 결합 단편(예를 들어, *Fab, F(ab)*$_2$ 및 Fv 단편)은 바람직하게는 선택된 표적 분자에 대해 특이적일 것이며, 따라서 일반적으로 단클론성 항체 또는 이의 결합 단편을 포함할 것이다. 단클론성 항체 및 이의 결합 단편의 생산은 널리 공지되어 있다. 키메라 및 인간화 단클론성 항체 및 이의 결합 단편이 특히 바람직하다. 예를 들어, 키메라 항체는 표적 분자에 특이적인 비인간 항체의 Fc 영역을 인간 항체의 Fc 영역으로 대체함으로써 제공될 수 있다. 인간화된 항체는 당업계에 또한 공지된 바와 같이 재조합 DNA 기술을 사용하여 비인간(예를 들어, 마우스, 쥐, 양 또는 염소) 단클론성 항체의 Fab 단편의 가변 영역 내의 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 항체 스캐폴드에 스플라이싱함으로써 제공될 수 있다.

[0352] 상기와 같이, 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 이의 다량체 형태, 예를 들어, 2가 scFv(예를 들어, 탠덤 scFv 및 다이아바디), 3가 scFv(트라이아바디) 및 4가 scFv(테트라바디)가 또한 본 발명의 실시형태에서 표적화 모이어티로서 사용될 수 있고, 다이아바디의 사용이 특히 바람직하다. 본 발명의 실시형태에서 유용한 scFv는 2개의 가능한 배향 V_L-AAL-V_H 또는 V_H-AAL-V_L 중 하나로 아미노산 링커 서열(AAL)에 의해서 함께 연결된 인간화된 또는 네이티브 항체 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L) 쇄를 포함할 수 있다. 링커 서열의 길이는 단량체 scFV가 형성될지, 다이아바디가 형성될지, 트라이아바디가 형성될지 또는 테트라바디가 형성될지에 따라서 달라질 수 있다. scFv의 링커 서열(AAL)은 일반적으로 약 5 내지 약 30개 아미노산 범위, 보다 일반적으로 5개 내지 25개 아미노산 범위의 길

이일 것이다.

[0353] 다이아바디의 형성을 위해, 링커 서열은 일반적으로 약 5개 아미노산 길이일 것이고, 이에 따라 scFv는 이량체화되게 된다. 트라이아바디의 경우, 링커 서열은 1개 또는 2개의 아미노산 길이일 수 있다. 생체내 영상화 및 치료에 사용하기 위한 다이아바디를 포함하는 scFv의 설계는 예를 들어, 문헌[Todorovska A. *et al., J Immunol Methods,* 2001, Feb 1; 248(1-2):47-66, Worn A. and Pluckthun A., J. *Mol. Biol.,* 2001, 305, 989-1010, 및 Ahmed Z.A. *et al., Clinical and Developmental Immunology,* Vol. 2012, Article ID 980250, Hindawi Pub. Corp.]에 기재되어 있으며, 이의 내용은 전문이 본 명세서에 상호 참조에 의해 포함된다.

[0354] scFv가 표적화 모이어티로 사용되는 경우, 본 명세서에 기재된 각각의 Lck 활성화제는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 효소 절단 부위를 포함하는 링커 모이어티를 통해 이의 V_H 및/또는 V_L 쇄의 유리 단부에 커플링될 수 있다. 즉, 본 명세서에 기재된 2개의 Lck 활성화제는 scFv에 결합될 수 있으며, Lck 활성화제 중 하나는 V_H 쇄의 유리 단부에 결합되고, 다른 하나는 V_L 쇄의 유리 단부에 결합되며, 여기서 Lck 활성화제는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0355] 마찬가지로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 임의의 적합한 방식으로 상기에 기재된 바와 같은 하나 이상의 효소 절단 부위를 전형적으로 포함하는 링커 모이어티를 통해 항체, 이의 결합 단편(들) 또는 다른 표적화 모이어티에 커플링될 수 있다.

[0356] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제는 재조합 DNA 기술을 사용하여 표적화 모이어티 자체(예를 들어, 항체, 항체 결합 단편, 또는 scFv)에 통합되어 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, Lck 활성화제는 Lck 활성화제의 각각의 단부에서 효소 절단 부위(들)(예를 들어, 카텝신 절단 부위)를 포함하는 각각의 커플링 모이어티에 의해 표적화 모이어티에 커플링될 수 있으며, 이는 각각의 단부에서 Lck 활성화제를 표적 모이어티에 연결한다. 이러한 실시형태에서, Lck 활성화제는 표적화 모이어티의 결합 또는 표적화 기능을 손상시키지 않고, 사용 중에 효소 절단 부위의 절단을 허용하는 표적화 모이어티의 임의의 적절한 위치에 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 각각의 Lck 활성화제는 scFv의 결합 또는 표적화 기능의 보유와 함께 상기에 기재된 방식으로 scFv의 V_H 및 V_L 쇄 중 하나 또는 둘 다에 삽입될 수 있으며, 여기서 예를 들어, Lck 활성화제는 MMP 및 PSA 절단 서열로부터 선택된 효소 절단 서열이 측접된다. 다른 αV-연관 β 인테그린 소단위가 아닌 β6 인테그린 소단위를 특이적으로 표적으로 하는 17량체 펩타이드(즉, VPNLRGDLQVLAQKVA)는 예를 들어, 암배아 항원(CEA)과 반응성인의 뮤린 scFv인 MFE-23의 CDR H3 루프에 삽입되어 있다.

[0357] 표적 조직 또는 표적 세포 표면 상의 상이한 부위를 표적화하기 위해 또는 표적 세포에 면역 효과기 세포를 동원하기 위한 수단으로서 하나 이상의 표적화 모이어티를 사용하는 이중특이적 표적화 프로토콜이 본 발명에 명확하게 포함된다(예를 들어, 이중특이적 항체 표적화는 최근 문헌[Weidle UH. *et al., Cancer Genomics & Proteomics,* 2013, 10: 1-18]에 의해 검토되어 있음). 즉, 본 명세서에 기재된 바와 같은 단일 Lck 활성화제는 상이한 표적 분자를 서로 표적화하기 위해 2 개의 상이한 표적화 모이어티를 혼입할 수 있다. 예로서, HER2 및 CD4와 같은 2개의 상이한 표적 분자를 표적화하기 위한 이중특이적 탠덤 bi-scFv가 예를 들어, 각각의 V_H 쇄와 V_L 쇄의 쌍 사이에 하나 이상의 효소(예를 들어, MMP 및/또는 PSA) 절단 서열(들)과 함께 제공될 수 있다.

[0358] 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양이온성 펩타이드 및 선택적으로 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)를 포함하고 본 명세서에 기재된 표적화 모이어티 및/또는 커플 링 모이어티가 있거나 없는 키메라 단백질(즉, 융합 단백질) 형태의 Lck 활성화제가 본 발명의 방법에서의 사용과 같이 명확하게 포함된다.

[0359] 예를 들어, 노화에 따라 세포 면역 반응이 감소한다는 것은 널리 공지되어 있다. 특히, 림프구 증식은 노인 환자의 T 림프구에서 현저하게 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 Lck 활성도의 현저한 감소와 관련이 있음을 보여준다(Fulop T Jr et al, Experimental Gerontology, 1999, 34(2): 197-216). 따라서, 특정 Lck 활성화제의 예방적 투여는 노인에서 쇠약성 감염의 유병률 또는 중증도를 예방하거나 감소시키는 데 특히 유용할 수 있다. 더욱이, 적절한 T 세포 면역 반응의 손실은 다수의 타이로신 키나제를 표적으로 하는 암 요법과 관련된 면역 억제를 극복하기 위해 Lck 활성화제의 조합 사용의 필요성을 강조하는 암 화학요법의 부작용이다. Lck 활성화는 항암 약물에 대한 약물 내성을 극복하고, 급성 백혈병 및 비호지킨 림프종에서 세포 주기 진행을 저해하는 데 잠재적인 역할을 할 뿐만 아니라 광범위한 병원성 감염(바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물 및 기생충)뿐만 아니라 Lck 결핍과 관련된 다양한 장애)의 관리와 관련이 있다.

[0360] 면역계의 T 림프구 세포는 흉선에 의해 생산되며, 특정 조직, 예컨대, 피부, 림프절 및 입, 폐기도, 장, 질과

같은 점막 조직과 같은 특정 조직에서 순환하고 존재할 수 있다. 상피내 T 세포는 항상성 및 악성종양으로부터의 보호에서 중추적인 역할을 한다. 상피 조직, 예컨대 피부, 장, 폐는 지속적으로 환경에 노출되며 침입하는 미생물에 대한 1차 방어선을 형성한다. 마우스에서 상피내 T 세포(Lck를 발현하는 것으로 공지됨)의 부재는 종양 거부에 결함을 유발한다. 특히, 흑색종을 포함한 상피 악성 종양의 하향 조절을 위해서 상피 내에 이러한 T 세포의 존재가 필요하다(Girardi M et al, Science, 2001, 294(5542): 605-9; Schon MP et al, J Invest Dermatology, 2003, 121: 951-962). 흉선 내에서 이러한 조직 특이적 T 세포의 성숙은 Lck 의존적이며, 세포는 병원성 감염 및 이의 병리학적 영향(예를 들어, 말라리아)으로부터 보호하는 데 기여한다(Inoue S-I et al, PNAS USA, 2012, 109: 12129-12134). 또한, 감마 델타(γ/δ) T 세포는 원생 동물 기생충, 박테리아 및 바이러스에 의한 감염에 대한 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. 이러한 T 세포의 조직특이적 국지화는 피부의 면역 감시를 위한 요구 사항이다(Jamieson JM et al, Frontiers in Bioscience, 2004, 9: 2640-2651; Schon MP et al, J Invest Dermatology, 2003, 121: 951-962).

[0361] 몇몇 T 세포주에서 활성화된 Lck 단백질은 항원 자극 없이 T 세포 활성화의 특징인 인터류킨-2(IL-2) 생산을 자극하는 것으로 밝혀져 있다(Luo K, and Sefton BM, Mol Cell Biol, 1992, 12(10): 4724-4732).

[0362] 조절 T 세포(Treg)는 감마/델타 T 세포와 다른 T 세포의 하위 집합이며, 암에 대한 면역 반응을 억제하는 데 중요한 역할을 한다. Treg는 IL-2R 알파 및 전사 인자 FOXP3의 구성적 발현에 의해 인식되는 말초 CD4 + T 세포 풀의 5 내지 10%를 차지한다.

[0363] 종양 침윤 림프구 내에 FoxP3 Treg의 존재는 다양한 유형의 인간 암에서 불량한 예후와 상관 관계가 있는 것으로 공지되어 있고, IL-21은 T 세포 반응을 촉진시키고, 면역계에 대한 Treg-매개된 억제 효과를 상쇄하는 능력으로 인해 항-종양 면역을 촉진시킨다(Kannappan V et al, Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(5): 637-645).

[0364] 본 발명자들은 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 세포로부터 IL-21 분비를 증가시킨다는 것을 입증하였다(예를 들어, 도 28). 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 생체외 또는 생체내에서 Treg의 수를 감소시킬 가능성이 있다. 실제로, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 시험관내에서 Treg를 감소시킨다는 것을 입증하였다.

[0365] 중요하게도, 본 발명자들은 놀랍게도 본 명세서에 기재된 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드가 Lck를 선택적으로 활성화시키고, 다른 Src 패밀리 키나제를 활성화시키지 않음을 입증하였다. 예를 들어, 도 2는 Blk, cSrc, Fgr, Fyn, Hck, Lyn 및 Yes가 본 명세서에 기재된 Lck를 활성화시키기 위한 펩타이드에 의해 활성화되지 않음을 입증한다.

[0366] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 Lck 키나제를 본 명세서에 기재된 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, Lck 키나제의 활성도를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0367] 일 실시형태에서 펩타이드를 포함하는 펩타이드 또는 약제학적 조성물이 대상체에게 투여되어 생체내에서 Lck의 활성도를 증가시킨다.

[0368] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "활성도 증가" 및 "활성화시킨다"는 일반적으로 키나제의 활성도, 예컨대, 포스포트랜스퍼라제 활성도의 증가를 지칭한다(예를 들어, Lck 키나제의 Y394 포스포릴화의 증가). 예를 들어, 키나제의 효소 활성 활성화는 활성제의 부재 하에서의 동일한 활성도와 비교하여 활성제의 존재 하에서의 키나제의 활성도의 증가를 의미한다. 이 용어는 단백질 키나제를 활성화시키는은 또한 자가포스포릴화의 증가, 활성화 시 하나의 세포 내 위치에서 다른 위치로의 이동 증가, 주어진 위치에 키나제를 고정하는 하나 이상의 단백질에 대한 결합 또는 방출의 증가, 또는 다른 활성도 또는 단백질 키나제의 기능의 증가를 포함한다. 이러한 증가는 단백질 키나제와 단백질 키나제의 결합 파트너 사이에 복합체가 형성될 확률을 증가시키거나 표적에 결합된 후 키나제의 활성도를 증가시키는 것을 포함하는(이에 제한되지 않음) 임의의 수단에 의해 발생할 수 있다. 이러한 활성화는 생체내 또는 시험관내에서 일어날 수 있다.

[0369] 키나제의 효소 활성도는 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어, 문헌[Parker, Law, et al., (2000), Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays, J. Biomolec. Screening 5(2): 77-88; Bader et al. (2001), Journal of Biomolecular Screening 6(4): 255-64); Liu, F., X. H. Ma, et al. (2001). "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(20): 11062-8; Evans, D. B., K. B.

Rank, et al. (2002). "A scintillation proximity assay for studying inhibitors of human Tau protein kinase II/Cdk5 using a 96-well format." Journal of Biochemical & Biophysical Methods 50(2-3): 151-61]에 개시된 방법에 의해서 모니터링될 수 있다.

[0370] 이러한 표준 방법을 사용하여 관심대상 키나제를 함유하는 샘플은 적절한 조건 하에서 방사성 ATP 및 적절한 조성의 합성 펩타이드 기질에 노출되어 포스포릴화를 위한 부위를 제공한다. 이어서, 펩타이드와 새로 회합된 방사성 포스페이트를 측정한다. 기질 펩타이드에 공유 연결된 바이오틴과 같은 화학적 모이어티의 첨가는 스트렙타비딘-코팅된 비드에 의한 기질 펩타이드의 결합을 허용한다. 비드-결합된 펩타이드를 분리하여, 연관된 방사능을 측정할 수 있거나, 바람직하게는 기질 펩타이드와 연관된 방사능은 섬광 근접 검정(scintillation proximity assay)에 적합한 비드를 사용하여 직접 측정될 수 있다.

[0371] 펩타이드 기질의 포스포릴화는 포스포 특이적 항체의 직접 결합을 통해 또는 경쟁 포스포 펩타이드에서 포스포 특이적 항체의 변위를 측정하여 검출할 수도 있다(예를 들어, 문헌[Parker, Law et al., 2000, Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand binding and kinase/phosphatase assays, J. Biomolec. Screening 5(2): 77-88)] 참고) 형광 방법, 예컨대, 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer: FRET) 또는 형광 편광(fluorescence polarization: FP)을 사용하여 특정 포스포펩타이드-항체 복합체를 검출할 수 있다. 이러한 방법은 결합된 종의 단리에 의존하지 않고 용액의 특이적 결합으로 인해 발생하는 형광 변화에 의존하는 "균질" 검출을 사용한다는 장점이 있다.

[0372] 포스포 특이적 항체를 생산하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 일 실시형태에서, 미국 특허 출원 제09/419,379호(발명자: Bibb 등, 발명의 명칭:"Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signalling", 출원일: 1999년 10월 15일) 및 제09/687,959호(발명자: Bibb 등, 발명의 명칭: "Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signalling", 출원일: 2000년 10월 13일)(이들 각각은 전체가 본 명세서에 참조에 의해 포함됨)는 포스포릴화된 표적에 대한 특이성을 갖는 포스포릴화 상태-특이적 항체를 생산하기 위해 사용된다.

[0373] 포스포세린, 포스포트레오닌 또는 포스포타이로신에 대한 포스포릴화 상태 특이적 항체는 상업적으로 입수 가능하다. 이러한 항체는 단백질이 일반적으로 포스포릴화되는지 여부 및 어느 잔기에 존재하는지를 결정하는 데 유용하다. 이러한 항체는 상업적 공급원에서 입수할 수 있다(예를 들어, 산타 크루즈 바이오테크놀로지사(Santa Cruz Biotechnology Inc.), 시그마 RBI사(Sigma RBI), 스트라타젠사(Stratagene), 업스테이트 바이오테크놀로지사(Upstate Biotechnology) 및 지메드사(Zymed)를 비롯한 상업적 공급원의 목록에 대해서는 문헌[Smith, The Scientist 15[4]:24, Feb. 19, 2001] 참조).

[0374] 형광 공명 에너지 전달(FRET)은 거대분자의 특이적 결합을 검출할 수 있는 균질 분석에 널리 사용된다. FRET는 광을 방출하지 않고 에너지를 근처의 "수용자" 형광단으로 전달하는 여기된 "공여자" 형광 분자(형광단)의 능력에 의존한다. 따라서, 기질 표적에 결합하여 2개의 형광단이 공간에 함께 모일 때, 정상 공여 파장에서 방출되는 형광이 감소하고 수용자 형광단에 의해 방출되는 형광이 증가한다. 공여자 형광의 감소 또는 수용자 형광의 증가는 결합 이벤트를 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0375] 키나제 활성을 평가하기 위한 적절한 방법은 Bader 등의 문헌(2001, A cGMP-dependent protein kinase assay for high throughput screening based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer, Journal of Biomolecular Screening 6(4): 255-64))에 개시된 방법을 포함하며, 이를 사용하여 포스포 다이에스터라제, 키나제 또는 단백질 포스파타제의 활성을 결정한다. Bader 등은 당업자에게 인지될 바와 같이 포스포다이에스터라제 또는 단백질 포스파타제의 검정에 적합할 수 있는 시분해 형광 공명 에너지 전달(time-resolved fluorescence resonance energy transfer: "FRET")에 기초한 고속대량 스크리닝(high throughput screening)을 위한 cGMP-의존적 단백질 키나제 분석을 개시한다. 관심대상 키나제를 함유하는 샘플은 키나제 특이적 포스포릴화 부위 및 아미노 말단 바이오틴 모이어티가 있는 ATP 및 합성 펩타이드 기질에 노출된다.

[0376] 포스포릴화된 펩타이드는 알로피코사이아닌 표지된 스트렙타비딘, 포스포펩타이드 특이적 항체 및 유로퓸 킬레이트 표지된 2차 항체를 사용하여 검출된다. 포스포릴화된 기질 분자에 대한 스트렙타비딘 및 포스포 특이적 항체의 동시 결합은 2차 항체 상의 유로퓸 킬레이트 "공여자"를 알로피코사이아닌 형광단 "수용자"에 충분히 가깝게 하여, 615nm에서 유로퓸 방출 감소 및 665nm 파장에서 알로피코사이아닌 방출 증가로서 측정 가능한 형광 공명 에너지 전달이 일어나도록 한다. 유로퓸-알로피코사이아닌 공여자-수용자 쌍은 여기된 유로퓸의 긴 형광 수명을 활용하기 위해 일반적으로 사용되기 때문에 신호는 "시간 분해"된다.

[0377] 쿠마린 및 플루오레세인 아이소티오사이아네이트와 같은 다른 형광단 쌍을 사용할 수 있다. 형광 공명 에너지 전달(FRET)에 관여할 수 있는 그러한 분자 쌍을 FRET 쌍이라고 한다. 에너지 전달이 일어나기 위해서는 공여자 분자 및 수용자 분자가 전형적으로 인접해야 한다(최대 70 내지 100 A(Clegg, 1992, Methods Enzymol. 211:353-388; Selvin, 1995, Methods Enzymol. 246: 300-334). 에너지 전달 효율은 공여자 분자와 수용자 분자 사이의 거리에 따라 급격히 떨어진다. FRET에서 일반적으로 사용되는 분자는 플루오레세인, 5-카복시플루오레세인(FAM), 2'7'-다이메톡시-4'5'-다이클로로-6-카복시플루오레세인(JOE), 로다민, 6-카복시로다민(R6G), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA), 6-카복시-X-로다민(ROX), 4-(4'-다이메틸아미노페닐아조) 벤조산(DABCYL) 및 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설폰산(EDANS)을 포함한다.

[0378] 형광단이 공여자인지 수용자인지 여부는 여기 및 방출 스펙트럼과 쌍을 이루는 형광단에 의해 정의된다. 예를 들어, FAM은 파장이 488nm인 광에 의해 가장 효율적으로 여기되고, 500 내지 650nm의 스펙트럼 및 525nm의 최대 방출을 갖는 광을 방출한다. FAM은 JOE, TAMRA 및 ROX와 함께 사용하기에 적합한 공여자 형광단이다(모두 514 nm에서 여기 최대값을 가짐).

[0379] 형광 편광 측정은 포스포다이에스테라아제, 단백질 키나제 또는 포스파타제의 활성을 측정하는데도 사용할 수 있다(예를 들어, 문헌[Parker, Law et al., 2000, Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays, J. Biomolec. Screening 5(2): 77-88; Turek et al., 2001, Anal. Biochem. 299: 45-53] 참고).

[0380] 형광의 작은 포스포펩타이드에 대한 큰 특이적 항체의 결합은 텀블링 속도가 느려지고 형광 편광 신호가 증가한다. 따라서 형광 편광은 결합된 형광 포스포펩타이드의 양에 비례한다. 이러한 검정은 고정된 농도의 형광 펩타이드와 항체가 생물학적 샘플에 첨가되고 비형광인 단백질 또는 포스포펩타이드의 존재가 신호 감소로 기록되는 경쟁 모드에서 사용할 수 있다. 또한 포스페이트 첨가 (예를 들어, 키나제에 의한) 또는 예를 들어, 포스파타제에 의한 제거가 항체 결합 및 따라서 분극 신호를 조절하는 직접 결합 모드에서 사용될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 형광 편광 분석은 Turek 등의 방법(2001, Anal. Biochem. 299: 45-53)을 사용하여 수행되며, 여기서 생성물 특이적 항-포스포릴화 펩타이드(예를 들어, 항-포스포-세린) 항체가 사용된다.

[0381] 키나제 활성을 평가하기 위한 다른 적합한 방법은 포스포릴화에 대한 세포 기반 검정을 포함한다. 예를 들어, 단백질 포스포릴화에 기반한 신호 전달은 생체내에서, 예를 들어, Sato 등에 개시된 방법(2002, Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells, Nature Biotechnology 20(3): 287-94)과 같은 방법을 사용하여 형광 지표를 사용하는 단일 살아있는 세포에서 시각화된다. 이러한 센서는 가요성 링커로 분리된 2개의 형광단백질 분자로 구성된다. 링커 펩타이드는 포스포릴화 부위 및 인단백질 인식 요소를 포함한다. 링커의 포스포릴화는 2개의 형광단백질을 근접하게 만드는 입체배좌 변화를 일으켜 FRET가 발생하고, 시스템의 형광 출력을 변경시킨다.

[0382] Lck 유전자 이상 및 질환

[0383] 다수의 인간 질환은 Lck 유전자좌의 이상으로 인해 발생하며, 하나의 예는 T-세포 급성 림프모구성 백혈병이다(Converse PJ, 2003 Sept 24. Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase; Lck. Online Mendelian Inheritance in Man., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=153390.in). 또한, AML과 관련된 대부분의 DNA 변화는 출생 전에 유전되는 것이 아니라 평생 동안 발생한다. 이러한 후천적 변화 중 일부는 방사선 또는 암을 유발하는 화학 물질과 같은 외부 원인이 있을 수 있지만, 대부분의 경우 발생 원인은 알려져 있지 않다(http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-what-causes).

[0384] 면역 반응에서의 IL-2/IL-2R 알파(CD25) 축

[0385] 만성 감염 및 암에서, T 세포는 지속적인 항원 및/또는 염증 신호에 노출된다. 이 시나리오는 종종 T 세포 기능의 저하: "고갈"이라고 불리는 상태와 연관된다(Wherry EJ & Kurachi M, Nature Reviews Immunology, 2015, 15: 486-499). 고갈된 T 세포는 강력한 효과기 기능을 잃어버리고, 신호전달 면역관문, 예컨대, PD-1, LAG3, CD160 또는 2B4에서 다중 저해 수용체를 발현하며, 변경된 전사 프로그램에 의해 정의된다. 그러나, 고갈된 T 세포의 재활성화는 HIV-1, C형 간염 바이러스와 같은 지속적인 감염 및 암에 대한 새로운 치료 표적을 제공하는 면역을 재활성화할 수 있다(상기 문헌[Wherry & Kurachi] 참고).

[0386] 초기 활성화 시, CD8 + T 세포는 IL-2의 버스트(burst)를 생산하지만, 이어서 일시적인 불응성 단계에 들어가고, 그 동안 일부 효과기 기능을 유지하지만 IL-2를 생산하는 능력을 잃어버린다. 이 기간 동안, CD8+ T

세포는 계속되는 증식 및 완전한 기능 능력 회복을 위해서 CD4+ T 세포에 의해서 제공되는 외인성 IL-2에 의존적이다(문헌[Cox MA et al, Trends Immunol, 2001, 32(4): 180-186)에서 검토됨). IL-2는 CD24(IL-2Rα), CD122(IL-2Rβ) 및 감마 소단위로 구성된 삼량체 수용체를 통해 신호를 전달한다. CD25는 구성적으로 발현되지는 않지만, IL-12 및 IL-2 자체와 같은 염증성 사이토카인에 노출된 후 상향조절되는데, 이것은 CD25 발현의 양 및 지속 시간을 조절하고, 결국 IL-2 의존적 신호를 수신하는 반응 세포의 능력을 제어함으로써 T 세포의 효과기 및 기억 풀의 형성에 영향을 준다(상기 Cox 등의 문헌 참고).

[0387] CD4+ T 세포는 IL-2의 주요 생산자이며, CD8+ T 세포와 협력하여 반응의 초기 확장뿐만 아니라 보호 2차 반응을 도출할 수 있는 지속적인 기억 세포의 형성을 촉진한다. 중요하게는, CD4+ T 세포에 의한 IL-2의 분비는 반응하는 CD8+ T 세포에 의한 CD25 발현을 상향조절하고, 또한 $CD25^+$ CD8+ T 세포의 증식을 증가시키는 IL-2의 공급원을 제공한다(상기 문헌[Cox et al, Obar JJ et al, PNAS USA, 2010, 107(1): 193-198] 참고). 더욱이, IL-2는 외인성 자극의 부재 하에서 CD25-음성 T 림프구 상에서 IL-2 수용체의 알파 쇄의 용량-의존적 발현을 야기한다는 것이 입증되어 있다(Sereti I et al, Clin Immunol, 2000, 97(3): 266-76). 결과적으로, $CD4^+$ T 세포 또는 CD8+ T 세포 상에서의 CD25 발현의 부재는 병원성-특이적 반응의 확장 단계를 제한한다. 따라서, CD25와 같은 사이토카인 수용체 발현의 조절은 세포가 더 강한 IL-2 신호를 제공받는 것을 허용하는 CD25의 더 높은 발현을 갖는 효과기 세포 생성의 속도제한 단계일 가능성이 있다(상기 Cox 등의 문헌 참고).

[0388] 만성 패혈증 및 암에 대한 반응으로 효과기 및 기억 세포 기능을 조절하는데 있어서 CD25 발현의 중요성 외에도, CD25-발현 CD8+ T 세포는 또한 노년기에 강력한 기억 세포로 밝혀졌으며 노인에서 이러한 세포의 축적은 노년기에 미경험 T 세포의 부재 하에서 온전한 면역 반응의 전제 조건인 것으로 보인다(Herndler-Brandstetter D et al, J Immunology, 2005, 175: 1566-1574). 이러한 발견은 노인 집단에서 면역-적격 CD8+ $CD25^+$ 기억 T 세포의 장기간 생존을 지지하기 위한 새로운 백신접종 접근법의 제안을 제기하였다(상기 Herndler-Brandstetter 등의 문헌 참고).

[0389] 본 발명자들은 본 명세에 기재된 펩타이드가 인간 PBMC 및 CD4+ T 세포(실시예 15, 도 17) 및 CD8+ T 세포(실시예 28, 도 25)에서 IL-12RB2 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL-12R 및 IL-12의 생리학적 효과를 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0390] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-12 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0391] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-12 분비 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-12 분비 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)으로부터의 IL-12 분비 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0392] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단에서 IL-12R 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0393] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단에서 IL-12R 발현 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단에서 IL-12R 발현 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서 IL-12R 발현 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0394] 일 실시형태에서, IL-12R는 IL-12RB1 및/또는 IL-12RB2이다.

[0395] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포에서 IL-12 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0396] 일 실시형태에서, IL-12에 대한 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준은, IL-12에 대한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준을, 본 명세서에 기재된 바

와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 IL-12에 대한 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 반응성의 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0397] 바람직한 실시형태에서, 세포는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 NK 세포이다.

[0398] 상기에 논의된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법은 세포 또는 세포의 집단에서, 생체내에서(예를 들어, 대상체에서) 또는 시험관내에서(예를 들어, 생체외에서) 수행될 수 있다.

[0399] 만성 바이러스 감염 또는 종양 보유 상태 동안, T 세포 기억 형성 및 기능은 효과기 기능의 단계적 손상 및 궁극적으로 숙주 보호를 부여하는 능력에 영향을 미치는 반응하는 항원-특이적 T 세포의 증식 능력으로 인해서 실질적으로 변경된다(Jin H-T et al, BMB Reports, 2011, 44(4): 217-231). 종양 환경에서 CD8+ 종양-침윤 림프구(TIL)는 낮은 수준의 CD25(IL-2R 알파) 발현을 나타내고, 따라서 IL-2 신호 전달에 불응성인데, 이는 증식할 수 없고, 효과기 사이토카인을 생성하고, 기능성 기억 세포으로 분화할 수 없음을 나타낸다(Mumprecht S et al, Blood, 2009, 114: 1528-1536). 예를 들어, CML-특이적 CD8+ T 세포는 레트로바이러스 -유도 뮤린 CML 모델에서 효과기 사이토카인, 예컨대, IFN-γ, TNFα 및 IL-2의 생산 감소를 나타낸다(상기 Mumprecht 등의 문헌 참고).

[0400] CD25 발현은 NK 세포의 세포독성 활성도와 양의 상관관계가 있다. 본 발명자들은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 또한 루이스 폐암 마우스의 비장세포에서 NK 세포에 대한 CD25의 상대적 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다(데이터 나타내지 않음).

[0401] 따라서, 일 양상에서, 본 발명은 세포독성 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포독성 세포 또는 세포독성 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0402] 일 실시형태에서, 본 발명은 T 세포의 고갈을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0403] 용어 "고갈"은 다수의 만성 감염 및 암 동안 발생하는 지속적인 TCR 신호전달로부터 발생하는 T 세포 기능장애의 상태로서 T 세포 고갈을 지칭한다. 이것은 불완전하거나 결핍된 신호 전달을 통해 발생하는 것이 아니라 지속적인 신호 전달로 인해 발생한다는 점에서 아네르기(anergy)와 구별된다. 이것은 불량한 효과기 기능, 저해 수용체의 지속적인 발현 및 기능성 효과기 또는 기억 T 세포와 구별되는 전사 상태로 정의된다. 고갈은 감염 및 종양을 최적으로 제어할 수 없다. 고갈은 외인성 음성 조절 경로(예를 들어, 면역조절 사이토카인)뿐만 아니라 세포 내인성 음성 조절(공자극성) 경로 (PD-1, B7-H3, B7-H4 등) 모두에서 발생할 수 있다. 일 실시형태에서, 고갈의 감소 수준은 적어도 10%, 대안적으로 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%이다. 고갈을 측정하는 방식은 당업자에게 공지되어 있다.

[0404] 일 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포 집단의 고갈 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 T 세포 또는 T 세포 집단의 T 세포 기능의 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 T 세포 또는 T 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 T 세포 기능의 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0405] 항원 및/또는 염증이 제거되는 급성 감염 설정에서, 효과기 CD8+ T 세포는 여러 사이토카인(IFN-γ, TNFα 및 IL-2)을 생성할 수 있는 기능성 기억 CD8+ T 세포로 더욱 분화하고, 2차 감염 시 강력한 리콜 반응을 나타낸다. 대조적으로, 만성 감염 동안, 항원 및 염증은 효과기 단계 후에도 지속된다. 감염이 계속되고 T 세포 자극이 계속됨에 따라 T 세포는 계층적 방식으로 효과기 기능을 상실하고 고갈된다. 전형적으로 IL-2 생산 및 사이토카인 다기능성 및 높은 증식 능력과 같은 기능은 조기에 상실된다. 그 후에 IFN-γ 및 TNFα 생산 결함이 이어진다. T 세포 고갈은 또한 상기에 제시된 저해 수용체의 양 및 다양성의 점진적인 증가를 동반하며, 이들 각각의 리간드에 결합하면 기능장애 T 세포를 초래한다.

[0406] 다중 저해 수용체의 공동 발현이 T 세포 고갈의 주요 특징이라는 점을 고려할 때, 이러한 수용체의 동시 표적화는 T 세포 고갈의 상승적 반전을 초래하는 것으로 밝혀져 있다(상기 문헌[Wherry & Kurachi] 참고). 예를 들어, 만성 LCMV 감염에서 마우스의 IL-10 및 예정사 수용체 1(PD-1) 경로의 동시 차단은 IL-2 처리와 PD-1 경로의 차단을 조합한 것과 같이 CD8+ T 세포 고갈의 상승작용적 역전을 유발하고, 바이러스 제어를 향상시킨다(상기 문

헌[(Wherry & Kurachi] 참고). 또한, LCMV 마우스 모델에서, CD25-적격 $CD8^+$ T 세포는 LMCV로의 감염 후 CD25-결핍 T 세포보다 5배 더 많은 수로 확장되는 것으로 나타났다(문헌[Bachmann MF et al, Eur J Immunol, 2007, 37:1502-1512]). 더욱이, 이들 연구자들은 급성/해결된 감염과 대조적으로, CD8+ T 세포의 유도 및 유지가 CD25 신호전달과 상당히 독립적인 경우, CD25 신호전달이 지속적인 바이러스 감염 동안 바이러스-특이적 CD8+ T 세포의 유지에 중요하다는 것을 제시하였다.

[0407] 또 다른 저해 수용체인 CTLA-4는 CD4+ T 세포에서 만성 HIV 감염에서 선택적으로 상향조절되지만 CD8+ T 세포에서는 그렇지 않으며, 이것은 바이러스 항원에 반응하여 IL-2를 생산하는 T 세포의 능력 감소와 상관관계가 있는데, 이는 가역적인 면역-조절 경로가 CD4+ T 세포 기능장애와 선택적으로 연관된다는 것을 나타낸다(Kaufmann DE et al, Nature Immunology, 2007, 8: 1246-1254). T 세포 기능의 계층적 손실은 항원 노출, 염증 및 저해 분자(PD-1, CD160, 2B4)의 발현 증가와 연관된다(Wherry J et al, Nature Immunology, 2011). 그 다음, $CD4^+$/$CD8^+$ T 세포에 의한 사이토카인의 분비가 감소한다(예를 들어, IL-2, TNFα 및 IFN-γ). 동시에, 만성적으로 감염된 HIV-1 환자와 같은 만성 패혈증 병태에서, HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 표현형은 면역관문 분자(예를 들어, PD-1, CD160)의 축적을 나타낸다.

[0408] T 세포 고갈은 만성 HIV 감염 동안 병원균 제거 실패의 중요한 인자가될 가능성이 있고, 부분적으로 부정적인 조절 경로에 의해 조절된다(문헌[Porichis F & Kaufamm DE, Curr Opin HIV AIDS, 2011, 6(3): 174-180]에서 검토됨). 예를 들어, CTLA-4 저해 면역-조절 수용체뿐만 아니라 세포 예정사 수용체-1(PD-1)은 CD4+ T 세포에서는 상향 조절되지만, HIV-감염된 대상체에서는 CD8+ T 세포에서 상향 조절되지 않는다(Kaufmann DE et al, Nature Immunol, 2007, 8: 1264-1254). 이것은 $CD4^+$ T 세포가 바이러스 항원에 대한 반응으로 IL-2를 생산하지 못하는 것과 상관관계가 있다. HIV 환자로부터의 T 세포는 IL-2를 생산하는 능력이 손상되고, 항원을 리콜하기 위한 증식 반응은 HIV 감염 초기에 방해가 되며, IL-2에 의해 시험관 내에서 회복될 수 있다(Fauer AS & Panteleo G (Eds), Immunopathogenesis of HIV infection, Springer, doi: 10.1007/978-3-642-60867-4, pp 41-42).

[0409] 따라서 높은 수준의 항원과 관련하여 HIV 특이적 CD4+ T 세포의 증식을 억제하는 것은 바이러스 특이적 CD4+ T 세포의 전구체 빈도가 제한되는 기전일 수 있다(McNeil AC et al, PNAS USA, 2001, 98: 13878- 3883). 더욱이, PD-L1 차단 항체에 의한 PD-1 경로의 차단은 HIV-특이적 $CD4^+$ T 세포 증식을 증가시킨다(상기 문헌[Porichis & Kaufmann] 참고).

[0410] 그러나 CD4+ T 세포만 고갈되고, 후속 항원 시험감염 시 효과가 없을 뿐만 아니라 $CD8^+$ T 세포도 마찬가지이다. HIV 감염에서 CD4+ T 세포의 손실은 CD8+ T 세포의 고갈 증가 및 질환 진행과 관련이 있으며 $CD8^+$ T 세포 고갈에 대한 CD4+ T 세포 반응의 변화의 영향은 매우 관련이 있다(Wherry EJ & Kurachi M, Nature Reviews, 2015, 15: 486-499). 고갈된 CD8+ T 세포는 또한 PD-1의 높은 발현을 갖는 반면, 노화 세포는 그렇지 않다(상기 문헌[Wherry & Kurachi]의 검토 참고). 더욱이, IL-2 처리와 PD-1 매개된 저해 경로의 차단을 조합하는 것은 고갈된 CD8+ T 세포를 재활성화하고, 바이러스 부하를 감소시키는데 놀라운 상승작용적 효과를 나타내는 것으로 밝혀져 있다(상기 문헌[Wherry & Kurachi] 참고). HIV-1 특이적 CD8+ T 세포의 생체외 증식은 IL-2에 결정적으로 좌우된다(Lichterfield M et al, JEM, 2004, 200: 701-712). 종합하면, HIV 특이적 CD4+ T 세포 헬퍼 기능의 증강에 의해 만성 감염에서 HIV 특이적 CD8+ T 세포 기능의 손실이 회복될 수 있다.

[0411] T 세포 고갈의 또 다른 표현형 마커는 CD8+ T 세포에서의 Tim-3 발현인데, 이는 Tim-3과 PD-1 모두를 표적으로 하는 것이 만성 바이러스 감염에서 CD8 T 세포 기능 장애를 극복하는 가장 효과적인 수단이 될 수 있다는 제안으로 이어진다(Jin HT et al, PNAS USA, 2010, 107(33): 14733-8). 더욱이, 최근 문헌 보고서는 CD8+ T 세포 고갈에서 Tim-3과 관련하여 Lck의 잠재적 중요성을 강조한다. 예를 들어, Tim-3에 대한 생리학적 리간드인 갈렉틴-9는 수용체 포스파타제 CD45에 결합하고, 높은 수준으로 존재할 때 Lck에서 Y394를 탈포스포릴화시켜 Lck 활성을 감소시킨다(Clayton KL et al, J Immunol, 2014, 192(2): 782-791).

[0412] 또한 갈렉틴-9는 CD3 신호전달 래프트(raft) 내에서 Tim-3뿐만 아니라 CD45의 수준을 증가시킬 수 있고, 시냅스에서 이러한 포스파타제의 높은 농도는 Lck가 음으로 조절되어 TCR 신호전달을 완화시키는 수단으로 제안되었다(Clayton KL et al, J Immunol, 2014, 192(2): 782-791). 또한, 항-CD3/CD28로의 TCR의 결찰을 통해 활성화된 T 세포로부터의 세포 용해물을 분석하면, Lck가 Tim-3에 동원되고, Tim-3에 의한 Lck의 격리는 Lck의 세포내 풀을 고갈시켜, TCR 쇄에서 ITAM 모티프의 포스포릴화를 금지시킴으로써 TCR의 불완전한 활성화를 초래하는 것으로 또한 제안되었다(Tomkowicz B et al, Plos One, 2015, 10(10): e0140694 (doi:

10.1371/journal.pone.0140694).

[0413] 암에서, 현재 종양은 특히 종양 항원에 특이적인 T 세포에 대한 면역 내성의 주요 기전으로 특정 면역 관문 경로에 참여하는 것이 명확하며, 세포 독성 T-림프구 연관 항원 4(CTLA-4) 및 세포 예정사 단백질 1(PD-1)의 항체 차단제를 사용한 임상은 지속적인 임상 반응을 생성할 수 있는 잠재력과 함께 향상된 항-종양 면역을 입증하였다(Pardoll DM, Nature Reviews Cancer, 2012, 12: 252-264).

[0414] CTLA-4가 활성화된 CD8+ 효과기 T 세포에 의해 발현되더라도, CTLA-4의 주요 생리학적 역할은 CD4+ T 세포의 2가지 주요 하위세트에 대한 구별되는 효과인 헬퍼 T 세포 활성도의 하향조절 및 조절 T(Treg) 세포 면역억제 활성도의 강화를 통한 것으로 보인다(상기 문헌[Pardoll]에서의 검토 참고). 그러나, 암 면역요법에서 PD-1 경로의 차단은 종양내 Treg 세포의 수 및/또는 억제 활성을 감소시킴으로써 면역 반응을 향상시킬 수도 있다(상기 문헌[Pardoll] 참고). 더욱이 PD-1 차단은 조직 및 종양 미세 환경에서 효과기 T 세포의 활성을 향상시킬뿐만 아니라 PD-1B 세포에 대한 직접적인 효과를 통해 종양 및 항체 생산에서 자연 살해 세포 활성도를 향상시킬 가능성이 있다(상기 문헌[Pardoll] 참고). 암에서, 발현되는 주요 PD-1 리간드는 PD-L1이며, PD-L1의 높은 발현은 거의 모든 암 유형에서 발견되었다(상기 문헌[Pardoll] 참고). 따라서, 하나 이상의 저해 면역관문을 단독으로 또는 조합하여 표적으로 하는 치료는 암의 전신 제어에 큰 잠재력을 보유하는 것으로 간주된다(Allison JP, JAMA, 2015, 314(11): 1113-1114; Creelan BC, cancer Control, 2014, 21(1): 80-9).

[0415] 본 발명자들은 도 1, 2, 4, 5 및 6에 나타낸 바와 같이 본 명세서에 기재된 펩타이드가 Lck를 활성화하고, 도 3 및 도 40에 나타낸 바와 같이 Y394에서 Lck 포스포릴화를 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0416] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 Lck의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0417] 일 실시형태에서, 본 발명은 Lck 키나제를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, Lck의 활성도를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 Lck 키나제를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, Lck 키나제의 Y394 포스포릴화를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0418] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 Lck의 활성도는, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉될 때 Lck 활성도의 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 Lck의 활성도와 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준(예를 들어, 대조군)을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다. 유사하게, Lck 키나제의 Y394 포스포릴화의 수준은, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 Lck 키나제의 Y394 포스포릴화 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉되지 않은 Lck 키나제의 Y394 포스포릴화 수준(예를 들어, 대조군)과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준(예를 들어, 대조군)을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0419] Lck 활성화의 하류 효과를 비롯한 Lck의 활성도는 본 명세서에 기재되어 있다.

[0420] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "접촉시키는"은 시험관내 시스템 또는 생체내 시스템에서 제시된 모이어티(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드 및 Lck 키나제)를 가깝게 하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 단백질 키나제를 본 명세서에 기재된 활성화제 "접촉시키는" 것은 본 발명의 화합물을 개체 또는 환자, 예컨대, 키나제를 갖는 인간에게 투여하는 것, 뿐만 아니라 예를 들어, 키나제를 함유하는 세포 또는 정제된 제제를 함유하는 샘플에 본 명세서에 기재된 바와 같은 활성화제를 도입하는 것을 포함한다.

[0421] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 펩타이드가 인간 T 세포로부터 IL-2 분비를 증가시킨다는 것을 입증하였다(도 7, 도 8, 도 9, 도 29, 도 33, 도 34, 도 35 및 도 37). 중요하게는, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드로의 세포의 전처리는 T 세포가 후속적으로 자극될 때 IL-2 분비를 증가시킨다(예를 들어, 도 29 참고).

[0422] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL-2의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0423] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-2 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0424] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-2 분비 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-2 분비 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)으로부터의 IL-2 분비 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0425] 일 실시형태에서, 세포는 T 세포이다.

[0426] 본 발명은 세포의 증식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0427] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 증식은 세포 수의 증가, 또는 세포 또는 세포 집단의 세포 분열 수의 증가를 포함하며, 용어 확장과 상호 교환 가능하게 사용된다. 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단의 세포 증식의 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 세포 또는 세포 집단의 증식 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 세포 증식 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0428] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0429] 일 실시형태에서, 세포는 세포 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이거나 또는 세포의 집단은 상기 세포를 포함한다.

[0430] 또 다른 실시형태에서, 세포는 미경험 세포이거나 또는 세포의 집단은 미경험 세포를 포함한다.

[0431] 바람직한 실시형태에서, 방법은 생체내에서 또는 시험관내에서 세포 또는 세포의 집단에 대해서 수행된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 방법은 생체외에서 세포 또는 세포의 집단에 대해서 수행된다.

[0432] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 동물에서 세포 또는 세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 동물에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0433] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물은 전형적으로 유효량으로 투여된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"(예를 들어, "치료적 유효량" 또는 "약제학적 유효량")은 Lck 키나제 활성의 활성화를 허용하거나 또는 분자 또는 세포 반응을 증가시키거나 감소시키는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드의 양을 의미한다. 상기 "유효량"은 개체의 연령 및 일반적인 상태 및 치료 또는 예방될 특정 병태, 치료 기간, 이전 치료 및 병태의 본성 및 이미 존재한 기간과 같은 인자에 따라 대상체마다 달라질 것이다.

[0434] 일부 실시형태서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드는 전형적으로 질환 또는 병태의 증상이 없는 대상체에게 Lck를 활성화시키에 유효한 양으로, 예를 들어, 임의의 연령의 건강한 개체에게 투여된다.

[0435] 구체적으로, 활성화제의 유효량은 과도하거나 용인될 수 없는 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 대상체에게 투여될 수 있는 Lck 활성화 펩타이드의 양을 합리적인 유익/유해비에 상응하는 양으로 정의하지만, 그러나 본 명세서 전반에 걸쳐 개시된 것과 같은 적절한 기술에 의해 평가된 바와 같이 원하는 효과를 제공하기에 충분한 것이다. 따라서, 정확한 유효량을 명시하는 것은 가능하지 않지만, 당업자는 일상적인 실험 및 배경 일반 지식을 사용하여 임의의 개별 사례에서 적절한 "유효"량을 결정할 수 있을 것이다. 이러한 맥락에서 치료 결과는 증상의 근절 또는 완화를 포함한다. 치료 결과는 병태의 완전한 개선(즉, 치유)일 필요는 없다.

[0436] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포의 집단으로부터 유래된 세포 또는 세포의 집단을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법으로부터 유래된 세포 또는 세포 집단으로부터 유래된 (예를 들어, 생체내 또는 시험관내에서 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시킨 후) T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포 또는 이들의 집단. 또 다른 양상에서 본 발명은 예를 들어, 입양 세포 전달을 위한 본 명세서에 기재된 세포 또는 세포 집단의 방법 및 용도를 제공한다.

[0437] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 T 세포주(도 10 및 도 12), PBMC 내의 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포(도 13) 및 고갈된 CD4+ T 세포(도 11)에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0438] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL2R의 생리학적 효과(예를 들어, IL-2에 대한 반응성)를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0439] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단에서 IL-2 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0440] 일 실시형태에서, IL-2에 대한 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준은, IL-2에 대한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 IL-2에 대한 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 반응성의 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0441] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0442] 일 실시형태에서, 본 발명은 면역관문 저해제의 존재 하에서 CD25 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0443] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단에서 IL-2RB(CD122) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0444] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단에서 IL-2Ra 또는 IL-2RB 발현 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 세포 또는 세포 집단에서의 IL-2Ra 또는 IL-2RB 발현 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서의 IL-2Ra 또는 IL-2RB 발현 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0445] 일 실시형태에서, 세포는 미경험 세포이거나 또는 세포의 집단은 미경험 세포를 포함한다.

[0446] 일 실시형태에서, 세포는 T 세포이다. 바람직한 실시형태에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

[0447] 상기에 논의된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법은 세포 또는 세포의 집단에서, 생체내에서(예를 들어, 대상체에서) 또는 시험관내에서(예를 들어, 생체외에서) 수행될 수 있다. 또한 상기에 논의된 바와 같이, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법으로부터 유래된 세포 및 세포의 집단, 및 본 명세서에 기재된 세포 또는 세포 집단의 방법 및 용도를 제공한다.

[0448] 본 명세서에 기재된 펩타이드는 CD8+ T 세포의 증식(도 20, 도 21 및 도 27) 및 CD28+ CD8+ T 세포의 증식(도 24)을 증가시킨다.

[0449] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 CD28+ T 세포의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0450] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단에서 CD28 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0451] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단에서 CD28 발현 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 세포 또는 세포 집단에서의 CD28발현 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서의 CD28 발현 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0452] 일 실시형태에서, 본 발명은 T 세포의 증식을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, T 세포는 CD8+ T 세포이다.

[0453] 인구학적 진화는 공중 보건에 대한 도전을 나타낸다. 특히 선진국에서 전세계 인구는 고령화되고 있고, 60세 이상의 인구 비율은 1950년에는 8%에서 2050년까지 예상치로 21%로 증가할 것이다(문헌[Compte N et al, PLOS One, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065325]에서 검토됨). 면역 기능의 저하는 노화의 특징이며, 노인은 박테리아 및 바이러스 감염의 비율 및 중증도가 증가하고, 암 및 백신 반응이 감소된다(상기 Compte 등의 문헌 참고).

[0454] 인간의 면역계는 노화됨에 따라 점진적으로 악화되며, 이 결함은 백신 및 감염에 대한 면역학적 기억을 유도하는 능력의 감소로 나타난다. 병원체 및 종양 발생으로부터의 보호는 다양한 TCR 레퍼토리의 생성 및 유지에 좌우되며, 노년기에는 TCR 다양성이 현저히 감소하여 새로운 병원체와 싸우고, 재발하는 감염에 대한 격렬한 리콜 반응을 일으키는 것을 어렵게 만든다(문헌[Moro-Garcia MA et al, Front Immunol, 2013, doi.org/10.3389/fimmu.2013.00107]에서 검토됨).

[0455] 병원체에 대항하고 백신접종에 반응하는 능력의 감소는 노화 동안 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 관찰된 변화로 반영되며, 노화 시 적응 면역 반응의 악화를 예방하는 것은 CD4 + T 세포 집단의 "회춘"에 의해 달성될 수 있다고 제안되었다((Moro-Garcia MA et al, Front Immunol, 2013, doi.org/10.3389/fimmu.2013.00107).

[0456] CD28 발현의 손실은 CD4+ T 세포 기능의 노화-연관 감소의 특징이다. CD28은 사이토카인 생산(IL-2)을 유도하고, 세포 증식을 촉진하는 것과 같은 T 세포 활성화 동안 중추적인 역할을 하기 때문에, 활성화 중에 이러한 공동 자극 신호가 없으면 T 세포의 일부만 활성화되거나 심지어 에네르기 상태가 된다(Godlove J et al, Exp Gerontol, 2007, 42(5): 412-5). 이러한 방식으로, CD28-음성 T 세포의 축적은 노인에서 병원체 및 백신에 대한 전체 면역 반응의 감소와 연관되고(Sauerwein-Teissl M et al, J Immunol, 2002, 168: 5893-5899) 및 CD4+/CD28 T 세포는 65세 초과의 일부 개체에서 전체 CD4+ T 세포 구획의 최대 50%를 차지할 수 있다(Vallejo An et al, J Immunol, 2000, 165: 6301-6307).

[0457] 포유동물의 노화 동안, 흉선의 완전성의 점진적인 감소 및 흉선 퇴화가 면역 노화의 중요한 요소로 간주된다(Li L et al, J Immunol. 2004, 172(5): 2909-2916). 뮤린 연구는, IL-12 넉아웃 마우스에서 흉선 퇴화가 가속화되었으며, IL-12는 노화된 야생형 및 IL-12 넉아웃 마우스 모두에서 IL-2 유도 흉선세포 증식을 증강시키는 강한 상승작용 효과를 제공하는 것을 나타내었다(상기 Li 등의 문헌 참고).

[0458] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD8+ 및 CD4+ T 세포에서 CD28 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다(실시예 21, 도 22, 도 30 및 도 31).

[0459] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 노화 관련 면역 기능장애를 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0460] 일 실시형태에서, Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태는 병원성 감염, 병원성 감염으로부터의 패혈증(예를 들어, 만성 패혈증), 면역 결핍성 장애, 감소된 면역 반응, 감소된 T 세포 수치, T 세포 이상, T-세포 고갈 및 T 세포 면역관문 차단으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0461] 바람직한 실시형태에서, 질환 또는 병태는 암이다.

[0462] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "노화 관련 면역 기능장애"는 상기에 논의된 노화 관련 면역 변화를 포함한다.

[0463] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Lck 또는 Lck 활성도의 저해 또는 하향 조절을 특징으로 하는 질환 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0464] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "치료"는 치료적 치료뿐만 아니라 예방적 치료(장애의 발명 또는 장애의 증상(노화 관련 변화 포함)을 완전히 예방하는 것 또는 장애의 증상(노화 관련 변화 포함)의 발병 또는 개체에서 장애의 전임상적으로 분명한 단계를 지연시키는 것)를 포함한다.

[0465] 용어 "예방"은 장애의 발병 또는 장애의 증상을 완전히 예방하거나 장애의 발병 또는 장애의 증상, 또는 개체에

서 장애의 전임상적으로 명백한 단계를 지연시키는 것을 포함한다. 이것은 예를 들어, 암과 같은 질환이 발병할 위험이 있는 것의 예방적 치료를 포함한다. "예방법"은 예방에 대한 또 다른 용어이다.

[0466] 또한, 노인에서 IFN 감마 생산의 저하는 면역 위험 표현형에 기여하고, 박테리아 생성물 또는 바이러스 항원으로 자극할 때 노인에서 이 사이토카인을 생산하는 능력이 감소하여 노화에 따른 질환 민감성에도 기여한다(Ouyang Q et al, Eur Cytokine Netw, 2002, 13(4): 392-4). 특히, 노화된 마우스는 감소된 IL-18 수용체(IL-18R) mRNA 발현에 부분적으로 기인하는 것으로 생각되는 인플루엔자 바이러스에 대한 감소된 CD8+ 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 나타내며, IL-12 및 IL-18 둘 다는 노화된 마우스에서 IFN 감마 생산을 상당히 증가시켜 노화와 연관된 CD8+ CTL 결핍을 역전시킨다(Zhang Y et al, J Interferon & Cytokine Res, 2004, doi. org/10.1089/107999001753238097).

[0467] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD4+ T 세포(도 18) 및 CD8+ T 세포(도 19)에 의한 IFNg 생산을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0468] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IFNg의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0469] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 사이토카인 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0470] 바람직한 실시형태에서, 사이토카인은 IFNg이다.

[0471] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단으로부터의 사이토카인(예를 들어, IFNg) 분비 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 사이토카인(예를 들어, IFNg) 분비 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)으로부터의 사이토카인(예를 들어, IFNg) 분비 수준과 비교할 때 증가될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0472] 자연 살해(NK) 세포는 또한 감염 및 암에 대한 면역에서 중요한 역할을 한다. 노화 관련 기능성 NK 세포 결핍은 인간 및 마우스에서 널리 문서화되어 있으며, 가용성 IL-15/IL-15R알파 복합체를 노화된 마우스에 주입하면 노화 관련 NK 세포 결핍을 완전히 역전시키는 것으로 나타났다(Chiu B-C et al, J Immunol, 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1301625). 더욱이, IL-15는 초기 감염에 대한 면역 반응에서 중요한 역할을 하며 CD4+ CD28- T 세포의 세포용해 특성을 증가시키고, 항원-특이적 반응을 향상시키는 것으로 나타났다(Alonso-Arias R et al, Aging 세포, 2011, 10: 844-852).

[0473] IL-15는 NK 및 CD8+ T 세포의 발달, 기능 및 생존을 촉진시키고, IL-15에 의한 신호전달은 CD215(IL-15R) 수용체를 통해 발생한다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL-15 분비(도 23) 및 CD215 발현(도 23, 실시예 22)을 증가시키는 것을 입증하였다. 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL-15R 및 IL-15의 생리학적 효과를 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0474] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-15 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0475] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-15 분비 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-15 분비 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)으로부터의 IL-15 분비 수준과 비교하여 증가될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0476] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포에서 IL-15R(CD215) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0477] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단에서 IL-15R 발현 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 세포 또는 세포의 집단에서 IL-15R 발현 수준을, 본 명

세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서 IL-15R 발현 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0478] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 NK 세포의 IL-15 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 NK 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0479] 일 실시형태에서, IL-15에 대한 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준은, IL-15에 대한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 IL-15에 대한 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 반응성의 수준에 비해서 증가할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0480] 바람직한 실시형태에서, 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

[0481] 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, IL-15에 대한 증가된 반응성은 NK 및 CD8+ T 세포의 발달, 기능 및 생존을 조절할 것으로 예상된다.

[0482] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포(실시예 25), 및 NK 세포(도 32)에서 pSTAT4의 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0483] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 pSTAT4의 생리학적 효과를 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0484] 예를 들어, T 헬퍼 타입 1(T helper type 1: TH1) 세포 발달은 신호 전달자 및 전사 1의 활성화제(STAT1)를 통한 인터페론-γ(IFN-γ) 신호 전달 및 STAT4 활성화를 통한 인터류킨-12(IL-12) 신호전달을 포함한다.

[0485] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 NK 세포에서 pSTAT4의 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 NK 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0486] 인터류킨-2(IL-2)는 주로 헬퍼 T 세포에 의해 생산되고 세포 및 체액성 면역에 관여하는 다양한 세포의 성장 및 기능을 조절하는 성장 촉진 사이토카인이다. IL-2의 발현은 노화에 따라서 감소하고, 이러한 감소는 면역 기능의 노화 관련 감소와 상관되는 것으로 나타났다(Pahlavani MA & Richardson A, Mech Ageing Dev, 1996, 89(3): 125-54). 더욱이, 노화된 마우스에 대한 IL-21 투여는 신생 가슴샘림프구증식(de novo thymopoiesis)을 촉발함으로써 말초 T 세포 풀을 젊어지게 하는 것으로 나타났다((Al-Chami E et al, Aging Cell, 2016, 15(2): 349-60). 예를 들어, rIL-21 처리된 노화된 마우스에서 유래된 T 세포의 자극은 Lck 키나제의 활성화를 나타내어 궁극적으로 대조군 노화된 마우스에서 유래된 T 세포와 비교하여 이의 IL-2 생산, CD25 발현 및 증식 능력을 증가시켰다(상기 Al-Chami 등의 문헌 참고).

[0487] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 T 세포주(도 10), CD4+ T 세포(도 11), PBMC 내의 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포 (도 13)에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키고, CD8+ T 세포의 증식(도 20, 도 21, 도 27) 및 NK 세포의 증식(실시예 20)을 증가시키는 것을 입증하였다.

[0488] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL-2Ra의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0489] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 CD8+ T 세포의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0490] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 CD4+ T 세포의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0491] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 NK 세포의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0492] 일 실시형태에서, 본 발명은 T 세포 상에서 IL-2Ra(CD25) 발현을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 T 세포의 IL-2 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포를 본 명세서에 기

재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

[0493] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포의 증식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 CD8+ T 세포 또는 NK 세포이다.

[0494] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 세포 집단은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 NK 세포의 집단이다. 상기에 제시된 바와 같이, 방법은 생체내에서 또는 시험관내에서 세포 또는 세포의 집단에 대해서 수행될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 방법은 생체외에서 세포 또는 세포의 집단에 대해서 수행된다.

[0495] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포의 집단으로부터 유래된 세포의 집단을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포의 집단으로부터 유래된, T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포 또는 이들의 집단을 제공한다.

[0496] 일 양상에서 본 발명은 본 명세서에 기재된 세포 또는 세포 집단의 방법 및 용도를 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 세포 또는 세포 집단은 CAR T 세포 요법을 비롯한, 입양 세포 요법을 위해서 사용될 수 있다.

[0497] 사이토카인 IL-21은 광견병 감염에 대한 최적의 백신-유도 1차 반응 개발에 중요하며, IL-7과 조합하여, 전체 세포 암 백신에서 강력한 보조제 효능을 보유하는 것으로 나타났다(Dorfmeier CL et al, PLoS Negl Trop Di, 2013, doi: 10.1371/journal.pntd.0002129; Gu Y-Z et al, Scientific Reports, 2016, doi: 10.1038/srep32351).

[0498] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 T 세포에 의한 IL-21 생산을 증가시킨다는 것을 입증하였다(도 28).

[0499] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 IL-21의 생리학적 효과를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0500] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 또는 세포의 집단으로부터 IL-21 분비를 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0501] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-21 분비 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 IL-21 분비 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)으로부터의 IL-21 분비 수준과 비교하여 증가될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0502] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0503] 일 실시형태에서, 본 발명은 백신접종을 필요로 하는 대상체에게 백신접종하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물을 백신과 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 백신(예를 들어, 백신 항원)과 함께 제형화된 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0504] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 면역관문 저해제 PD-L1의 존재 하에서 CD25 발현을 구제할 수 있다는 것을 입증하였다(실시예 11).

[0505] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 면역관문 저해제와 순차적으로 동시에 투여하는 단계를 포함한다.

[0506] 예시적인 암이 본 명세서에 언급되어 있다.

[0507] 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 활성화시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0508] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 Treg 세포의 비율을 감소시킨다는 것을 입증하였다(실시예 26).

[0509] 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 본 명세서에 기재된 Treg 세포의 비율을 감소시키는 생리학적 효과를 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0510] 일 실시형태에서, 본 발명은 세포 집단에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 Treg 함유 세포 집단을 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0511] 일 실시형태에서, 세포 집단에서의 Treg의 비율은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 집단에서 Treg의 비율이 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉되지 않은 세포 집단에서의 Treg(예를 들어, 대조군)의 비율에 비해서 감소될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉하기 전후를 비교할 때 감소된다.

[0512] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0513] 일 실시형태에서, Treg 세포는 Foxp3+ Treg 세포이다.

[0514] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 면역억제를 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0515] PD-1 표적화 요법에 의한 고갈된 CD8+ T 세포의 구제는 CD28-의존적이다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 CD28의 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0516] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 T 세포의 고갈을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물은 면역관문 저해제와 순차적으로 동시에 투여된다.

[0517] 암

[0518] 감소된 세포 면역은 다수의 암 및 증가된 수준의 프로스타글란딘 E2(PGE2)와 연관된다. 호지킨 림프종에서 CD4+ 세포는 Lck의 비활성화 및 ZAP70의 감소된 포스포릴화를 포함하는 건강한 개체로부터의 T 세포에서 PGE2에 의해 시험관내에서 변경되는 유전자의 유사한 조절을 나타내는 것으로 밝혀져 있다(Chemnitz JM et al, Cancer Research, 2006, 66: 1114).

[0519] 호지킨 림프종 및 다른 종양에서, 손상된 CD4+ T 세포 활성화로 인해 세포 면역이 감소하고, 호지킨 림프종과 연관된 PGE2 수준 증가는 Lck를 비활성화시킴으로써 CD4+ T 세포 기능을 저해한다고 시사되어 있다(Chemnitz JM et al, 2006, Cancer Res, 66(2), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16424048&query_hl=5&itool=pubmed_docsum>). Lck는 또한 약물 내성에 중요한 역할을 하며, Lck가 결핍된 T 세포는 항암제에 내성이 있는 것으로 밝혀져 있다(Samraj AK et al, 2006, Oncogene, 25: 186-197, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16116473&query_hl=18&itool=pubmed_docsum>).

[0520] 시타라빈은 급성 골수성 백혈병의 치료에 사용되는 가장 효과적인 화학치료제 중 하나이다(Frei E et al, Cancer Res, 1969, 29: 1325-1332). 사이클린 A 및 B 및 p34cdc2 활성을 갖는 세린/트레오닌 키나제 p34cdc2 키나제 복합체는 세포 분열의 개시에 필요하다. 따라서 p34cdc2는 DNA 합성의 완결 및 DNA 손상의 존재를 모니터링하는 유사분열 면역관문을 나타낸다(Nurse P, Nature, 1990, 344: 503-507). 그러나 DNA 복제 상태는 p34cdc2의 세린/트레오닌 활성에 의존하지만, 이것은 생체내에서 Tyr15에 대한 p34cdc2의 포스포릴화에 의해 조절되고(Atherton-Fessler S et al, Mol Cell Biol, 1993, 13: 1675-1685), p34cdc2의 세린/트레오닌 활성은 p34cdc2의 촉매 소단위에서 Tyr15의 포스포릴화에 의해 저해되는 것으로 밝혀져 있다(Gould K & Nurse P, Nature, 1989, 342: 39-44). Lck 키나제는 p34cdc2의 Tyr15를 포스포릴화시키는 것으로 밝혀져 있고(Draetta G et al, Nature, 1988, 336: 738-744), 이는 백혈병 및 기타 고형암 치료에서 Lck의 활성제에 대한 잠재적 역할

을 시사한다.

[0521] 졸레드로네이트와 IL-2의 조합물을 사용한 말초 혈액 림프구의 생체외 또는 생체내 자극에 의한 암 면역요법을 위한 γ/δ T 림프구의 표적화는 이미 기재되어 있고(Gomes AQ et al, Cancer Res, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3236; Dieli F et al, Cancer Res, 2007, 67(15): 7450-7; Wilhelm M et al, Blood, 2003, 102(1): 200-6), 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 생체외에서 감마/델타 T 세포를 생성하기 위한 IL-2의 사용에 대한 대안으로 제공될 수 있고, 유방암, 전립선암에서 림프성 악성종양에 이르는 악성종양 환자를 위한 치료적 투여에 적용할 수 있다(상기 문헌[Dieli F et al]; 상기 문헌[Wilhem M et al]; 문헌[Capietto AH et al, J Immunol, 2011, 187(2): 1031-8] 참고). 또한, 종양 세포에 대한 γ/δ T 세포독성은 리툭시맙과 트라스투주맙을 포함하는 병용 요법에서 향상되는 것으로 밝혀져 있고(문헌[Tokuyama H et al, Int J Cancer, 2008, 122(11): 2526-343]; 상기 Capietto AH 문헌 참고), 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 상기에 기재된 바와 같은 항암 약물 및/또는 본 발명에 따라서 암 또는 다른 질환 또는 병태를 치료하기 위한 다른 약물을 갖는 다른 것과의 병용 치료에서 사용하는 것으로 확장된다.

[0522] 본 발명자들은 고갈된 CD4+ 세포를 본 발명의 펩타이드로 처리하는 것이 CD25 발현을 유도한다는 것을 입증하였다(도 11).

[0523] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 T 세포의 고갈을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포를 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0524] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 PBMC 공동 배양물에서 Calcein-AM 염색된 K562 세포의 특이적 세포독성에서 세포독성을 증가시킨다는 것을 입증하였다(실시예 44).

[0525] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 세포독성 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포독성 세포 또는 세포독성 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0526] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단의 세포독성 세포 기능의 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 세포 또는 세포 집단의 세포독성 세포 기능 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 세포독성 세포 기능의 수준과 비교하여 증가될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 향상된다.

[0527] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 T 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 T 세포 또는 T 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0528] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "T-세포 기능을 향상시키는"은 T-세포가 지속되거나 증폭된 생물학적 기능을 갖도록 유도, 유발 또는 자극하거나, 또는 고갈된 또는 비활성 T-세포를 재생 또는 재활성화시키는 것을 의미한다. T-세포 기능 향상의 예는 개입전 이러한 수준과 비교할 때 $CD8^+$ T-세포로부터의 IFNg 분비 증가, 증식 증가, 항원 반응성 증가(예를 들어, 바이러스, 병원체 또는 종양 제거)를 포함한다. 일 실시형태에서, 향상 수준은 적어도 50%, 대안적으로 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1 20%, 150%, 200%이다. 이러한 향상을 측정하는 방식은 당업자에게 공지되어 있다.

[0529] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단의 T 세포 기능의 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드와 접촉된 세포 또는 세포 집단의 T 세포 기능 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 T 세포 기능의 수준과 비교하여 증가될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 향상된다.

[0530] 예시적인 세포독성 세포 기능 및 T 세포 기능은 본 명세서에 논의되어 있다.

[0531] 상기에 논의된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법은 세포 또는 세포의 집단에서, 생체내에서(예를 들어, 대상체에서) 또는 시험관내에서(예를 들어, 생체외에서) 수행될 수 있다.

[0532] 노화

[0533] T 세포는 세포 면역의 중심적인 역할을 하며, 노화 관련 질환의 발생이 증가하고 있는데, 이들 중 다수는 면역계의 조절 장애에 영향을 받는다. 주로 T 세포 반응인 면역 반응이 노화에 따라 조절장애가 있음을 시사하는 많은 증거가 있다(Fulop T et al, Longevity & Healthspan, 2012, 1:6). 노화 과정과 연관된 T 세포의 신호전달

경로에서 몇몇 변경이 설명되어 있고, 원형질막(지질 래프트) 내의 인지질 구조가 TCR 캐스케이드의 성분을 조립하는 역할을 한다고 제안되었다(상기 Fulop 등의 문헌 참고). 또한, Lck 및 지질 래프트에 대한 활성화된 형태의 동원은 고령 개체로부터의 활성화된 T 세포에서 감소하는 것으로 밝혀져 있다(Larbi A et al, J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 373-381).

[0534] T 세포 활성화 경로의 노화 연관 변경은 실험 동물 모델 및 인간에서 관찰되었으며, CD4+ T 세포에서 가장 중요한 변화가 발생하여, 사이토카인 인터류킨-2(IL-2)의 생산 감소 및 클론 확장을 초래한다.

[0535] IL-2 시스템에서, 세포내 신호 전달은 IL-2 수용체의 베타 사슬에 의해 촉발되며, Lck의 촉매 도메인의 특정 부위와 IL-2R 베타 수용체의 세포질 도메인 사이의 회합의 결과로서, IL-2R 베타 수용체는 포스포릴화된 Lck에 의해 포스포릴화된다(Hatakeyama M et al, Science, 1991, 252: 152308). Lck는 T 세포의 IL-2 자극 시 활성화되는 유일한 Src 패밀리 키나제이고(Brockdorff J et al, Eur Cytokine Netw, 2000, 11(2): 225-31), 활성화된 Lck 단백질은 항원 자극의 부재 하에서 IL-2 생산을 자극하는 것으로 밝혀져 있다(Luo K & Sefton BM, Mol Cell Biol, 1992, 12(10):4724-45732).

[0536] 손상된 T 세포 활성화 및 증식은 노화 동안 면역 기능 손실의 주요 변화이고ASA-T-cell activation in aging, Report 2016; http://www.nasa.gov/mission_pagres/station/research/wexperiments/857.html), 우주 비행 및 지상 대조군을 비교하여 얻은 정보는 이것에서 역할을 하는 특정 인자를 이해하고, 식별하는 데 대한 통찰력을 제공한다. 우주 비행 및 모의 미세중력은 초기 T 세포 활성화에서 주요 유전자 발현의 현저한 감소를 유발하는 것으로 공지되어 있으며, 수 많은 우주 비행 임무는 인터류킨-2(IL-2), 인터류킨-2 수용체 알파(IL-2Ra 또는 CD25), 인터페론 감마(IFNy) 및 종양 괴사 인자-알파(TNFα)에서 상당한 감소를 입증하였다(문헌[Martinez EM et al, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 2015, 308: R480-R488]에서 검토됨).

[0537] 이것은 우주 비행 연관된 면역계 약화가 지구 궤도를 넘어 인간 존재의 확장을 방해할 수 있는지 여부에 대한 의문이 제기된 우주 비행 중 억제된 면역에 대한 우려이다(Gueguinou N et al, *J Leukocyte Biology,* 2009, doi: 10.1189/jib.0309167). 본 명세서에 기재된 바와 같이, 적어도 일부 실시형태에서, 전술한 사이토카인의 발현뿐만 아니라 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포의 증식은 정상 및 고갈된 T 세포 둘 다에서 본 명세에 기재된 방법에서 사용되는 화합물에 의해 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 저-중력 및 미세-중력 환경에서 사용하도록 명확하게 확장된다.

[0538] 면역억제

[0539] 다수의 신규 항암제의 중요한 원치 않는 부작용은 압도적인 패혈증으로 이어지는 면역억제이다. 예를 들어, 전이성 신장암 치료제인 소라페닙은 약물 중단 후에도 10μM 이상의 용량에서 T 세포 증식을 회복 불가능하게 저해하는 것으로 보고되어 있다(Zhao W et al, Leukemia, 2008, 22: 1226-1233). 예를 들어, 증가하는 Lck 상향 조절은 타이로신 키나제 저해제 치료를 받고 있는 만성 골수성 백혈병 환자의 면역 반응을 재자극하기 위한 실행 가능한 선택으로 제안되어 있다(Wang G et al, BioMed Research International, 2014, doi.org/10.1155/2014/682010). 더욱이, 예를 들어, BCR-ABL 키나제 저해제 이마티닙(Gleevec, ST1571)은 만성 골수성 백혈병 치료에 매우 효과적이다. 그러나, 이 약물로의 장기간 치료는 주로 Lck 및 Zap70과 같은 타이로신 키나제의 저해와 연관된 T 세포 기능 장애로 인한 면역억제를 유도한다(상기 Wang G 등의 문헌 참고) 또한, 글루코코티코이드는 TCR 활성화에 필요한 신호전달 이벤트를 차단하는 강력한 면역억제제로 작용하며, 덱사메타손에 의한 Lck의 저해는 이노시톨-포스페이트 3 수용체를 하향 조절하여, TCR 신호의 강도를 약화시킴으로써 면역 반응을 억제하는 것으로 밝혀져 있다(Harr MW et al, JBC, 2009, 284: 31860-31871). 암에서 타이로신 키나제 저해제의 개발 및 사용이 급속히 확대됨에 따라, 이러한 약물의 잠재적인 부작용은 중요한 임상적으로 중요하다. 예를 들어, 이마티닙 외에도 닐로티닙 및 다사티닙은 Lck 저해에 기인된 T 세포 기능을 억제하는 것으로 보고되어 있다.

[0540] 따라서 암 치료는 바이러스 슈퍼항원과 같은 면역-강화 약물과의 병용 치료부터 이익을 얻을 수 있다. 그러나 박테리아 초항원은 T 세포의 비특이적 활성화 및 대량 사이토카인 방출을 유발하여 독성 쇼크 및 다발성 장기 부전을 비롯한 심각한 생명을 위협하는 증상을 유발하는 항원 클래스이다. 스타필로코쿠스 엔테로톡신 A(Staphylococcal enterotoxin A)는, 그것이 항생제-연관된 설사의 일반적인 원인이기 때문에 임상 설정에서의 문제이다. SEA에 의한 가능한 이환율에도 불구하고, Lck가 SEA에 의해 활성화되고(Wang G et al, BioMed Research International, 2014, 2014: Article ID 682010), 이전의 선택적인 Lck 활성화제 부족을 고려할 때, 만성 골수성 백혈병에서 이마티닙-매개된 T 세포 면역억제를 예방하기 위해 SEA를 사용하는 것이 제안되었다.

[0541] 이러한 보고서는, T 세포 발달 및 활성화 및 따라서 적응 면역 반응에 대한 Lck의 중요성을 강조한다(Stirnweiss A et al, 2013, Sci Signal, 6(263):ra13. Doi: 10.1126/scisignal.2003607). Lck의 수지상 세포(DC)-매개된 활성화는 동족 펩타이드-MHC 클래스 II 항원 복합체에 대한 TCR 반응의 민감도와 크기를 극적으로 증가시키는 과정인 "TCR 라이센싱"으로 이어진다(Meraner P et al, 2007, J Immunol, 178(4): 2262-2271). 그러나, 이마티닙은 예를 들어, Lck 활성의 저해를 통해 TCR-유도된 증식 및 활성화를 감소시킨다(Seggewiss R et al, 2005, Blood, 105: 2473-2479). 이것은 줄기세포 이식 후 기회 감염 및 이식편대숙주 또는 이식편대백혈병 반응의 유도에 영향을 미친다(Seggewiss R et al, 2005, Blood, 105: 2473-2479).

[0542] 상기에 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 펩타이드가 도 1, 도 2, 도 3, 도 4, 도 5 및 도 6에 도시된 바와 같이 Lck 활성도를 증가시키고, 도 3 및 도 40에 도시된 바와 같이 Y394에서 Lck 포스포릴화 증가시키고, 그리고 CD8+ T 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 입증하였다(예를 들어, 도 20, 도 21, 도 27).

[0543] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 하기 특징으로 갖는다는 것을 입증하였다:

[0544] • 루이스 폐암(LCC) 모델에서 종양 면적을 감소시킴(도 36);

[0545] • 펩타이드 처리된 루이스 폐암 마우스로부터 제거된 비장세포에서 CD28 및 CD215를 발현하는 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포의 비율을 증가시킴(도 30, 도 31); 및

[0546] • 펩타이드 처리된 루이스 폐암 마우스로부터 제거된 비장세포에서 NK 세포 상에서 pSTAT4의 발현을 증가시킴(도 32).

[0547] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 폐암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0548] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 폐암의 진행을 예방하거나 지연시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0549] 다발성 골수종/백혈병/림프종

[0550] 호지킨 림프종에 대한 IL-2 및 IL-12의 동시 표적화는 휴지기 NK 세포의 활성화 및 종양 세포 용해를 향상시킨다(Hombach A et al, Int J Cancer, 2005, doi.org/10.1002/ijc.20829).

[0551] 본 발명자들은 본 명세에 기재된 펩타이드가 NK 세포(도 17) 및 CD4+ T 세포(실시예 15, 실시예 28) 및 CD8+ T 세포(실시예 28, 도 25)에서 IL-12RB2 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0552] 본 발명자들은 또한 본 명세에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포(도 8, 도 9) 및 T 세포주(실시예 44)를 포함하는 T 세포(도 7)에 의한 IL-2 분비를 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0553] 급성 골수성 백혈병에서, 비정상적인 T 세포 기능의 다양한 양상이 진단 시기에 작동하는데, 탈진 및 노화가 우세한 과정이다(Knaus HA et al, JCI Insight, 2018, doi: 10.1172/jci.insight. 120974). 실제로, 급성 및 만성 백혈병 환자의 T 세포는 고갈 마커, 예컨대, PD-1 또는 TIM-3을 발현하며, 예를 들어, 증식 손상 및 IL-2 및 IFNg 생산 감소와 같이 불량하게 반응성일 수 있다(Siska PJ et al, Blood, 2014, 124: 4121).

[0554] 본 발명자들은 고갈된 CD4+ 세포를 본 발명의 펩타이드로 처리하는 것이 CD25 발현을 유도하고(도 10, 도 11 및 도 12), 본 명세서에 기재된 펩타이드가 PBMC(실시예 17) 및 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포(실시예 18)에서 IFNg 분비를 유도한다는 것을 입증하였다.

[0555] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 펩타이드가 인간 T 세포로부터 IL-2 분비를 증가시킨다는 것을 입증하였다(도 7, 도 8, 도 9 및 도 37).

[0556] 다발성 골수종(MM)은 악성 형질 세포의 클론 증식을 특징으로 하는 진행성 B 계통 신생물이다. 다발성 골수종에서의 T 세포는 또한 종양 부위에서 고갈 및 노화의 특징을 나타내며, T 세포 하위세트의 수 및 기능은 MM을 갖는 환자에서 비정상적이며; 예를 들어, CD4:CD8비가 반전되고, CD4 세포 중에서 헬퍼 T 세포 유형 1 대 유형 2(Th1:Th2) 비가 비정상이며, T 세포 활성화에 필요한 CD28 발현 수준이 T 세포에서 하향조절되고, MM 환자로부터의 순환하는 수지상 세포가 기능장애성이다(문헌[Sharabi A & Haran-Ghera N, Bone Marrow Res, 2011, Article ID 269519]에서 검토됨). 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD8+ 및 CD4+ T

세포에서 CD28 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다(도 22, 도 30, 도 31).

[0557] 중요하게는, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드로의 세포의 전처리는 후속 항원 자극 시 인간 T 세포로부터의 IL-2 분비를 증가시킨다(예를 들어, 도 29).

[0558] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 항원 자극은 세포 또는 세포의 집단을 항원 또는 항체, 예컨대, CD3 또는 CD28 항체에 노출 또는 접촉시키는 것을 포함한다.

[0559] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 미경험 세포는 항원에 노출되거나 접촉되지 않은 세포를 포함한다.

[0560] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 예방적으로, 예를 들어, 질환의 증상의 발병 전, 항원 자극 전, 병원체 노출 전 등에 예방적으로 투여하는 방법 및 용도를 제공한다.

[0561] 또한, 골수종 종양 부위로부터의 CD8+ T 세포는 CD3/CD28 시험관내 자극 후 IFNg를 생산하는데 실패하고, T 세포 자극에 대한 반응으로 탈과립화하는 능력을 감소시킨다(Zelle-Rieser C et al, J Haematology & Oncology, 2016, doi.org/10.1186/s13045-016-0345-30). MM에서 손상된 면역 반응은 MM 환자의 말초 혈액에서 기능적으로 활성인 면역억제 Treg의 증가에 의해 더욱 강조된다(문헌[Dosani T et al, Blood Cancer Journal, 2015, 5: e306]에서 검토됨).

[0562] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 면역억제성 Treg 세포의 비율을 감소시킨다는 것을 입증하였다(실시예 26).

[0563] 종양-침윤 림프구에서 Foxp3+ Treg 세포의 존재는 다양한 유형의 인간 암에서 불량한 예후와 상관관계가 있다. 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 Foxp3+ Treg 세포를 감소시킨다는 것을 입증하였다(실시예 26).

[0564] 따라서, 본 발명은 세포 집단에서 Fop3+ Treg 세포의 비율을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 집단을 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0565] IL-21은 면역억제성 Treg를 저해한다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 T 세포에 의한 IL-21 생산을 증가시킨다는 것을 입증하였다(도 28).

[0566] 입양 세포 요법(ACT)

[0567] 난치성 또는 진행성 암에 대한 백신 접종의 대용물은 입양 T 세포 요법(ACT), 즉, 생체외에서 가공된 T 세포의 투여이다(Kaartinen T et al, Cytotherapy, 2017, 19(6): 689-702). 추가로, ACT 이전에 생체외 확장 동안 T 세포의 컨디셔닝이 생체내 효능에 영향을 미치는 중요한 파라미터라는 것이 뮤린 연구에서 명확해졌다(Rubinstein MP et al, Cancer Immunol Immunother, 2015, 64(5): 539-549). T 세포의 입양 전달은 환자의 강력한 항-종양 및 항-바이러스 면역을 매개할 수 있으며, 이러한 치료는 T 세포 수용체, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 기타 효과기 분자를 포함한 유전 정보의 전달에 좌우될 수 있다(문헌[Andrijauskaite K et al, Cancer Gene Ther, 2015, 22(7): 360-367)]에서 검토됨).

[0568] 인터류킨은 T 세포의 생체외 확장 동안 배지에 혼입될 때 T 세포 기능을 향상시키기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 예를 들어, IL-12-컨디셔닝은 CD8+ T 세포의 레트로 바이러스-매개 형질도입 효율을 개선시키고(상기 Andrijauskaite K 등의 문헌 참고); IL-21의 첨가는 배양물에서 림프구의 더 큰 확장을 유도하고, CD8+ T 중추 기억 세포의 수율을 증가시키는 것으로 밝혀져 있고(Zoon CK et al, Int J Mol Sci, 2015, 16: 8744-8760; IL-21과 함께 배양된 CAR+ T 세포의 입양 전달은 마우스에서 CD19+ B-세포 악성종양의 제어를 개선시키는 것으로 밝혀져 있다(Singh H et al, Cancer Res, 2011, 71(10: 3516-3527).

[0569] 입양 면역요법에서 IL-12-및 IL-18-배양된 종양-드레이닝 림프절 세포(tumour-draining lymph node cell: TDLN)는 IL-12 또는 IL-18 단독으로 생성된 T 세포보다 더 효율적으로 폐 전이를 근절하는 것으로 밝혀져 있다(Li Q et al, Cancer Res, 2005, 65(3): 1063-70). 이것은 IL-12 및 IL-18이 Th1 표현형에 대해 항체-활성화된 TDLN 세포를 상승적으로 분극시킴으로써 강력한 CD4+ 및 CD8+ 항-종양 효과기 세포를 생성하는 데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다(상기 Li 등의 문헌 참고). 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 강력한 CD4+ 및 CD8+ 항-종양 효과기 세포를 생성시키는 데 사용된다.

[0570] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 IL-18R의 발현을 증가시킨다는 것을 입증하였다.

[0571] 일 실시형태에서, 세포 또는 세포 집단에서 IL-18R 발현 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포

함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단으로부터의 세포 또는 세포의 집단에서 IL-18R발현 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서 IL-18R 발현 수준과 비교할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0572] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 NK 세포의 IL-18 반응성을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 NK 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0573] 일 실시형태에서, IL-18에 대한 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준은, IL-18에 대한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된 세포 또는 세포 집단의 반응성의 수준을, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 IL-18에 대한 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)의 반응성의 수준에 비해서 증가할 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 증가된다.

[0574] 바람직한 실시형태에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

[0575] 상기에 논의된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 펩타이드는 CD8+ T 세포의 증식(도 20, 도 21 및 도 27) 및 CD28+ CD8+ T 세포의 증식(도 24)을 증가시킨다. 따라서, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드는 예를 들어, 입양 세포 요법을 위해 생체내 및 시험관내에서 세포 및 세포 집단의 증식을 유도하는 데 사용될 수 있다.

[0576] IL-12 수용체 발현은 IL-12 결합 및 Th1 면역 반응의 유도와 상관관계가 있다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성 펩타이드가 PBMC(도 17) 및 T 세포(도 25)에서 IL-12R의 발현을 촉진시킨다는 것을 입증하였다.

[0577] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 Th1 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0578] T 세포는 IL-21을 사용한 입양 세포 요법을 위해 시험관내에서/생체외에서 확장될 수 있다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성 펩타이드가 IL-21의 발현을 촉진시킨다는 것을 입증하였다(도 28).

[0579] 산화성 스트레스

[0580] 지질 과산화 과정의 다양한 단계를 차단함으로써, 면역 반응을 향상시키는 제제의 능력은 거의 40년 동안 공지되어 있었다(Terrell Hoffeld J, Eur J Immunology, 1981, doi.org/10.1002/eji.1830110505).

[0581] 또한 인지질 하이드로퍼옥사이드의 스캐빈저는 병원성 감염의 존재 하에서 최근 활성화된 T 세포의 생존 및 확장에 중요하다(Matsushita M et al, JEM, 2015, doi.10.1084/jem.20140857).

[0582] 면역 억제 세포, 예컨대, 골수-유래 억제 세포(myeloid-derived suppressor cell: MDSC)는 노화에 따라 확장되며, 이러한 MDSC의 확장은 또한 주로, 신체에서 가장 강력한 산화제 중 하나인 퍼옥시나이트리트를 포함하는 산소 종의 생성으로 인해서, T-세포 반응을 억제하는 데 기여한다(Gabrilovich DI & Nagaraj S, Nat Rev Immunol, 2009, 9(3): 162-174; Bueno V et al, Age (Dordr), 2014, 36(6): 9729).

[0583] 산화질소와 슈퍼옥시전(superoxygen) 라디칼(퍼옥시나이트리트 형성 유도) 간의 반응은 생체막 및 지질단백질에 존재하는 다중불포화 지방산의 지질 과산화를 유도하고, UVB 조사는 산화성 손상 및 세포 사멸을 초래하는 높은 수준의 퍼옥시나이트리트를 생성한다((Radi R, PNAS, 2018, doi.10.1073/pnas.1904932115; Wu S et al, Photochem Photobiol, 2010, 86(2): 389-396; Bartesaghi S & Radi R, Redox Biol, 2018, 14: 618-625).

[0584] 또한, 담배 연기-유도된 산화성 스트레스는 CD40L-성숙 수지상 세포(DC)에 의한 IL-12 생산의 생성을 억제하는 것으로 밝혀져 있고(Kroening PR et al, J Immunol, 2008, 181(2): 1536), 이러한 사이토카인은 활성 Th1 면역 반응에 필요하다.

[0585] 본 발명자들은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 DC에 의한 IL-12의 CD40L-매개된 생산을 유도할 뿐만 아니라 세포막에서 지질 과산화를 저해한다는 것을 입증하였다(예를 들어, 도 39).

[0586] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 산화성 손상을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포 또는 세포 집단의 집단을 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 Treg 세포 또는 Treg 세포를 포함하는 세포의 집단이다.

[0587] 일 실시형태에서, 산화성 손상의 수준은, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉된

세포 또는 세포 집단에서의 산화성 손상의 수준이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 펩타이드와 접촉하지 않은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 대조군)에서의 산화성 손상의 수준과 비교하여 감소될 때, 또는 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉 전의 수준을 접촉 후의 수준과 비교할 때 감소된다.

[0588] 일 실시형태에서, 감소 수준은 적어도 10%, 대안적으로 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%이다. 이러한 감소를 측정하는 방식은 당업자에게 공지되어 있다.

[0589] Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)는 CD14 음성 수지상 세포의 집단을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0590] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 수지상 세포 또는 수지상 세포의 집단의 증식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 수지상 세포 또는 수지상 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 수지상 세포의 집단의 증식을 증가시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 펩타이드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0591] 알츠하이머병(AD)

[0592] 알츠하이머병은 치매의 주요 원인이며, 퇴화 및 뉴런의 손실, 노인성 플라크 및 신경섬유 엉킴의 형성을 특징으로 한다.

[0593] PD-1/PD-L1 경로 면역관문 저해제는 최근에 뇌에서 단핵구-유래 대식세포 집단의 IFNγ 의존적 증가를 촉발하여 대뇌 아밀로이드의 제거 및 인지 결함의 개선을 유도함으로써 트랜스제닉 마우스 모델에서 AD를 개선시키는 것으로 보고되었다(Baruch K et al, Nature Med, 2016, 22: 135-37). 본 명세서에 기재된 바와 같이, 적어도 일부 실시형태에서 본 발명에 사용되는 화합물은 PD-1/PD-L1 상호작용에 의해 억제된 면역 반응을 구제할 수 있다.

[0594] 또한, Lck는 신경돌기 과성장의 조절에 관여하며, 임상 보고서는 AD 환자의 해마에서 Lck의 하향 조절된 수준을 기재하였다(Hata R et al, BBRC, 2001, 284: 310-316). 실제로 인간 Lck 유전자는 알츠하이머병-연관 유전자 연결 영역 1p34-36에 위치되어 있다(Blacker D et al, *Hum Mol Genet,* 2003, 12: 23-32). 포유동물 뇌에서 Lck의 최근 시험관내 및 생체내 기능적 특징규명은 Lck가 AD에서 가장 두드러진 과정인 기억의 획득 및 유지에 중요한 매개체임을 시사한다(Kim E-J et al, Cell Mol Life Sci, 2012, doi: 10.1007/s00018-102-1168-1).

[0595] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 면역관문 저해제 PD-L1의 존재 하에서 T 세포주상에서 IL-2Rα 발현을 구제할 수 있다는 것을 입증하였다(도 12, 실시예 11).

[0596] HIV 감염

[0597] Lck는 CD4 및 CD8 둘 다와 회합되지만, Lck 활성도는 CD4와 회합될 때 더 높다(Delves PJ and Roitt IM, editors. 1998. Encyclopaedia of Immunology, Second Edition. San Diego: Academic Press). HIV는 CD4+ 세포의 고갈을 특징으로 하며, Nef가 없는 HIV 균주는 AIDS로 진행하지 않는다(Olszewski A et al, 2004, PNAS. USA, 101(39): http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/39/14079). HIV 감염에서 Lck의 중요한 역할은 널리 인지되어 있다. 예를 들어, 비활성 Lck를 발현하는 세포는 가속화된 바이러스 복제를 나타내는 반면, 정상 또는 상승된 효소 활성을 갖는 Lck를 발현하는 세포는 초기 내인성 Lck 효소 활성에 비례하여 바이러스 복제 지연을 나타낸다(Yousefi S et al, 2003, Clinical & Experimental Immunology, 133(1): 78-90).

[0598] Nef 유전자는 영장류 렌티바이러스(인간 면역결핍 타입 1: HIV-1), HIV-2 및 유인원 면역 결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus: SIV)에 고유하며, 약 25Kd의 미리스토일화된 막-회합된 단백질을 암호화한다(Greenway AL et al, 1999, J Virol., 73(7): 6152-6158). 세포 수준에서, Nef는 CD4, 인터류킨-2 수용체, MHC 클래스 I을 비롯한 세포 표면 수용체의 수준을 감소시키고, T-세포 신호전달을 방해하며, 특정 사이토카인 생산을 손상시킨다(상기 문헌[Reviewed in Greenway AL et al, 1999]에서의 검토 참고).

[0599] Nef는 T-세포 제한된 Lck 타이로신 키나제(림프구 단백질 타이로신 키나제)와 직접 상호작용하고, 시험관내 및 온전한 세포 둘 다에서 Lck 키나제 활성도를 감소시켜, 근위 및 원위 Lck-매개된 신호 사건 둘 다의 손상을 초래한다(Collette Y et al, 1996, JBC, 271: 6333-6341). Nef에 대한 Lck 결합은 다른 비리온 또는 세포 단백질을 필요로 하지 않는데, 그 이유는 Lck의 촉매 활성 저해는 정제된 Lck와 HIV-1 Nef 또는 SIV 단백질 간의 결합

에 의해 발생하는 것으로 밝혀져 있기 때문이며, 이는 Nef 매개된 병인론의 복잡성을 설명한다.

[0600] 구체적으로, Nef는 Lck의 SH3 도메인에 결합하여 Lck 촉매 활성을 저해하며(Collette Y et al, 1996, JBC, 271: 6333-6341; Greenway A et al, 1996, J Virol, 70(10): 6701-6708; Greenway AL et al, 1999, J Virol, 73(7): 6152-6158); Lck의 활성제의 개발은 항-레트로 바이러스 치료제 개발을 보완할 수 있다.

[0601] 이전 연구는 HIV 감염 환자에서의 IL-2 요법이 항레트로바이러스 요법 단독 사용보다 임상적 이점을 추가하지 않았으며, CD4+ 세포 수치의 실질적이고 지속적인 증가가 관찰되었음을 시사하였지만(The INSIGHT-ESPRIT Study Group and SILCAAT Scientific Committee, N Eng J Med, 2009, 361: 1548-1559), Lck는 T 세포에서 인터류킨-2 (IL-2) 자극 시 활성화되는 유일한 Src 패밀리 키나제이다(Brockdorff J et al, 2000, Eur Cytokine Netw., 11(2): 225-231). 그러나, 보다 최근의 데이터는 HIV DNA 또는 단백질 백신과 함께 보조제로서 IL-2 투여가 미래 HIV 백신 연구 설계에서 고려되어야 한다는 것을 시사하고(Baden LR et al, 2011, J Infect Dis, 204(10): 1541-1549), IL-2는 사실 일부 감염된 세포주에서 HIV-1 복제를 저해한다(Raphael MO et al, 2013, JBC, doi: 10.1074/jbc.M113.468975).

[0602] 이러한 보고서는, T 세포 발달 및 활성화 및 따라서 적응 면역 반응에 대한 Lck의 중요성을 강조한다(Stirnweiss A et al, 2013, Sci Signal, 6(263):ra13. Doi: 10.1126/scisignal.2003607).

[0603] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 HIV 감염을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0604] 다른 병원성 감염

[0605] 바이러스, 박테리아, 원생동물 및 기생충에 의한 감염에 저항하는 적절한 면역 반응은 특정 키나제 활성이 부족하여, 미생물의 세포로의 복제 및 진입 촉진 및/또는 효과적인 면역 반응 저해로 인해 손상될 수 있다.

[0606] 예를 들어, 많은 박테리아 병원체는 숙주 세포와 밀접하게 연관된다. 일부는 세포 표면에 부착되어 유지되지만, 나머지는 내재화된다. 장 점막 내의 γ/δ 상피내 T 세포는 인접한 상피 세포와의 상호작용을 통해 침입 박테리아의 존재를 감지할 수 있고, 장내 미생물과의 항상성을 유지하는 면역 방어 계층의 필수 성분이다(Ismail AS et al, PNAS, 2011, 108: 8743-8748).

[0607] 박테리아가 침입 후 세포 내부에서 생명 주기를 확립할 수 있는 고도로 보존된 진화 수단은 박테리아에 의해서 생산된 UDP-당 가수분해효소를 사용하는 것이다. 이들은 UDP-당 가수분해효소 및 5개의 주요 뉴클레오타이드 활성을 갖는 이중-기능성 효소이다. 예를 들어, 이 콜라이는 UDP-당 가수분해효소를 생성시킬 수 있고, 그 생성물은 Lck 활성을 상당히 저해한다(Berger SA et al, JBC, 1996, 271: 23431-23437). 구체적으로, 이 콜라이에 의한 HeLa 세포의 감염 후, 이러한 상대적으로 비특이적인 뉴클레오타제는 Lck 저해에 직접적으로 책임이 있는 아데노신의 축적을 초래한다. 또한, UDP-당 가수분해효소의 과발현은 HeLa 세포 내부에서 박테리아 생존을 향상시키는 것으로 밝혀져 있다. 세포 내 ATP의 손실은 Lck 저해의 원인이 아니며, 오히려 그것은 ADP, AMP 및 아데노신의 축적이며(상기 Berger 등의 문헌 참고), 다른 병원체가 감염 상황 동안 이러한 효소를 또한 사용할 수 있다는 것이 연구자들에 의해 제안되었다. 실제로, 칸디다 아리칸스(*Candida Albicans*) 배양물은 호중구 기능을 저해의 원인으로 밝혀진 아데노신을 함유한다(Smail EH et al, J Immunol, 1992, 148: 3588-3595).

[0608] 세균성 이질의 원인 제제인 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*)는 또한 시험관내에서 활성화된 CD4+ T 세포를 침입하고, 화학유인제 자극으로의 T 세포 이동을 저해하고, 또한 생체내에서 적응 면역 프라이밍 부위, 즉 림프절 내에서 T 세포 역학을 손상시킴으로써, 박테리아에 대한 효율적인 면역 반응의 유도를 방지하는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Nothelfer K et al, J Exp Med, 2014, 211(6): 1215; Salgado-Pabon W et al, PNAS, 2013, 110: 4458-4463]에서 검토됨). 더욱이, Unc119로의 시겔라증(shigellosis) 치료의 마우스 모델에서 시겔라 감염을 억제한다((Vepachedu R et al, PLOS one, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005211). 반대로, Unc119 넉다운은 박테리아 침입 및 치사율을 향상시키는 것으로 밝혀져 있다. 유사하게, THP-1 세포의 마이코박테리움 소 BCG 감염의 향상된 감염성은 Unc119 넉다운 후 보고되어 있고, Unc119의 작용이 시겔라에 특이적이지 않는다는 것을 나타낸다(상기 Vepachedu 등의 문헌 참고). Unc119의 저해 효과는 조사되지 않은 Src 패밀리 키나제에 의한 매개가 아니라 Abl 패밀리 키나제와의 상호작용에 기인한다. 추가로, Unc119 넉다운은 사용된 세포주에서 시겔라 감염을 2배로 증가시키는 것으로 밝혀져 있다. 본 발명 시까지, 선택적인 Lck 활성화제는 이전에 기재된 적이 없다고 여겨진다(Bae O-N et al, J. Neuroscience, 2012, 32(21):7278-7286). 최근 보고된 데이터는 Unc119가 T 세포에서 Lck를 활성화시킬 수 있다는 것을 시사하지만, Unc119 및 SH3 펩타이드 모티프 둘 다는 Lck뿐만 아니라 Src 키나제 패밀리 내에서 Hck, Lyn 및 Fyn 키나제 구성원도 활성화시키는 것으로 밝혀져 있다

(Cen O et al, JBC, 2003, 278: 8837-8845; Gorska MM et al, J Exp Med, 2004, 199 (3): 369-379). 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 대용물 항생제로 작용하거나 또한 전통적인 항생제 요법에 대한 보완 요법으로 작용할 수 있고, 본 발명은 이러한 모든 용도로 확장된다.

[0609] 말라리아는 간세포 및 적혈구를 감염시키는 플라스모듐(*Plasmodium*) 종에 의해 유발되는 매우 널리 퍼진 질환이다. CD4+ T 세포는 만성 혈액-상태 말라리아를 보호하고, CD8+ T 세포의 고갈은 기생충의 제거를 지연시켜, 만성 질환에 대한 보호에서 이러한 세포를 암시한다(문헌[Wykes MN et al, *Cell Reports*, 2013, 5: 1204-1213]에서 검토됨). 더욱이, 세포 예정사-1 수용체(PD-1)를 통한 신호전달이 HIV-특이적 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포를 "고갈"시키는 것으로 생각되는 것처럼, PD-1은 말라리아 기생충 특이적인 CD8+ T 세포의 손실 및 고갈을 매개하고, CD4+ T 세포의 기능을 더 적은 정도로 매개하는 것으로 밝혀져 있다(상기 Wykes 등의 문헌 참고). 중요하게는, 최근 PD-1 넉아웃 마우스에서 CD8 + T 세포에 의한 IFNy 분비가 말라리아 감염에 대한 보호와 관련이 있다는 것이 입증되어 미래의 말라리아 백신이 CD8 + T 세포의 반응성을 높이는 것을 고려해야 한다는 제안으로 이어졌다(Wykes MN et al, Scientific Reports, 2016, 6: 26210). 본 명세서에 기재된 바와 같이, 적어도 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법에 따라 사용되는 화합물은 예를 들어, 고갈된 뮤린 CD4+ T 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 및 예를 들어, CD8+ 발현 주카트 세포에서 IFNy 분비를 향상시킬 수 있고, 이로 인해서, 말라리아의 치료에서의 역할 및 이를 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물의 사용이 명확하게 포함된다는 것을 추가로 나타낸다.

[0610] 예를 들어, 헤르페스바이러스 사이미리 타이로신 키나제 상호작용 단백질(Tip)이 Lck와 물리적으로 상호작용하고, 안정적으로 발현하는 세포주에서 Lck 활성을 저해한다는 점을 고려할 때, T-림프친화성 바이러스, 예를 들어, 헤르페스바이러스는 본 발명에 의해 구현된 Lck 활성화제 및 방법에 대한 특정 표적이다(Isakov N and Biesinger B, Eur J Biochem, 2000, 267(12): 3413-21).

[0611] 추가로, 에볼라 바이러스 및 마르부르크 바이러스 속으로 대표되는 필로바이러스는 인간 및 비-인간 영장류에서 치명적인 출혈열을 야기한다. 이 바이러스는 B 림프구 및 T 림프구의 수를 감소시킴으로써 면역계를 공격한다. B 세포 및 T-세포, 예컨대, CD4 및 CD8 림프구는 면역 조절제로서 사이토카인을 생산하는데 필요하며, 며칠 내에 사망하는 환자는 아포토시스로 인해서 B 세포 및 T 세포 수가 감소하는 것으로 밝혀져 있다. T 세포는 바이러스 감염된 세포의 파괴를 위해 활성화될 필요가 있고(Wauquier N et al, Public Library of Science, 2010, 4(10): 837-847), 비활성화된 에볼라 자이르 바이러스에 대한 인간 혈액 말초 단핵 세포의 노출이 IL-2 생산 감소를 초래하는 것으로 밝혀져 있다(Yaddanapudi K et al, The FASEB journal, 2006, 20: 2519-2530). 따라서 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 사용은 이러한 질환에 대한 T-세포 활성화 및 IL-2 생산을 자극하는 데 있어서 응용을 갖는다.

[0612] 더욱이, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 사용은 또한 결핵과 같은 다른 감염에서 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 대부분의 개체는 마이코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis: MTB)를 제어하기 위해 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포가 필요하지만, MTB를 근절하는 데 실패한다. CD4+ T 세포에 의한 인식을 회피하기 위해서 MTB에 의해서 사용되는 분자 기전 중에는 MTB 벽에서 가장 풍부한 당지질 중에 하나인 당지질, ManLAM에 의한 신호전달이 있는데, 이것은 Tyr 505에 대한 포스포릴화가 아니고 Lck 포스포릴화를 저해함으로써 TCR 신호 전달을 방해한다(Mahon RN et al, 2012, Cell Immunol. 275(1-2): 98-105; Mahon RN III, PhD Dissertation, 2010, http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=case1275668686).

[0613] IL12RB1은 마이코박테리움 튜버쿨로시스 감염에 대한 인간 내성에 필수적인 것으로 공지되어 있다. 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL12RB1 발현을 유도한다는 것을 입증하였다(예를 들어, 실시예 28, 도 25, 실시예 15, 도 17).

[0614] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 마이코박테리움 튜버쿨로시스를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화 단백질을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0615] Lck 활성을 상향 조절함으로써 본 발명에 따라 저해 또는 치료될 수 있는 다른 감염은 전염병 및 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스)를 포함한다. B형 간염은 간 손상 및 염증으로 이어지는 가장 흔한 바이러스이고, C형 간염 바이러스와 같이 T 세포 고갈과 연관이 있다(Ye B et al, Cell Death & Disease, 2015, 6, e1694). 전염병 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)의 병인제(aetiological agent)에 대한 주요 발병력 인자는 타이로신 포스파타제 YopH이다. 박테리아는 YopH를 숙주 세포에 주입하고, Lck는 활성 YopH를 함유하는 세포에서 양성 조절 부위 Tyr 394에서 탈포스포릴화된다고 밝혀져 있다. Lck의 턴 오프에 의해

서, YopH는 제1 단계에서 T 세포 항원 수용체 신호전달을 차단하여, 이 치명적인 질환에 대한 보호 면역 반응의 발달을 효과적으로 방지한다(Alonso A et al, 2003, JBC, 279: 4922-4928). C형 간염에서, C형 간염 바이러스 코어 단백질은 T 세포에 결합하고, Lck 활성화를 저해하는데, 이는 코어 단백질이 T 세포 활성화의 극 초기 이벤트를 저해함을 시사한다(Yao SQ et al, 2004, J Virol, 78(12): 6409-6419).

[0616] 일반적인 감염, 수술 후 감염 또는 심지어는 암 재발에 대한 민감성과 관련하여 수혈의 위험은 1973년부터 공지되었으며, 최근 메타-분석은 적혈구 수혈 후 의료 관련 감염의 위험을 재확인해 주었다(Rhode JM et al, JAMA, 2014, 311(13): 1317-1326; Blumberg N et al, Transfusion, 2007, 47(4): 573-81; Fergusson D et al, Can J Anaesth, 2004, 51(5): 417-24). 수혈 유도 면역 조절의 제안된 기전은 명확하지 않지만, 역할을 하는 것으로 간주되는 문서화된 변화는 CD4/CD8 비율 감소 및 IL-2 분비 감소를 포함한다(Kirkley SA, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1999, 6(5): 652-657). 따라서 수혈과 관련하여 Lck 활성화제의 투여는 이러한 병태 중 하나 이상의 위험을 개선시킬 수 있다.

[0617] 더욱이, 림프구-활성화 살해 세포를 생성시키기 위한 동계 비장 세포의 시험관내 IL-2 처리는 열 손상의 뮤린 모델에서 패혈증-관련 사망의 IL-2 예방을 향상시키는 것으로 밝혀져 있고, 활성화된 항원 자극의 부재 하에서 Lck는 IL-2 생산을 자극시키는 것으로 밝혀져 있다(Mendez MV et al, J Surg Res, 1993, 54(6): 565-70; Luo K and Sefton BM, Mol Cell Biol, 1992, 12(10): 4724-4732). 더욱이, 프로스타글란딘 E2(PGE2)는 패혈증 동안 T 세포 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있으며, 패혈증 동안 T 세포 억제의 신생아 스프라그-돌리 래트(Sprague-Dawley rat) 모델에서 IL-2 생산 감소를 동반하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 억제는 COX-2 저해제로 개선됨으로써 이러한 과정에서 PGE2를 의미한다. 이를 고려하고, PGE2에 대한 T 세포의 노출이 Lck의 비활성화 및 ZAP70의 포스포릴화 감소로 이어지기 때문에(Dallal O et al, Biol Neponate, 2003, 83(3): 201-7; Chemnitz JM et al, Cancer Res, 2006, 66: 1114), 본 발명에 따른 Lck 활성화제로의 처리는 패혈증 동안 T-세포 활성의 자극을 통해서 면역 반응의 자극 및 IL-2 생산의 자극에 대한 응용을 가질 수 있다.

[0618] 따라서 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 다양한 응용 분야에서 광범위하게 사용된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 그리고/또는 본 발명에 의해 구현된 방법에 따라서 Lck 활성화제에 의해 치료될 수 있는 질환 및 병태는 Lck의 최적 발현 미만 또는 Lck의 저해 또는 Lck 또는 Lck 활성의 하향 조절, 상피내 및 점막내 상주 T 세포 기능장애와 관련된 장애 및/또는 병원성 감염(예를 들어, 만성 감염 포함)에 대한 반응으로 인한 T 세포 활성화에 대한 요건, 병원성 감염으로부터의 패혈증(예를 들어, 만성 패혈증) 및 수혈 관련 패혈증, 암 및 피부 및 상피 악성종양; 림프종, 호지킨병 및 백혈병을 포함한 일반적인 암(예를 들어, 유방암, 결장암, 결장직장암 및 전립선암)의 예방 또는 치료; T 세포 기능을 억제하는 요법(예를 들어, 암 및 비암 병태에 대한 요법)에 의해 유발되는 면역 억제; 중증 복합 면역 결핍 증후군(Severe Combined Immune Deficiency Syndrome: SCID)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역 결핍 장애, CD4/CD8 T 세포의 생존을 필요로 하는 병태 및 T 세포 수치 감소를 유발하는 병태 또는 장애(예를 들어, 감염, 예컨대, 폐렴, 인플루엔자, 헤르페스 감염); 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충에 의한 병원성 감염; T 세포 고갈(예를 들어, 암 또는 비암 병태(예컨대, 병원성 감염으로부터의 패혈증(예를 들어, 만성 패혈증)) 및/또는 암 또는 비암 병태에 대한 치료) 및 T 세포에서의 면역관문 차단(예를 들어, 암 또는 만성 패혈증과 관련됨) 및 T 세포 활성화 경로에서의 노화 관련 변화를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0619] 다양한 리간드-수용체 상호 작용이 면역관문 신호전달 저해에 기여하는 것으로 공지되어 있고(예를 들어, 문헌 [Pardoll DM, Nature Reviews Cancer, 2012, 12:252-264] 참고), 본 발명의 적어도 일부 실시형태에서, T 세포 기능은 이들 상호작용(예를 들어, PD-1/PD-L1 상호 작용) 중 하나 이상을 저해함으로써 회복될 수 있다. 따라서, 적어도 일부 실시형태에서, 본 발명은 고갈된 T 세포에서 T 세포 신호전달의 면역관문 차단/저해를 극복하기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 투여로 명확하게 확장된다.

[0620] 병원체 및 병원성 감염의 추가 예는 바이러스 감염, 예컨대, 폭스바이러스, 헤르페스바이러스 이외의 다른 T-림프성 바이러스, 믹소바이러스, 레오바이러스, 엔테로바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스, 구제역 바이러스, 간염 유발 바이러스(예를 들어, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스 및 C형 간염 바이러스), 뇌염 및 맥락수막염, 유인원 면역 결핍 바이러스, SARS, 코로나바이러스, 뎅기열 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 아레노바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 리노바이러스, 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus: HPV), 호흡기 융합체 바이러스, 인간 거대세포 바이러스 및 수두-대상 포진 바이러스(varicella-zoster virus: VZV); 결핵 이외의 다른 마이코박테리아 감염에 의한 것(예를 들어, 나병), 그램 양성 박테리아 및 그람 음성 박테리아, 예컨대, 그램 양성 구균(Gram positive cocci) 및 그램 음성 구균 및 그램 음성 바실루스균(Gram negative bacilli) 및 코코-바실루스균, 용혈성 연쇄상구균(haemolytic

streptococci), 장구균(enterococci), 및 파상풍, 디프테리아, 클로스트리디알 및 보툴리누스중독 감염과 같은 독소 생성 박테리아에 의해서 유발되는 질환; 원생동물 감염, 예컨대, 아메비아증, 말라리아(피, 팔시파룸(*P. falciparum*)의 원인균), 리슈마니아증, 트리파노소마증, 톡소플라모증 및 편모충증; 및 기생충 감염, 예컨대, 장 선충류, 필라리아증, 조충류(cestodes)(촌충) 및 에키노코쿠스 감염(echinococcal infection)을 포함한다.

[0621] 상기에 기재된 바와 같은 질환 또는 병태의 예방 또는 치료에서의 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 사용 이외에, 본 발명의 다른 실시형태에서 본 발명에 따른 Lck 활성화제는 줄기세포 요법, 배아 줄기세포 자가-재생 및 배아 줄기세포(예를 들어, 배반포 배아)의 다능성의 유지 및 이러한 모든 용도가 본 발명에 명확하게 포함된다.

[0622] 특히, 유도 만능 세포(induced pluripotent cell)는 배아 줄기세포의 정의 특성을 유지시키는데 중요한 유전자 및 인자를 발현하도록 함으로써 배아 줄기세포-유사 상태로 유전적으로 재프로그래밍된 성체 세포이다. 성체 세포가 줄기세포가 되도록 프로그래밍된 후에만, 이것은 목적하는 생식 세포층으로 분화하도록 유도할 수 있다. Src-패밀리 타이로신 키나제의 구성원은 인간 배아 줄기세포의 분화에 필수적이지만, Lck 발현 수준은 배아 줄기세포 분화의 함수로서 극적으로 감소된다(Zhang X et al, Stem Cell Res, 2014, 13(3 Pt A):379-389).

[0623] 백혈병 저해 인자(leukemia inhibitory factor: LIF)는 마우스 배아 및 유도 만능 줄기세포의 배양 및 유도에 사용되는 주요 외인성 인자 중 하나이고, 마우스 배아 줄기세포 자가-재생의 중요한 조절자인 "신호 전달인자 및 전사 활성화인자 3"(signal transducer and activator of transcription 3: STAT3)을 활성화시킨다(Dang-Nguyen TQ et al, Molecular Reproduction and Development, 2014, 81:230). 결국, STAT3는 계통-특이적 분화 프로그램의 활성화를 방지함으로써 중배엽 및 내배엽 계통으로의 분화를 저해하는 것으로 공지되어 있다(Graf U et al, Genes, 2011, 2(1): 280-297). 따라서 STAT3은 미분화 배아 줄기세포 표현형 유지에 필수적이다(Raz R et al, PNAS USA, 1999, Cell Biology, 96: 2846-2851).

[0624] 중요하게, STAT3의 활성화는 다능성 유도에 대한 제한 인자이며, 이의 과발현은 다능성을 확립하기 위한 추가 인자에 대한 요건을 제거한다(Yang J et al, Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 319-328). 따라서, STAT3 신호전달은 STAT3이 자가 재생 인자의 발현을 촉진시키기 때문에 미경험 다능성을 지배적으로 지시하는 마스터 리프로그래밍 인자 중 하나인 것으로 간주된다(Li Y-Q, Cellular Reprogramming, 2010, 12(1): 3-13). Lck는 STAT3을 직접 활성화시킨다고 밝혀져 있고, 외인성 Lck에 의한 STAT3의 활성화는 Lck-특이적 저해제 PP1에 의해 약화된다(Lund TC et al, Cell Signal, 1999, 11(11): 789-796). 따라서, 본 발명에 따른 Lck 활성화제는 Lck 활성의 자극을 통해 STAT3 활성을 상향 조절하는 역할을할 수 있고, 따라서 줄기세포 자가-재생의 촉진 및 유지에 적용될 수 있다.

[0625] 추가로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 T 세포, 세포 매개 면역을 비롯한 면역 및 면역 반응의 부스팅, 세포 면역 구제, T 세포 수용체 신호전달의 상향 조절, 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IL-2, IFN-γ 및 TNF-α로부터 선택됨)의 상향 조절 생산, T-세포의 활성회복, T-세포 면역 반응(들)의 활력회복 및 보조제(예를 들어, 백신 조성물에서 또는 항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해서 개체에게 별개로 투여하기 위함)로서의 특정 응용을 갖는다.

[0626] 따라서, 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명에 의해 구현된 하나 이상의 Lck 활성화제를 포함하는, 개체의 백신접종용 백신 조성물이 본 명세서에서 추가로 제공된다. 백신은 백신의 투여에 의해 면역 반응이 생성되는 임의의 적합한 항원(들) 및 선택적으로 항원(들)에 대한 면역 반응을 자극하기 위한 임의의 추가 보조제를 포함할 수 있다.

[0627] 적어도 일부 실시형태에서, T 세포 수용체(TCR)의 자극은 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 사용한 치료로부터 유래하는 T 세포 생리학적 결과(예를 들어, IL-2 사이토카인 생성, T 세포 신호전달 상향 조절 등)를 달성하기 위해 필요할 수 있다. 즉, 기본적으로 T 세포를 활성화시키기 보다는, Lck 활성화제는 T 세포 수용체 자극의 생리학적 결과를 향상시키는 역할을할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 방법의 적어도 일부 실시형태에서, 투여된 Lck 활성화제에 의해 치료되는 T 세포는 자극된 T 세포이다.

[0628] 본 발명의 하나 이상의 실시형태에 따른 Lck 활성화제에 반응하는 T 세포 집단은 예를 들어, 상피내 T 세포, 점막내 T 세포, γ/δ T-세포, 수지상 표피 T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 세포독성 T 세포, 조절 T 세포(Treg) 및 상기 세포 집단의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0629] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제 또는 이의 성분(들)(예를 들어, 다양이온성 펩타이드(PP), 증강 펩타이드(AP/P) 및/또는 구조식 II의 화합물)은 당업자에게 널리 공지된 합성 또는 재조합 기술에 의해 제공될 수 있다.

추가로, 본 발명에 따른 Lck 활성화제의 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양이온성 펩타이드 및/또는 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)는 유전자 암호 또는 아미노산 유사체에 의해 암호화되지 않은 아미노산 또는 아미노산들을 혼입할 수 있다.

[0630] 예를 들어, L-아미노산보다는 하나 이상의 D-아미노산, 베타-아미노산 및/또는 호모 아미노산이 사용될 수 있다. 실제로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드(PP) 및/또는 증강 펩타이드는 부분적으로 또는 전체적으로 D 아미노산 또는 예를 들어, D-아미노산(들), 베타-아미노산(들), 호모 아미노산(들), 베타-호모 아미노산(들), L-아미노산(들) 및 L-또는 D-모 아미노산 중 하나 이상의 조합물로 이루어질 수 있다. 베타 아미노산의 예는 양이온성 아미노산의 베타 변이체 형태를 비롯한, 베타-알라닌(NH_2-CH_2-CH_2-COOH), 베타-페닐알라닌, 베타-트립토판, 베타-타이로신, 베타-류신 등을 포함한다. 아미노산의 호모 변이체 형태의 예는 표준 L-시스테인에 비해서 추가 CH_2기를 갖는 호모-시스테인을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드(PP) 및/또는 증강 또는 다른 펩타이드는 예를 들어, L-아미노산, D-아미노산 또는 L-, D-아미노산의 혼합물 및/또는 상기에 기재된 바와 같은 다른 아미노산 유형을 포함할 수 있다. 예를 들어, D-아미노산을 포함하는 펩타이드(들)의 사용은 펩티다제 활성(예를 들어, 엔도펩티다제)을 저해함으로써, 안정성을 향상시키고, 펩타이드의 반감기를 증가시켜 생체내에서 Lck 활성화제를 증가시킬 수 있다.

[0631] 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 융합 단백질은 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법에 사용하기 위해 3차원 입체배좌로 구속될 수 있다. 예를 들어, 그것은 측쇄 구조로 합성될 수 있거나 달리는 생체 내에서 공지된 안정적인 구조를 갖는 분자에 혼입될 수 있거나, 향상된 강성 및 이로 인한 생체내 안정성을 제공하도록 고리화될 수 있다. 펩타이드, 융합 단백질 등의 다양한 고리화 방법이 공지되어 있다. 펩타이드는 4개의 상이한 경로, 즉, 머리에서 꼬리로(C-말단에서 N-말단으로), 머리에서부터 측쇄로, 측쇄에서 꼬리로 또는 측쇄에서 측쇄를 통해 고리화될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 펩타이드는 펩타이드 또는 융합 단백질을 따라서 서로 떨어져 있는 2개의 시스테인 잔기가 제공될 수 있고, 잔기의 티올기의 산화에 의해서 고리화되어 이들 사이에 다이설파이드 브리지를 형성할 수 있다. 고리화는 또한 펩타이드의 N-말단 및 C-말단 아미노산 사이에 펩타이드 결합을 형성함으로써 또는 예를 들어, 라이신 잔기의 측쇄 상의 양으로 하전된 아미노기와 글루타민산 잔기의 측쇄 상의 음으로 하전된 카복실기 사이의 결합 형성을 통해서 달성될 수 있다. 아미노산 사이의 직접적인 화학 결합의 형성 또는 고리화를 달성하기 위한 임의의 적합한 링커의 사용이 또한 당업자의 범주 내에 널리 포함된다. 본 발명에 따른 고리화를 달성하기 위한 특히 바람직한 방법은 락탐기의 형성을 포함하고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 고리화된 형태의 펩타이드 및/또는 Lck 활성화제를 형성하기 위한 락탐화(lactamisation)의 사용의 명확하게 포함된다. 적합한 락탐화 방법을 비롯한 고리화를 달성하는 방법은 예를 들어, 문헌[White CJ and Yudin AK., Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nature Chemistry,* June 2011, pp. 509]에 기재되어 있고, 이의 전체 내용은 상호 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0632] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 포함하는 펩타이드 또는 융합 단백질(예를 들어, 다양이온성 펩타이드-증강 펩타이드 모이어티)은 또한 번역후 또는 합성후 번역, 예컨대, 아미노산 잔기의 알킬화 또는 아세틸화를 야기하는 탄수화물 모이어티의 부착 또는 화학 반응(들) 및 화학 결합의 형성과 관련된 다른 변화를 포함한다.

[0633] 본 발명에 따른 Lck 활성화제를 포함하는 펩타이드(들)의 펩타이드모방체의 사용이 또한 고려되고 본 명세서에 명확하게 포함된다. 예를 들어, 펩타이드모방체는 펩타이드의 하나 이상의 아미노산을 아미노산 유사체로 치환시키는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 아미노산 유사체(들)는 종래의 활성도, 세포 독성도 및/또는 다른 적합한 검정에 의해서 평가될 수 있는 바와 같이 모 펩타이드의 활성도를 본질적으로 감소시키지 않는다.

[0634] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제 및 이의 성분은 통상적인 재조합 기술을 사용하여 화학적으로 합성되거나 생산될 수 있다. 융합 단백질을 암호화하는 핵산은 예를 들어, 둔단(blunt-ended) 말단 및 올리고뉴클레오타이드 링커를 사용하고, 적절한 경우 소화시켜 엇갈린 말단을 제공하고, 응집 단부를 결찰시킴으로써 목적하는 아미노산 서열(들)을 갖는 펩타이드를 암호화하는 별개의 cDNA 단편을 연결함으로써 제공될 수 있다. 대안적으로, DNA 단편의 PCR 증폭은 후속적으로 함께 결찰될 수 있는 상보적인 말단을 갖는 앰플리콘을 생성시키는 프라이머를 사용하여 이용될 수 있다.

[0635] 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 및 융합 단백질은 시험관내에서 발현되고, 포유동물 대상체에게 투여하기 위해 또는 구조식 II의 화합물에 커플링되기 위해서 세포 배양물로부터 정제되어 임의의 적합한 기술을 이용

하는 본 발명에 의해 구현된 방법에서 사용하기 위한 Lck 활성화제를 제공할 수 있다.

[0636] 고체상 펩타이드 합성(SPPS), 클릭 화학 및 스타필로코쿠스(*Staphylococcal*) 소르타제 A 매개된 펩타이드-펩타이드 융합 프로토콜 또는 이들의 조합이 또한 예를 들어, 펩타이드 성분을 함께 결합시키기 위해 그리고/또는 표적화 모이어티, 예를 들어, scFv 등에 커플링시키기 위해, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 제공에 사용될 수 있다. 이러한 합성 방법에 대한 다양한 프로토콜은 널리 공지되어 있고, 임의의 적합한 이러한 방법이 사용될 수 있다.

[0637] 치료제 합성을 위해 Fmoc 또는 *t*-Boc 또는 보호기를 사용하는 SPPS 방법이 특히 바람직하다. 이러한 합성 방법은 널리 공지되어 있고, 탈보호 단계 전후에 세척 단계를 사용하는 반복된 커플링 및 탈보호 사이클을 포함한다. 본 명세서에 기재된 적어도 일부 실시형태에서 전체 치료제는 SPSS에 의해 고체 지지체 상에서 합성될 수 있다. 예를 들어, 구조식 II의 폴리아마이드 모이어티의 합성을 위해, 예를 들어, Fmoc 보호된 2-아미노기를 갖는 유사 지방산 빌딩 블록을 함께 순차적으로 커플링시켜 각각 상기에 기재된 바와 같은 R기 측쇄를 갖는 3 내지 5개의 반복 단위를 갖는 모이어티의 폴리아마이드 골격을 형성할 수 있다. 마찬가지로, Lck 활성화제의 펩타이드 성분(들)을 폴리아마이드 모이어티(PM)에 순차적으로 커플링시켜 C-말단에서 N-말단 방향으로 활성화제를 연장시킨 후 고체 지지체로부터 합성된 Lck 활성화제를 방출시키고, 수집할 수 있다.

[0638] 소르타제 A(Srt A)는 스타필로코쿠스 아우레우스에서 최초에 설명된 박테리아 효소인데, 이것은 절단 서열 LPXTG에서 트레오닌과 글리신 사이를 절단하여 아실-효소 중간체를 생성시키고, 이어서 이것은 N-말단 글리신 잔기와 반응하여 효소를 방출하고, 글리신과 LPXTG 태그된 성분을 펩타이드 결합에 의해서 함께 융합시킬 수 있다(문헌[Levary, D. A *et al.*, "Protein-protein fusion catalysed by sortase A". *PLoS ONE,* April 2011, Vol. 6(4):1-6, e18342] 참조). 또한 문헌[Witte, M.D., "Production of unnaturally linked chimeric proteins using a combination of sortase-catalysed transpeptidation and click chemistry". *Nat. Protoc.* Sep 2013, 8(9): 1808-1819, 및 Bently ML. *et al.*, J. Biol Chem, 2008, 283:14762-14771, 및 Mazmanian SK. et al., 1999, *Science,* 285:760-763]을 참고하기 바란다. 소르타제 A-매개된 단백질 결찰을 통해서 형광 태그 또는 독소에 연결된 재조합 HER1 및 HER2 표적화 항체는 예를 들어, 문헌[Madej MP *et al., Biotechnology and Bioengineering,* 2012, 109:1461-1470, and Kornberger P. and Skeria A., 2014, *mAbs* 6(2): 354-366]에 기재되어 있고, 상기 문헌 모두의 전체 내용은 전문이 본 명세서에 상호 참조에 의해 포함된다.

[0639] 클릭 화학은 예컨대, 하나의 성분상의 말단 아자이드기와 다른 성분 상의 아자이드기 간의 금속 촉매(예를 들어, Cu(I)) 아자이드-알킨 고리화첨가 반응에 의해서 성분이 펩타이드 결합이 아닌 1,2,3 트라이아졸 결합에 의해서 함께 커플링되는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 제공에서 성분을 함께 커플링시키기에 적합한 또 다른 고수율 방법이다. 1,2,3 트라이아졸 결합은 종래의 펩타이드 결합에 대한 등배전자(bioisostere)로서 작용하고, 이것이 가수분해에 저항성이라는 이점을 갖는다(예를 들어, 문헌[Li *et al.,* Click chemistry in peptide-based drug design, *Molecules,* 2013, 18, pp:9797-9817; doi:10.3390/molecules18089797] 참조). 사이클로옥틴, 예컨대, 다이벤조-바이사이클로-옥틴(DBCO)은 마찬가지로 아자이드와 상당히 반응성이고, 상기에 기재된 바와 같은 아자이드-알킨 고리화첨가에 대한 클릭 화학 반응의 대안적인 형태를 제공하거나, 아자이드-알킨 고리화첨가와 조합하여 사용되어 본 명세서에 의해서 구현되는 Lck 활성화제를 제공할 수 있다. 사이클로옥틴계 클릭 합성 반응은, 이들이 구리 또는 또 다른 금속 촉매 없이 수행될 수 있다는 이점을 갖는다.

[0640] 표적화 모이어티, 예컨대, scFv, 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어, 먼저 두 성분의 시스테인 유도체를 제조함으로써 상기에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 링커 모이어티(LM)에 커플링될 수 있는데, 이것은 절단되고, HCl염으로 정제되고, 이어서 말레이미드 커플링을 사용하는 각각의 클릭 시약에 커플링되고, 고체상에서 시스테인의 유리 설프하이드릴을 이용한다. 이어서 표적화 모이어티는 아자이드 또는 알킨(또는 예를 들어, DBCO) 시약으로 유도체화되고, 링커 모이어티(LM)에 커플링된 보완 시약을 통해 클릭 접합이 일어난다.

[0641] 다른 실시형태에서, 포유동물 대상체의 표적 세포는 본 발명에 따라서 치료적 치료(예를 들어, 병원성 감염의 예방 또는 치료)를 달성하기 위해서 숙주 세포(들)의 세포 전사 요소 및 번역 리보솜 복합체를 사용한 핵산의 생체외 발현을 위해서 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질(즉, 키메라 단백질) Lck 활성화제(예를 들어, 다양이온성 펩타이드(PP) 및 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)를 암호화하는 핵산이 형질주입될 수 있다.

[0642] 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 Lck 활성화제 성분(들)(예를 들어, 펩타이드 활성물질 및 증강 펩타이드)을 암호화하는 핵산의 발현을 위해서, 핵산은 전형적으로 먼저 클로닝 벡터에 도입되고, 숙주 세포에서 증폭되며,

그 다음 핵산이 작용하고, 세포의 형질주입에 적합한 발현 벡터(들)에 혼입된다. 발현 벡터는 숙주 세포의 게놈 DNA와 무관하게 핵산 삽입물의 발현을 위해, 또는 숙주 세포에서 핵산 삽입물의 후속 발현을 위해 숙주 세포의 게놈 DNA 내에서의 부위 지향된, 상동성 또는 이종 재조합을 위해 설계될 수 있다.

[0643] 전형적인 클로닝 벡터(예를 들어, 코스미드)는 벡터의 효율적인 복제를 허용하기 위한 복제 기원(ori), 벡터로 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 리포터 또는 마커 유전자 및 삽입 및 관심대상 핵산 서열의 후속 절제를 촉진하기 위한 제한 효소 절단 부위를 포함한다. 바람직하게는, 클로닝 벡터는 제한 부위의 어레이를 혼입한 폴리링커 서열을 갖는다. 마커 유전자는 효소, 예컨대, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), β-락타마제, 아데노신 데아미나제(ADA), 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제(APH), 다이하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR), 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제(HPH), 티미딘 키나제(TK) 또는 예를 들어, 이, 콜라이 *lacZ* 유전자(LacZ')에 의해 암호화된 β-갈락토시다제를 암호화하는 유전자인 약물-내성 유전자(예를 들어, 암피실린 내성을 위한 Amp^r)일 수 있다. 효모 리포터 유전자는 이미다졸 글리세롤포스페이트 데하이드라타제(HIS3), M-(5'-포스포리보실)-안트라닐레이트 아이소머라제(TRP1) 및 β-아이소프로필 말레이트 데하이드로게나제(LEU2)를 포함한다. 발현 벡터는 또한 이러한 마커 유전자를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 클로닝 벡터는 포유류, 효모 및 곤충 세포를 위한 클로닝 벡터를 포함한다. 응용될 수 있는 특정 벡터는 pBR322 기반 벡터 및 pUC 벡터, 예컨대, pUC118 및 pUC119를 포함한다.

[0644] 적합한 발현 벡터는 DNA(예를 들어, 게놈 DNA 또는 cDNA) 삽입물의 발현이 가능한 플라스미드를 포함한다. 발현 벡터는 전형적으로 삽입된 핵산 서열이 작동 가능하게 연결된 전사 조절 제어 서열을 포함할 것이다. "작동 가능하게 연결된"은 핵산 삽입물이 삽입물의 판독 프레임에서 이동 없이 삽입된 서열의 전사를 허용하기 위해 전사 조절 제어 서열에 연결된 것을 의미한다. 이러한 전사 제어 서열은 전사를 개시하기 위한 RNA 중합 효소의 결합을 촉진시키기 위한 프로모터, 전사된 mRNA에 리보솜의 결합을 가능하게 하는 발현 조절 요소, 및 프로모터 활성을 조절하기 위한 인핸서를 포함한다. 프로모터는 다른 세포 유형에서가 아닌 특정 세포 계통에서만 또는 그러한 다른 세포 유형에서 비교적 낮은 수준으로만 핵산 삽입물의 전사를 촉진하는 조직 특이적 프로모터일 수 있다. 발현 벡터의 설계는 형질주입될 숙주 세포, 형질주입 방식 및 핵산 삽입물의 원하는 전사 수준에 따라 달라질 것이다.

[0645] 원핵 생물(예를 들어, 박테리아) 또는 진핵 생물(예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포)의 형질주입에 적합한 수 많은 발현 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 진핵세포의 형질주입에 적합한 발현 벡터는 pSV2neo, pEF.PGK.puro, pTk2, pRc/CNV, pcDNAI/neo, 폴리아데닐화 부위 및 신장 인자 1-α 프로모터를 혼입한 비-복제 아데노바이러스 셔틀 벡터 및 가장 바람직하게는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터를 혼입한 pAdEasy 기반 발현 벡터를 포함한다. 곤충 세포에서의 발현을 위해, 바큘로바이러스 발현 벡터는 pVL 기반 벡터, 예컨대, pVL1392 및 pVL941 및 pAcUW 기반 벡터, 예컨대, pAcUW1을 포함하는 예를 사용할 수 있다. 본 발명의 실시형태에 따라서 포유동물 세포에서 핵산 삽입물의 발현을 위한 바람직한 발현 벡터는 CMV 또는 pEF.PGK.puro와 같은 연장 인자 1α 프로모터를 갖는 플라스미드를 포함한다(Huang, David C.S. *et al.*, *Oncogene* (1997) 14:405-414). pEF.PGK.puro 플라스미드는 SV40 기원, EF-1α 프로모터, 폴리클로닝 부위 및 폴리A 영역을 함유하고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 키메라 단백질을 암호화하는 핵산 삽입물의 발현에 특히 바람직하다.

[0646] 다양한 형태의 발현 벡터가 당업계에 공지되어 있으며 임의의 적합한 그러한 발현 작제물이 의도된 목적을 위해 사용될 수 있다. 또한 시험관내 또는 생체내에서 표적 세포로 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 암호화하는 핵산의 도입을 달성하기 위해 바이러스 전달 방법을 또한 사용할 수 있다. 표적 세포로의 전달을 위해 발현 벡터가 패키징될 수 있는 적합한 바이러스는 아데노바이러스, 백시나 바이러스, 조류, 쥐 및 인간 기원의 레트로바이러스, 단순 포진 바이러스(HSV) 및 EBV를 포함한 헤르페스 바이러스, 파포바바이러스, 예컨대, SV40 및 아데노-연관 바이러스를 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법에 유용한 특히 바람직한 바이러스는 복제 결핍 재조합 아데노바이러스 또는 다른 바이러스를 포함한다.

[0647] 재조합 바이러스는 펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 표적 세포로 전달하기 위해 국소적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산은 또한 종래의 냉각 또는 열 충격 기술 또는 예를 들어, 당업계에 공지된 인산칼슘 공침 또는 전기 천공 프로토콜을 사용하여 시험관내에서 세포내로 전달될 수 있다.

[0648] 형질주입된 세포를 스크리닝하여 핵산 삽입물의 안정적이고 재현 가능한 발현 및 암호화된 펩타이드 또는 융합 단백질의 수반되는 생산을 나타내는 배양물 또는 세포주를 식별할 수 있다. 다양한 숙주 세포 내에서 핵산의 안정적인 통합 및 발현은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 융합 단백

질의 발현에 사용될 수 있는 숙주 세포는 박테리아 및 프로바이오틱 박테리아, 예컨대, 이. 콜리아, 비. 섭틸리스(*B. subtilis*), 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*), 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 및 특히 비. 리넨스(*B. linens*) 박테리아 균주, 효모, 예컨대, 사크로마이세스(*Sacchromyces*) 및 피치아(*Pichia*), 곤충 세포, 조류 세포 및 포유동물 세포, 예컨대, 중국 햄스터 난소 세포(Chinese Hamster Ovary cell: CHO), COS, HeLa, HaRas, WI38, SW480 및 NIH3T3 세포를 포함한다. 재조합 단백질 생산을 위한 이. 콜라이의 사용은 널리 공지되어 있으며, 이러한 발현 시스템에서 사용하기에 적합한 프로모터는 T7, trc 및 lacUV5를 포함한다(Tegel H et al, FEBS Journal, 2011, 278: 729-739). 도입된 핵산의 발현을 촉진시키기 위한 조건 하에서 적합한 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하고, 숙주 세포 및/또는 그 다음 표준 정제 기술을 사용할 수 있는 경우에 상청액으로부터 발현 생성물을 정제시킨다. 더욱이, 발현 산물은 숙주 세포(예를 들어, 박테리아 세포, 예컨대, 이. 콜라이) 내 ELISA에 의한 정량을 위해서 히스티딘 태그를 포함할 수 있고, 이로부터 하기에 기재된 바와 같은 표적화된 미니셀 제제가 제조될 수 있다(MacDiarmid J et al, Cancer Cell, 2007, 11: 431-445).

[0649] 특히, 미니셀(예를 들어, 문헌[De Boer PA, *et al.*, A division inhibitor and topological specific factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in E.coli. *Cell*, 56; 641-649, 1989]), 리포솜, 고스트 박테리아 세포, 케이비오스피어(caveosphere), 합성 중합체 제제, 초원심분리된 나노입자 및 다른 무핵(anucleate) 나노입자는 표적 세포로의 카고(cargo)의 표적화 전달을 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, 핵산 또는 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드)에 로딩될 수 있다. 이러한 셔틀은 소장을 통한 카고의 방출 및 흡수를 위해 위의 산성 환경을 통과하기 위한 주사 또는 경구 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0650] 미니셀은 정상 세포 분열을 제어하고, 세포질을 함유하고, 이에 의해서 모 세포의 단백질 발현을 위한 세포질 성분을 함유하는 유전자(들)의 돌연변이에 의해 생산될 수 있는 나노 크기의 세포이지만, 이것은 무염색체성(achromosonal)이며 자가 복제가 불가능하다. 세포 분열을 제어하는 유전자를 억제(또는 상향 조절)함으로써 미니셀을 생성하는 것은 정맥 주입 동안 일반적으로 사용되는 것보다 훨씬 적은 용량으로 종양에 약물을 전달하는 해결책을 제공하는 것으로 밝혀져 있다(MacDiarmid, J.A. et al., JC (2007), *Cancer Cell;* 11;431-445). 본 발명의 맥락에서 미니셀은 유전자 돌연변이(들)에 의한 것과 같은 세포 분열 과정(예를 들어, 이원 분열)의 섭동 또는 교란 및/또는 관련된 세포 성분의 억제로부터 발생할 수 있는 모 세포의 비정상적인 세포 분열에 의해 생성된 임의의 무염색체성 세포일 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기 위한 미니셀은 국제 특허 출원 제WO 03/033519호, 미국 특허 제7,183,105호 및 문헌[MacDiarmid, J.A., et al., 2007]에 기재된 바와 같이 임의의 통상적으로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 이들 모두의 전문은 상호 참조에 의해서 본 명세서에 명확하게 포함된다. 박테리아 미니셀을 생성시키기 위해 세포 분열을 제어하는 박테리아 유전자의 비활성화는 예를 들어, 문헌[De Boer, P.A., et al., "A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine placement of the division septum in *E. coli*". *Cell* 56, 1989, pp. 641-649]에 추가로 기재되어 있다. 밀도 구배 원심분리(예를 들어, OptiPrep™, 액시스-쉴드 피엘씨사(Axis-Shield PLC), 미국 스코틀랜드주 던디 소재) 및 교차 흐름 여과를 사용하는 무손상 미니셀의 정제 방법은 미국 특허 제US 7,611,885호 및 제US 8,003,091호에 기재되어 있으며, 이들 둘의 내용 전문은 상호 참조에 의해 본 명세서에 명확하게 포함된다.

[0651] 본 명세서에서 유용한 미니셀이 유래될 수 있는 박테리아 세포의 예는 박테리아, 예컨대, 에쉐리키아 콜라이(*Eschererichia coli*)(이. 콜라이)(예를 들어, MinA, MinB, cya, crp, MukA1 또는 MukeE에서 돌연변이를 갖거나, minB, minE, flsZ, sdi를 과발현하는 것), 바실루스 섭틸리스 종(예를 들어, minC, minD, ripX에 돌연변이를 갖거나, smc 돌연변이 또는 OriC 결실을 갖는 것), 락토바실루스 종 및 슈도모나스 종이다. 박테리아는 그램-양성(예를 들어, 엘, 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)) 또는 그램-음성(예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)일 수 있다.

[0652] 외막에 포린이 있는 박테리아로부터 분리된 미니셀(즉, 일부 그램-양성 박테리아도 포린을 갖지만, 일반적으로 그램 음성 박테리아)은 표적 세포로 전달될 핵산, 발현 벡터 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제를 미니셀에 로딩하는 것을 용이하게 학기에 특히 바람직하다. 미니셀은 또한 고세균 또는 진핵 세포에서 유래될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제US 7,183,105호 참고). 그러나 일반적으로 박테리아 유래 미니셀, 즉, 박테리아 모 세포로부터 유래된 미니셀이 활용될 것이다.

[0653] 본 발명에 따른 치료를 수행하기 위한 세포에 대한 미니셀의 표적화는 임의의 적합한 표적화 모이어티(예를 들

어, 미니셀 또는 리포솜 상의 이중특이적 항체, scFv(들) 표적화 펩타이드 등을 통해)의 사용에 의해 얻어질 수 있다. 표적화 모이어티는 미니셀의 표면에서 발현될 수 있거나, 예를 들어, 미니셀은 하나 이상의 선택된 표적화 모이어티로 태그되거나 표지될 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 종양 세포에 대한 미니셀의 표적화는 미니셀 표면 리포폴리사카라이드의 O-항원 성분 및 표적화될 포유동물 세포에 특이적인 세포 표면 수용체(예를 들어, EFGR)를 인식하는 이중특이적 항체 복합체 형태의 표적화 모이어티를 사용하여 달성될 수 있고, 복합체의 2개의 항체는 단백질 A/G를 사용하여 Fc 영역을 통해 함께 연결된다(문헌[MacDiarmid, J.A., *et al.,* JC (2007), *Cancer Cell;* 11;431-445] 및 국제 특허 제WO 03/033519호 참고). 그러나, 본 발명은 이에 제한되지 않으며, 다른 표적화 모이어티가 상기에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0654] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제(들)는 미니셀 내에서 또는 미니셀상에서 표적 세포 또는 조직으로 운반될 수 있다. 예를 들어, Lck 활성화제(들)는 미니셀에 로딩되거나, 미니셀의 막에서 발현되거나, 예를 들어, 전하 결합에 의해 미니셀의 막 상에 운반될 수 있다.

[0655] 미니셀은 Lck 활성화제 또는 핵산을 함유하는 인큐베이션 배지에서 미니셀의 인큐베이션을 통한 수동 확산에 의해 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제 또는 핵산(예를 들어, 발현 벡터)에 로딩될 수 있다. 로딩을 돕기 위해, 미니셀은 (예를 들어, 미니셀 천공에 의해) Lck 활성화제(들) 또는 핵산(들)에 투과성이 될 수 있거나, 미니셀의 제제에 대한 투과성은 그렇지 않았으면 통상적으로 공지된 기술에 의해서와 같이 증가되거나 향상될 수 있다.

[0656] 특히, 박테리아 미니셀의 막을 통한 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제 및 핵산의 진입은 다양한 공지된 가역적 및 비가역적 방법의 사용에 의해 촉진될 수 있다. 이것은 전기천공법(Miller L. *et al, Technology in Cancer Research & Treatment,* 2005, 4: 1-7), 디지토닌에 대한 노출(Melo RF. *et al, Cell Biochemistry and Function,* 1998, 16: 99-105), NSAIDS(Mizushima T, *Inflammation and Regeneration,* 2008, 28: 100-105), Triton-X100(van de Ven AL. *et al*, *J Biomedical Optics*, 2009, 14(2): 1-10), 식물 사포닌(Bachran C. *et al*, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008, 8: 575-584), 락트산(Alakomi HL et al., Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 2001-5) 등을 포함한다.

[0657] 대안적으로, 미니셀이 생산될 수 있는 박테리아 또는 다른 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 발현 벡터로 형질주입될 수 있는데, 여기서 생산되는 경우 미니셀은 발현된 Lck 활성화제가 로딩된다.

[0658] 미니셀의 내용물 또는 카고의 표적 세포로의 진입은, 미니셀의 표적 세포로의 전좌에 의해서, 미니셀과 표적 세포에서 발현된 세포 표면 수용체와의 상호 작용에서 발생하는 식균작용(예를 들어, 호중구 및 대식세포에 의해서)에 의해서 또는 엔도사이토시스(클라스린 매개 또는 클라트린 독립적인 엔도사이토시스), 및 미니셀의 후속 분해 및 미니셀의 내용물의 표적 세포의 세포질로의 방출(예를 들어, 세포 내 구획, 예를 들어, 엔도솜 및/또는 리소좀으로부터)에 의해서 일어날 수 있다.

[0659] 미니셀의 로딩을 돕기 위해, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 실시형태의 펩타이드 성분은 박테리아 유래 미니셀에 존재하는 LamB 포린을 통한 수송을 용이하게 하기 위해 탄수화물 모이어티, 예를 들어, 글루코스(D 또는 L 이성질체)에 연결될 수 있다. 포린 슈퍼패밀리는 그램 음성 박테리아의 외부 세포막을 가로질러 물이 충전된 기공을 형성하는 다수의 동종삼량체, 막관통 단백질을 함유한다. 대부분의 포린은 환경 변화에 의해 조절되는 일반적인 비특이적 채널을 형성한다. 말토포린(LamB 포린)은 말토스와 말토덱스트린의 이. 콜라이 세포로의 안내된 확산을 담당한다. 특히, LamB 단백질은 글루코스의 확산을 촉진시킬 수 있고(문헌[(von Meyerburg K and Nikaido H, *Biochem Biophys Res*. Vol. 78: pp1100-1107, (1977)]), 글루코스는 시험관내에서 시험된 다양한 당으로부터 LamB 단백질을 관통하는 가장 빠른 속도를 갖는 것으로 밝혀져 있다(Luckey M and Nikaido H, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA Vol. 77:pp167-171, (1980). Lck 활성화제, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 융합 단백질 및 펩타이드 성분은 세제를 사용하는 세포막의 초음파처리 또는 파괴, 막 및 고체 단편을 제거하기 위한 원심분리, 및 당업계에 공지된 방법에 의한 친화성 또는 면역친화성 크로마토그래피에 의해 적용 가능한 바와 같은 용액 또는 상청액으로부터의 정제에 의해 세포 배양물로부터 정제될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 이러한 고체 기질 및 지지체는 아가로스, 세파로스 및 다른 상업적으로 입수 가능한 지지체(예를 들어, 라텍스, 폴리스타이렌 또는 덱스트란 등의 비드 등)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 후속 용리 및 이로부터의 농축을 위해 고체 지지체 상에 본 발명의 펩타이드 또는 융합 단백질을 고정시키기 위한 항체, 이의 결합 단편 또는 다른 적합한 결합 분자는 일반적으로 사용되는 아마이드 또는 에스터 링커를 공유적으로 사용하거나 흡착에 의해 고체 기질에 결합될 수 있다.

[0660] 추가로, 나노입자, 예컨대, 알부민, 젤라틴, 리포솜에 사용하기에 적합한 인지질, 중합체, 고체 금속 함유 나노

입자 등이 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 전달을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[De Jong WH & Borm PJA, Int J Nanomedicine, 2008, 3(2):133-149] 참조). 다양한 리간드 또는 표적 세포의 수용체에 대한 항체로 나노 입자를 외부 코팅하는 기술은 또한 널리 인식되어 있으며, 본 발명의 실시형태에서 사용될 수 있다.

[0661] 특히, 본 발명에 따른 Lck 활성화제의 지질 전달은 리포솜, 고체 지질 나노 입자, 역 지질 마이셀, 지질 미세관 및 지질 마이크로실린더에 의한 것을 포함한다(문헌[Swaminatham J & Ehrhardt C, Expert Opin Drug Deliv, 2012, 9(12): 1489-1503]에서 검토됨). 예를 들어, 펩타이드 카고를 함유하는 리포솜은 경피 전달용으로, 네블라이저로서, 비강내용으로, 안구 및 협측 경로 및 경구용으로, 비경구 및 폐 경로를 위해서 제안되었다(문헌[Swaminatham J & Ehrhardt C, Expert Opin Drug Deliv, 2012, 9(12): 1489-1503]에서 검토됨). 리포솜은 약물 및 유전자 전달 비히클로, 보다 최근에는 펩타이드 전달 비히클로서 널리 연구되었으며(PCT 공개 제 WO2013033838 A1호, 파마갭사(Pharmagap Inc), 출원일: 2012년 8월 21일, 발명자; Sokoli K 및 Chabot JM), 페길화된 리포솜 제형은 대부분의 예에서 중성 지질과 음이온성 지질의 혼합물을 포함한다.

[0662] 임상적으로 입증된 많은 리포솜 기반 약물 요법이 이용 가능하며, 표적화되지 않은 리포솜에 비해 표적화된 리포솜은 종양 조직에서 향상된 세포내 약물 전달을 달성한다(Kirpotin DB et al, Cancer Res, 2006, 66: 6732). 더욱이, 최근 신경교종의 치료를 위해 혈액 뇌 장벽을 통한 성공적인 리포솜 매개 유전자 전달이 보고되어 있다(Yue P-J et al, Molecular Cancer, 2014, 13: 191). 리포솜 기반 세포 표적화 및 세포 내재화 접근법의 조합은 본 발명의 방법에 따라서 Lck 활성화제를 세포(예를 들어, 예컨대, 병원체 또는 암 세포에 대한 면역계/면역반응을 강화하기 위해서 T 세포, 등)에 전달하는 데 이용 가능하다.

[0663] 표적 세포(예를 들어, 면역 세포)로의 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 전달을 개선하는 방법은, 문헌[Zhang X-Q et al, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(6): pp 2231-2233)]에 기재된 CD3 또는 인간화된 항-CD4 항체(예를 들어, TNX-355, 현재 이발리주맙(Ibalizumab)으로 공지됨, TMB-355)와 같은 면역 세포에 의해서 선택적으로 발현되는 수용체를 인식하는 표적화 리간드로의 리포솜의 표면의 작용화를 포함할 수 있다. 이발리주맙은 HIV의 1차 수용체인 CD4에 결합하고, 바이러스 진입 과정을 저해하는 비-면역억제성 단클론성 항체이다(Ibalizumab (TMB-355): TaiMed Biologics. 2009-09-09). 리포솜의 외부 표면 상의 페길화가 또한 면역 세포 또는 암 세포 상의 PEG 단위 및 수용체를 동시에 표적으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 유도체의 사용을 용이하게 한다. 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드를 절단하는, MMP9/2 절단 서열에 연결된 Lck 활성화제를 사용하여 암 세포를 표적화함으로써, 이는 종양 침윤 림프구 항암 활성을 증강시킬 수 있다. 본 발명자들은 MMP9/2가 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제 폴리펩타이드를 절단하지 않는다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 표적 세포(예를 들어, 암 세포 또는 면역 세포), 예컨대, HER1, HER2, PSMA(전립선-특이적 막 항원) 또는 또 다른 항원에서 발현되는 표면 항원을 표적으로 하는 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다.

[0664] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, 펩타이드, 융합 단백질, 조작된 항체 및 다른 결합 모이어티(예를 들어, scFv)는 예를 들어, 정제 및/또는 세포주에 대한 결합 능력의 평가를 돕기 위해서, 당업계에 공지된 바와 같은 태그(예를 들어, c-myc 및 폴리-His 태그)와 함께 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 태그가 사용되는 경우, 암호화된 Lck 활성화제, 펩타이드 등은 엔도펩티다제를 사용하여 태그의 제거를 용이하게 하는 적합한 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 마찬가지로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, 펩타이드, 융합 단백질 등을 암호화하는 핵산은 상기에 기재된 바와 같은 친화성 크로마토그래피에 의한 정제를 위해 숙주 세포로부터 번역된 생성물의 분비를 촉진시키기 위한 신호 펩타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 면역친화성 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 프로토콜을 위한 고체 기질의 준비를 위한 프로토콜은 예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology - Ausubel FM. et al, Wiley-Interscience, 1988 및 이의 후속 개정판에 기재되어 있다.

[0665] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, 이의 펩타이드 성분, 융합 단백질 및 핵산은 단리되거나 정제된 형태로 제공될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "정제된"은 전기영동 및/또는 다른 기술에 의해서 평가될 수 있는 바와 같이 예를 들어, 80% 이상 또는 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 또는 적어도 96% 또는 적어도 97% 또는 적어도 98% 또는 그 초과(예를 들어, 99% 이상)의 순도 수준으로의 부분적인 정제를 포함한다.

[0666] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 펩타이드 성분(들)의 자유 말단 단부(들)는 예를 들어, 복수의 에틸렌 글리콜 단량체 단위로 메틸화, 아세틸화 또는 페길화되어 생체 내에서 프로테

아제에 의한 분해에 대한 내성이 감소되거나 신장을 통해서 순환으로부터 Lck 활성화제의 제거가 저해될 수 있다. 폴리펩타이드/펩타이드의 페길화 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며 이러한 모든 방법이 명확하게 포함된다. 전형적으로, 본 발명에 의해 구현된 방법에서 사용되는 페길화된 펩타이드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 2개 이상의 단량체 단위 및 일반적으로 약 2 내지 약 11개 단량체의 PEG(즉, (PEG)n, 식 중, n은 2 내지 11임)에 커플링될 것이다. 가장 일반적으로 n은 2일 것이다. 더욱이, 본 발명에 의해 구현된 Lck 활성화제를 포함하는 펩타이드는 향상된 강성을 제공하여 생체내 안정성을 제공하기 위해 고리화될 수 있으며, 이러한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0667] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제는 본 발명에 따른 적용 가능한 질환 또는 병태의 예방 또는 치료를 위한 유일한 약물로서 대상체에게 투여될 수 있지만, 적어도 일부 실시형태에서 치료제는 질환 또는 병태의 치료(즉, 예방 또는 치료)를 위한 1종 이상의 다른 약물과 병용하여 투여될 수 있다. 특정 질환 또는 상태의 치료를 위해 통상적으로 사용되는 임의의 적합한 약물, 예컨대, 면역관문 차단제가 병용 요법에서 본 명세서에 기재된 치료제(들)와 함께 사용될 수 있다.

[0668] 본 발명에 따른 병용 요법에 사용될 수 있는 통상적인 항바이러스 약물은 예를 들어, 레트로바이러스 약물, 프로테아제 저해제, 인테그라제 저해제, 세포 진입 저해제 및 뉴라미니다제 저해제로부터 선택될 수 있다.

[0669] 예는 뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 예컨대, 지도부딘(zidovudine)(AZT), 아바카비어(Abacavir), 라미부딘(lamivudine), 엠트라이시타빈(emtricitabine) 및 아시클로비어(Acyclovir), 뉴클레오타이드 역전사효소 저해제, 예컨대, 테노포비어(Tenofovir), 비-뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 예컨대, 네비라핀(nevirapine) 및 에파비렌즈(efavirenz), 세포 진입 저해제, 예컨대, 마라비록(maraviroc) 및 엔푸비르타이드(enfuvirtide), 인터그라제 저해제, 예컨대, 랄테그라비어(Raltegravir), 엘비테그라비어(Elvitegravir) 및 돌루테그라비어(Dolutegravir), 프로테아제 저해제, 예컨대, 다루나비어(Darunavir), 아타자나비어(Atazanavir), 인디나비어(Indinavir), 로피나비어(Lopinavir), 넬피나비어(Nelfinavir), 암프레나비어(Amprenavir) 및 리토나비어(Ritonavir) 및 뉴라미니다제 저해제, 예컨대, 자나미비어(zanamivir) 및 오셀타미비어(oseltamivir)를 포함한다.

[0670] 적어도 일부 실시형태에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제는 HIV 또는 다른 레트로바이러스 감염의 치료를 위한 종래의 병용 요법에 포함될 수 있고, 예컨대, 이것은 콤비어(combivir)(지도부딘 및 라미부딘), 트라이지비어(Trizivir)(아바카비어(abacavir), 지도부딘 및 라미부딘), 칼레트라(Kaletra)(로피나비어 및 리토나비어) 엡지콤(Epzicom)(아바카비어 및 라미부딘), 트루바다((Truvada)테노포비어 및 엠트라이시타빈(emtricitabine)), 아트라이플라(Atripla)(에파비렌즈, 테노포비어(tenofovir) 및 엠트라이시타빈(emtricitabine)), 스트라이빌드(Stribild)(엘비테그라비어(elvitegravir), 코비시스타트(cobicistat), 테노포비어(tenofovir) 및 엠트라시타빈) 및 트라이우메크(triumeq)(돌루테그라비어(dolutegravir), 아바카비어(abacavir) 및 라미부딘)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0671] 본 발명에 따라서 병용 요법에서 사용될 수 있는 약물은 예를 들어, 항생제, 예컨대, 페니실린, 세팔로스포린, 카바페넴, 아미노글리코시드, 설폰아마이드, 퀴놀론 및 옥사졸리디논으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0672] 본 발명의 방법에 따라 병용 요법에 사용될 수 있는 통상적인 항원생동물 약물은 예를 들어, 메트로니다졸, 오르니다졸, 에플로르니틴, 푸라졸리돈, 멜라소프롤, 티니다졸 및 피리메타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0673] 본 명세서에 기재된 바와 같이 병용 요법에 사용될 수 있는 통상적인 항기생충 약물은 벤즈이미다졸, 예컨대, 알벤다졸, 메베다졸, 트라이클라벤다졸, 플루벤다졸 및 펜벤다졸을 포함한다.

[0674] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제는 또한 다른 질환 또는 병태에 대한 통상적인 약물로 치료함으로써 발생하는 기회 감염의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 만성 골수성 백혈병 치료에 일반적으로 사용되는 약물 글리벡(Gleevec)(이마티닙, ST1571)은 타이로신 키나제의 강력한 저해제이며, Lck 활성 저해를 통해서 TCR-유도 증식 및 활성화를 감소시키는데(Seggewiss R et al, 2005, Blood, 105: 2473-2479), 이것은 기회 감염 유도에 영향을 미친다. 이것은 또한 이마티닙, 닐로티닙 또는 다사티닙과 같은 다른 타이로신 키나제 저해제의 부작용 개선에도 동일하게 적용된다. 예를 들어, 박테리아 슈퍼항원(예를 들어, 스타필로코쿠스 엔테로톡신 A(SEA))과 같은 면역-강화 약물로 인한 잠재적인 이환율에도 불구하고, Lck가 SEA에 의해 활성화되고, 선택적인 Lck 활성화제의 부족을 고려할 때, 만성 골수성 백혈병에서 이마티닙 매개된 T 세포 면역억제를 예방하기 위해 SEA를 사용하는 것이 제안되어 있다(Wang G et al, BioMed Research International, 2014, Article ID 682010).

[0675] 일부 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 병원성 감염 또는 다른 질환 또는 병태의 예방 또는 치료를 위한 통상적인 약물은 예를 들어, 공유 결합, 전하 인력에 의해, 또는 적합한 링커의 사용에 의해서 본 발명에 따른 Lck 활성화제와 복합체화될 수 있다. 약물을 Lck 활성화제에 연결하기에 적합한 링커는 예를 들어, 1 내지 10개 원자 길이의 링커, 설프하이드릴 링커 및/또는 바람직하게는 표적 세포 또는 조직에서 또는 그 내부에서 약물을 방출하기 위해서 하나 이상의 효소 절단 부위를 정의하는 아미노산 또는 아미노산 서열(예를 들어, MMP 절단 부위)을 포함한다. 예를 들어, 약물은 Lck 활성화제의 화합물(예를 들어, 구조식 II의 폴리아마이드 모이어티)에 (예를 들어, 말단 NH_2기 또는 폴리아마이드 모이어티의 다른 적합한 말단기를 통해) 커플링될 수 있거나, 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같은 적절한 링커 시스템을 사용하여 직접 또는 간접적으로, Lck 활성화제의 다양이온성 펩타이드(PP) 또는 증강 펩타이드 또는 다른 펩타이드(AP/P)의 말단 단부에 커플링될 수 있다

[0676] 세포에 대한 본 명세서에 기재된 Lck 활성제의 활성 및/또는 세포 독성 프로파일은 다양한 종래에 공지된 검정, 예컨대, 세포 형태학 평가, 트리판-블루 배제(trypan-blue exclusion), 아포토시스 평가, 세포 증식 연구(예를 들어, 세포 수치, ^{3}H-티미딘 흡수 및 MTT 검정), 키나제 활성 분석, 웨스턴 블롯 및 면역형광 연구 중 하나에 의해서 결정될 수 있다.

[0677] 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제는 본 발명의 방법에 따라 포유동물에게 투여될 수 있거나, 세포가 시험관내에서 Lck 활성화제와 접촉될 수 있다. 마찬가지로, 본 발명은 포유동물에서 세포를 복귀시키거나, 세포를 투여하거나 또는 세포를 이식하기 전에, 세포가 포유동물의 외부에서 Lck 활성화제로 처리되는 생체외 치료를 제공한다.

[0678] 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제, 벡터(예를 들어, 발현 벡터) 또는 핵산은 의도된 대상체에 투여하기 위한 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로 제공될 수 있다. Lck 활성화제 또는 핵산은 경구, 비강, 흡입을 통해(예를 들어, 에어로졸 스프레이에 의해) 경구, 정맥내, 비경구, 직장, 피하, 주입, 국소, 근육내, 복강내, 비강내, 척추내, 안구내 또는 적절하다고 간주되는 임의의 다른 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0679] 직장 및/또는 결장은 펩타이드, 예컨대, 엔아민(페닐알라닌 및 페닐글리신), 5-아미노 또는 -메톡시살리실레이트, 킬레이트제, 중쇄 지방산, 사이클로덱스트린, pH 감응성 중합체 코팅된 약물, 아조중합체 전구약물 등에 커플링된 다양한 흡수 향상제를 사용하여 펩타이드의 약물 흡수를 향상시키기 위한 경로를 제공하고(예를 들어, 문헌[Tiwari G et al, International J Drug Delivery, 2010, 2:01-11; Kolte BP et al, Asian J Biomedical & Pharmaceutical Sciences, 2012, 2(14): 21-28; Philip AK et al, OMJ, 2010, 25: 70-78 및 Lakshmi PJ et al. 2012, Asian J Res Pharm Sci, 2(4): 143-149)] 참고) 및 이러한 투여 모드 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제의 형태는 또한 본 명세서에 명확하게 포함된다.

[0680] 약제학적 조성물은, 예를 들어, 액체, 현탁액, 에멀션, 시럽, 크림, 섭취 가능한 정제, 캡슐, 알약, 좌약, 분말, 트로키, 엘릭시르(elixir), 또는 선택된 투여 경로에 적절한 다른 형태의 형태일 수 있다.

[0681] 본 발명에 따른 방법에 유용한 약제학적 조성물은 수성 약제학적 용액을 포함한다. 주사 가능한 조성물은 주사 가능성이 존재하는 정도까지 유동적일 것이며, 일반적으로 제조 후 저장을 제공하기 위해 미리 결정된 기간 동안 안정적일 것이다. 더욱이, 약제학적으로 허용 가능한 담체는 임의의 적합한 통상적으로 공지된 용매, 분산 매질, 물, 생리 식염수 및 등장성 제제 또는 용액, 계면활성제를 포함할 수 있으며, 임의의 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체(예를 들어, 경구 또는 국소적으로 허용 가능한 담체)가 사용될 수 있다. 적합한 분산 매질은 예를 들어, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 기름 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 특히, Lck 활성화제 또는 핵산은 예를 들어, 불활성, 희석제, 동화 가능한 식용 담체와 함께 제형화될 수 있고/있거나 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐에 포함될 수 있다.

[0682] 본 명세서에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물은 또한 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 솔브산 및 티메로살과 같은 생체내 및/또는 국소 투여에 적합한 하나 이상의 보존제를 혼입할 수 있다. 또한, 흡수 지연제, 예컨대, 알루미늄 모노스테레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제 또는 핵산을 함유하는 정제, 트로키, 알약, 캡슐 등은 또한 하기 중 하나 이상을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대, 트래거캔스검, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 붕해제, 예컨대, 옥수수 전분, 감자 전분 또는 알긴산; 윤활제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트; 감미제, 예컨대, 수크로스, 락토스 또

는 사카린; 및 향료.

[0683] 약제학적 조성물에서 상기에 기재된 바와 같은 성분 및 매질의 사용은 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 성분이 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제와 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료적 및 예방적 약제학적 조성물에서의 이의 사용이 포함된다.

[0684] 본 명세서에 사용된 "병용 요법"은 동일하거나 상이한 경로에 의해 다른 약물(들)과 동일하거나 상이한 제형으로 본 발명에 따른 Lck 활성화제 또는 핵산에 사전 투여되거나 이들과 동시에 투여되거나, 순차적으로 투여되는 것을 의미하며, 이에 의해서 Lck 활성화제(들) 및/또는 핵산(들)은 중첩되는 치료 창에서 효과(들)를 발휘한다.

[0685] 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 바람직하다. 본 명세서에 사용된 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대해서 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하는 것으로 고려되며, 각각의 단위는 사용된 관련 담체 및/또는 부형제와 함께 목적하는 치료적 또는 예방적 효과를 생성시키도록 계산된 본 발명에 따라 미리 결정된 양의 적어도 하나의 Lck 활성화제 또는 핵산을 함유한다. 투여 단위 형태가 예를 들어, 캡슐, 정제 또는 알약인 경우, 투여 단위의 물리적 형태를 달리 변형시키거나 대상체에 대한 투여를 용이하게 하기 위해 다양한 성분이 코팅(예를 들어, 셀락, 당 또는 둘 다)으로 사용될 수 있다.

[0686] 약제학적 조성물은 일반적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 Lck 활성화제 적어도 약 1중량% 이상으로 함유할 것이다. 백분율은 달라질 수 있으며, 편리하게는 조성물 또는 제제의 약 5% 내지 약 80% w/w일 수 있다. 다시, 본 발명에 따른 Lck 활성화제 또는 핵산의 양은 제안된 투여 경로를 고려하여 적절한 유효 투여량이 대상체에게 전달되도록 하는 양일 것이다. 바람직한 경구 약제학적 조성물은 약 0.1㎍ 내지 15g의 Lck 활성화제를 함유할 것이다.

[0687] 본 발명에 따른 Lck 활성화제 또는 핵산의 투여량은 Lck 활성화제 또는 핵산이 예방적 또는 치료적 용도로 투여될 것인지 여부, 제제가 투여되도록 의도되는 질환, 병태 또는 목적, 질환 또는 병태의 중증도, 대상체의 연령, 및 허용된 원칙에 따라 의사 또는 참여자가 결정할 수 있는 대상체의 체중 및 일반적인 건강을 비롯한 관련 인자를 비롯한 다수의 인자에 좌우될 것이다. 예를 들어, 적은 투여량이 초기에 제공될 수 있으며, 이는 대상체의 반응을 평가한 후 각각의 투여 시 이후에 증가된다. 유사하게, 투여 빈도는 각각의 투여량 사이에 대상체의 반응을 지속적으로 모니터링하고, 필요한 경우 투여 빈도를 증가시키거나 또는 대안적으로 투여 빈도를 감소시킴으로써 동일한 방식으로 결정될 수 있다.

[0688] 전형적으로, 본 명세서에 기재된 Lck 활성화제는 최대 약 100㎎/㎏ 개체의 체중, 보다 일반적으로 최대 약 50㎎/㎏ 체중, 가장 일반적으로 약 5㎎/㎏ 내지 40㎎/㎏ 체중 범위의 Lck 활성화제의 투여량을 제공하기 위해 본 발명에 의해 구현된 방법에 따라 투여될 것이다. 적어도 일부 실시형태에서, Lck 활성화제는 약 5 내지 25㎎/㎏ 체중의 범위, 일반적으로 약 5㎎/㎏ 내지 약 20㎎/㎏의 범위, 가장 일반적으로 10㎎/㎏ 내지 약 20㎎/㎏의 범위의 Lck 활성화제의 투여량을 제공하기 위해서 투여될 것이다. 경구 투여되는 경우, Lck 활성화제의 최대 약 20g이 1일당 투여될 수 있다(예를 들어, 1일 4회 경구 투여, 각각의 용량은 5g의 Lck 활성화제를 포함함).

[0689] 정맥내 경로와 관련하여, 특히 적합한 경로는 치료될 조직 또는 특정 기관(들)에 공급하는 혈관으로 Lck 활성화제 또는 핵산을 전신 분포시키기 위한 주사를 통한 것이다. 또한, Lck 활성화제는 임의의 적합한 주입 또는 관류 기술에 의해 전달될 수 있다. Lck 활성화제 또는 핵산(예를 들어, 박테리아 유래 미니셀에 로딩된 발현 벡터)은 또한 예를 들어, 흉막 또는 복막강과 같은 공동으로 전달되거나 치료될 조직에 직접 주입될 수 있다.

[0690] 본 명세서에 기재된 방법 및 이들의 제조 및 전달을 위한 방법에 유용한 적합한 클로닝 및 발현 벡터는 당업자에게 널리 공지된 매뉴얼 및 핸드북에 기재되어 있다(예를 들어, 내용 전문이 상호 참조에 의해 본 명세서에 포함된 문헌[Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, USA, Vol.1 and 2, John Wiley & Sons, 1992; Sambrook et al (1998) Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, New York] 및 이의 재인쇄판 및 개정판 참고). 마찬가지로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물에 유용한 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 제형은 예를 들어, 당업자에게 널리 공지된 핸드북 및 교과서, 예컨대, 문헌["Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Mack Publishing Co., 1995)"] 및 이의 임의의 재인쇄판 및 개정판에서 찾아볼 수 있다. 세포 및 생체내에서의 핵산 삽입물의 발현을 위한 방법 및 프로토콜은 예를 들어, 국제 특허 제WO 200631996호, 제WO 200631689호, 제WO 200629981호, 제WO 200629005호, 미국 특허 제US 20060063731호 및 제US 20060063924호에 기재되어 있고, 상기에 열거된 상기 간행물, 매뉴얼 및 핸드북 모두의 내용은 전문이 상호 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0691] 본 명세서에 기재된 바와 같이 치료되는 포유동물은 본 발명에 따라 치료 가능한 임의의 포유동물일 수 있다. 예를 들어, 포유동물은 소, 돼지, 양 또는 말과의 구성원, 실험실 시험 동물, 예컨대, 마우스, 토끼, 기니피그, 고양이 또는 개, 영장류 또는 인간일 수 있다. 일반적으로 포유류는 인간이다.

[0692] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 언급된 질환 및/또는 병태(노화 관련 변화 포함)의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드의 용도를 제공한다.

[0693] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 언급된 질환 및/또는 병태(노화 관련 변화 포함)의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드의 용도를 제공한다.

[0694] 본 발명은 다수의 비제한적 실시예에 의해 하기에 추가로 설명된다.

[0695] **실시예**

[0696] **실시예 1: 시험관내에서 폴리아르기닌 폴리펩타이드에 의한 림프구-특이적 단백질 타이로신 키나제(Lck) 활성화.**

[0697] Lck를 활성화시키는 본 발명의 폴리펩타이드의 능력을 시험관내에서 조사하였다. Lck는 타이로신 키나제의 Src 패밀리의 구성원이다. 세미-로그 용량 범위의 펩타이드 기질(KVEKIGEGTYGVVYK) 및 시험 폴리펩타이드의 존재 하에서 15μM의 겉보기 Km 내의 ATP 농도를 사용하여 영국 유로핀즈 파마 디스커버리 서비스즈사(Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited)(영국 던디 테크놀로지 파크 소재)에 의해서 시험관내 Lck 활성화 키나제 연구를 수행하였다. 모든 결과는 대조군(100%)에 대한 Lck 활성도 백분율이다.

[0698] 시험 폴리펩타이드를 1.0μM의 농도에서 평가하였다.

[0699] 도 1은 4, 5 또는 6개의 연속적인 아르기닌 잔기를 포함하는 폴리펩타이드가 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck를 활성화시키지 않는다는 것을 도시한다.

[0700] 10개의 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 펩타이드(데카-히스티딘 펩타이드; 10His)를 1μM의 펩타이드의 농도로 사용한 경우 Lck 활성도의 증가가 관찰되지 않았다.

[0701] 10개의 연속적인 오르니틴 잔기를 포함하는 펩타이드(데가-오르니틴 펩타이드; 10 Orn)를 1μM의 펩타이드의 농도로 사용한 경우 무시해도 될 정도의 Lck 활성도가 관찰되었다.

[0702] 그러나, 놀랍게도, 예를 들어, 8 내지 20개의 연속적인 아르기닌 잔기를 포함하는 폴리펩타이드는 Lck를 활성화시킬 수 있었다. 8, 9, 10, 12, 14, 20개의 연속적인 아르기닌 잔기를 포함하는 폴리펩타이드는 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck를 활성화시킨다.

[0703] 예를 들어, 12량체 아르기닌 서열(IK01200)은 Lck를 활성화시켜, 대조군에 비해서 401%의 Lck 활성도를 생성시킨다.

[0704] 도 1은 또한 10개의 연속적인 라이신 잔기(데카-라이신 펩타이드; 10Lys)가 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck 활성도를 161%만큼 증가시킨다는 것을 발견한 것을 도시한다.

[0705] 도 1은 연속적인 D 아르기닌 잔기를 포함하는 펩타이드가 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck를 활성화시킨다는 것을 도시한다. 예를 들어, 8량체 아르기닌 서열(IKD00800)은 Lck를 활성화시켜, 대조군에 비해서 80%의 Lck 활성도를 생성시킨다. 14량체 아르기닌 서열(IKD1400)은 Lck를 활성화시켜, 대조군에 비해서 228%의 Lck 활성도를 생성시킨다.

[0706] 도 1은 또한 연속적인 아르기닌 잔기 및 연속적인 히스티딘 잔기를 포함하는 펩타이드가 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck를 활성화시킨다는 것을 도시한다. 예를 들어, 9량체 아르기닌 서열 및 10량체 히스티딘 서열(IK00910)은 Lck를 활성화시켜, 대조군에 비해서 348%의 Lck 활성도를 생성시킨다.

[0707] 중요하게는, 도 1은 또한 음이온성 잔기를 포함하는 펩타이드가 Lck를 활성화시킨다는 것을 입증한다. 예를 들어, 9량체 아스파테이트 서열(IKD9; DDDDDDDD)은 1μM의 펩타이드의 농도에서 Lck를 활성화시키지 않는다.

[0708] 이 데이터는, 본 발명의 펩타이드가 림프구-특이적 단백질 타이로신 키나제(Lck)를 활성화시킨다는 것을 입증한다.

[0709] **실시예 2: 폴리아르기닌 및 폴리라이신 폴리펩타이드에 의한 선택적인 림프구-특이적 단백질 타이로신 키나제(Lck) 활성화.**

[0710] Src 패밀리 키나제를 활성화시키는 본 발명의 폴리펩타이드의 능력을 시험관내에서 조사하였다.

[0711] 실시예 1에 기재된 바와 같이 펩타이드를 활용하는 키나제 활성화 연구를 수행하였고, 모든 키나제 활성도 값을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0712] 도 2는 Lck가 도 1의 폴리아르기닌 Lck 활성화 폴리펩타이드에 의해서 선택적으로 활성화되고; Lck 이외의 Src 패밀리 키나제(SFK)는 1μM의 펩타이드 농도에서 폴리아르기닌 및 폴리라이신 펩타이드의 의해서 활성화되지 않았다는 것을 도시한다. 실시예 1 및 도 1과 일관되게, 데카-히스티딘 펩타이드(10His)는 이 농도에서 Lck의 어떠한 활성화도 유도하지 않았다.

[0713] 이 데이터는, Lck 활성화 펩타이드가 Lck를 선택적으로 활성화시키고, Blk, cSRC, Fgr, Fyn, Hck, Lyn 또는 Yes를 활성화시키지 않는다는 것을 입증한다.

[0714] **실시예 3: Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드는 Lck 포스포릴화를 증가시키고, Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드는 Y394에서 Lck 포스포릴화를 증가시킨다.**

[0715] Lck의 Tyr394의 포스포릴화는 Lck 키나제를 활성화시키는 Lck의 입체배좌 개방을 초래한다.

[0716] 영국 유로핀즈 파마 디스커버리 서비스즈사(영국 던디 소재)의해서 웨스턴 블롯 연구를 수행하였다. 간략하면, 표준 KinaseProfiler™ 반응 조건(영국 유로핀즈 파마 디스커버리 서비스즈사) 및 K_m 15μM 내의 ATP 농도를 사용하여 시험 펩타이드의 존재 하에서 Lck(h)를 인큐베이션시켰다. 반응을 실온에서 40분 동안 진행시키고, 그 다음 SDS-샘플 완충제를 첨가함으로써 중단시켰다. 각각의 경우에, Lck 효소를 희석시켜 반응 25㎕당 20ng을 생성시켰다. 화합물 및 펩타이드가 없는 적절한 대조군뿐만 아니라 Lck(h) 및 Lck(h) 활성화된 키나제 둘 다의 미처리 샘플을 또한 사용하였다. 이어서 생성된 샘플을 항체 4G10(항-포스포타이로신 항체)(도 3 참고) 및 항-pY394 Lck(알앤디 시스템즈사(R&D Systems) MAB7500)(도 2 참고)를 사용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석하였다. 2차 검출 항체(항-마우스-HRP)를 사용한 추가 블롯을 또한 수행하였다. 막을 Ponceau S로 염색하여 샘플 로딩 및 효과적인 단백질 전달을 확인하였다. 4G10 항체는 일반적인 항-포스포타이로신 항체이며, Lck에 몇몇 타이로신 잔기가 존지하지만, 단지 하나의 자가포스포릴화 잔기가 즉, Y394 위치에 존재한다. 따라서 항-py394 항체는 Lck의 자가포스포릴화를 특이적으로 검출한다.

[0717] 샘플은 하기와 같다(번호는 겔의 레인에 상응함):

[0718] 1. 분자량 마커

[0719] 2. 표준 Lck

[0720] 3. 표준 Lck + 펩타이드 기질 + ATP(시험 펩타이드 없음)

[0721] 4. 표준 Lck - 펩타이드 기질 + ATP(시험 펩타이드 없음)

[0722] 5. 표준 Lck + ATP + 10Arg 펩타이드(IK00100; 1μM)(펩타이드 기질 없음)

[0723] 6. 표준 Lck + ATP + 10 Arg 펩타이드(IK00100; 10μM)(펩타이드 기질 없음)

[0724] 7. 표준 Lck + ATP + 8 Arg 펩타이드(IK00800; 1μM)(펩타이드 기질 없음)

[0725] 8. 표준 Lck + ATP + 8 Arg 펩타이드(IK00800; 10μM)(펩타이드 기질 없음)

[0726] 9. 10 Arg(IK00100)(10μM)(시험 펩타이드 단독)

[0727] 10. 8 Arg(IK00800)(10μM)(시험 펩타이드 단독)

[0728] 웨스턴 블롯 프로토콜의 단계는 하기와 같았다:

SDS-PAGE 겔:	200V 에서 50 분
웨스턴 블롯 전달:	25V 에서 90 분
막:	나이트로셀룰로스 프리-컷 블로팅 막(Nitrocellulose Pre-Cut Blotting Membrane) 0.2pm 기공 크기(LC2000(라이프 테크사(Life Tech))
Ponceau 염색:	5% 아세트산 중의 0.1% Ponceau S(w/v)

[0729]

[0730] 막을 1차 항체 및 2차 항체를 적용하기 전에 1시간 동안 10㎖ PBST 및 10% BSA로 차단하였다.

[0731] 1차 항체:

[0732] 1. PBST 중의 항-4G10(밀리포어사(Millipore) 05-777) 1/1000을 4℃에서 밤새 인큐베이션시킨 후, 4×20㎖ PBST로 세척.

[0733] 2. 항-pY394 Lck(알앤디 시스템즈사(R&D Systems)) 1/2500을 4℃에서 밤새 인큐베이션시킨 후, 4×20㎖ PBST로 세척.

[0734] 2차 항체:

[0735] PBST 중의 항-마우스-hrp(시그마사 A5278) 1/5000, 그 다음 실온에서 소용돌이 진탕기(spiral shaker) 상에서 4×20㎖ PBST로 5시간 동안 세척. SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate-37070(피어스사)을 통해 검출을 수행하였다.

[0736] 항-포스포 타이로신 4G10 항체로의 프로빙은 도 3A에 도시된 바와 같이 레인 2 내지 8 모두에서 밴드를 생성시켰다. 레인 1의 표준 Lck는 희미한 밴드를 생성하였는데, 이는 일부 내인성 Lck 포스포릴화를 시사한다. ATP의 존재 하에서의 인큐베이션은 자가포스포릴화와 일치하는 밴드의 강도를 증가시켰지만, 인큐베이션에서 펩타이드 기질 KVEKIGEGTYGVVYK의 존재는 자가포스포릴화의 정도에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(레인 3 내지 4 참고). 시험 펩타이드(8Arg: RRRRRRRR(IK00800); 또는 10Arg: RRRRRRRRRR(IK00100))의 존재 하에서의 인큐베이션은 Lck에서 관찰되는 포스포릴화 수준을 상당히 증가시켰다. 또한 포스포릴화 수준은 시험 펩타이드 농도의 증가에 따라서 증가하였다(레인 5 내지 8 참고). 레인 9 및 10(시험 펩타이드 단독)는 해당 밴드가 나타나지 않는다.

[0737] 이 데이터는, Lck를 선택적으로 활성화시키는 폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Lck의 자가포스포릴화를 향상시킨다는 것을 입증한다. 이 데이터는 또한, L폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Lck의 자가포스포릴화를 용량 의존적인 방식으로 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0738] 도 3B에서 현상된 웨스턴 블롯은 항-pY394 항체에 의해 검출된 Y394에서 Lck자가포스포릴화에 대해 얻은 결과를 나타낸다. 인지될 수 있는 바와 같이, 표준 Lck 레인(레인 2)은 타이로신 Y394 부위에서 내인성 Lck 포스포릴화가 존재하지 않음을 나타내는 밴드를 나타내지 않는다. 펩타이드 기질 KVEKIGEGTYGVVYK의 유무에 관계없이 ATP의 존재 하에서의 인큐베이션은 밴드의 강도를 증가시키지 않았다(레인 3 내지 4). 시험 펩타이드의 존재 하에서의 인큐베이션은 Lck의 아미노산 위치 Y394에서 검출된 포스포릴화 수준을 상당히 증가시켰다. 다시 포스포릴화 수준은 시험 펩타이드 농도의 증가에 따라서 증가하였다(도 3B의 레인 5 내지 8 참고). 레인 9 또는 10에서 해당 밴드가 보이지 않았는데, 이는 시험 펩타이드 8 Arg(IK00800) 및 10 Arg(IK00100)와 교차 반응성이 없음을 나타낸다.

[0739] 이 데이터는, Lck를 선택적으로 활성화시키는 폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 향상시킨다는 것을 입증한다. 이 데이터는 또한, L폴리아르기닌 폴리펩타이드가 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 용량 의존적인 방식으로 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0740] **실시예 4: 시험관내에서 폴리아르기닌 폴리펩타이드에 의한 Lck 활성화의 향상**

[0741] 시험관내에서 Lck를 활성화시키는 라이신 및 아르기닌 둘 다를 포함하는 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 펩타이드를 활용하는 Lck 활성화 연구를 수행하였고, 모든 키나제 활성도 값을 대조

군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0742] 도 4는 폴리펩타이드 RSKAKNPLY(IK09400) 및 RSKAKNPLYR(IK14000)이 1uM에서 Lck를 활성화시키지 않음을 도시한다. 유사하게, 이러한 폴리펩타이드의 더 짧은 유도체는 Lck 활성화를 전혀 나타내지 않거나 무시해도 될 정도로 나타낸다.

[0743] 예를 들어, RSKAK 및RSKAK-RR은 대조군에 비해 단지 5% Lck의 활성화를 나타낸다.

[0744] 도 4는 비-Lck 활성화 폴리펩타이드가 도 1에 기재된 Lck 활성화 폴리펩타이드에 융합될 때, 융합이 놀랍게도 Lck를 활성화시킬 수 있을 뿐만 아니라 Lck 활성화의 예상치 못한 향상이 관찰된다는 것을 도시한다. 예를 들어, 비-Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY가 도 1에 도시된 9개의 연속적인 아르기닌 잔기를 포함하는 폴리펩타이드에 융합되어 Lck(RRRRRRRRR; 325%)를 선택적으로 활성화시키는 경우, 생성된 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 융합은 증가된 Lck 활성화(496%)를 나타낸다.

[0745] 도 4에서 인지될 수 있는 바와 같이, 펩타이드 RSKAK 단독 또는 1 내지 4개의 아르기닌 잔기가 커플링되는 경우 Lck 활성화가 관찰되지 않거나 무시해도 될 정도로 관찰되었다. 유사하게, 펩타이드 RSKAKNPLY 또는 RSKAKNPLYR 단독 또는 펩타이드 RSKAKNPLY가 4개의 아르기닌 잔기의 서열에 커플링된 경우 Lck 활성화가 관찰되지 않았다. 그러나, 펩타이드 RSKAKNPLY가 5개의 인접한 폴리아르기닌 잔기(펩타이드 IK14400)에 커플링된 경우 중간 수준의 Lck 활성화가 관찰되었다(85%). 유사한 결과가 RSKAKNPLY-RRRRRR 펩타이드(IK 14500)(82%) 및 Lck 활성도의 60% 증가를 유도한 D 아미노산으로 완전히 이루어진 덱스트로-리버소 펩타이드 rskaknply-rrrrrr(ID94600)에 대해서 얻어졌다.

[0746] 놀랍게도, 도 4에 또한 도시된 바와 같이, 펩타이드의 각각의 말단 단부에 시스테인 아미노산을 첨가함으로써 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRR이 고리화된 경우(즉, 펩타이드 C-RSKAKNPLY-RRRRR-C; IK4500C)(221%), 또는 더 긴 폴리아르기닌 서열이 펩타이드 RSKAK 및 RSKAKNPLY에 커플링된 경우 Lck 활성도의 실질적인 증가가 얻어졌다. 더 긴 폴리아르기닌 서열이 펩타이드 RSKAKNPLY의 리버소 또는 덱스트로-리버소 형태에 커플링된 경우 Lck 활성화에서 유사한 실질적인 증가가 또한 얻어졌다. 예를 들어, 531%의 Lck 활성도 증가가 관찰된 펩타이드 RSKAK-RRRRRRRRR(IK50900), 630%의 Lck 활성도 증가가 얻어진 RRRRRRRRR-YLPNKAKS (IK9R94Y), 각각 490% 및 616%의 Lck 활성도 증가가 얻어진 펩타이드 rskaknply-rrrrrrrrrr(IKD14800) 및 rrrrrrrrr-ylpnkaksr(IKR81400) 참고.

[0747] 또한, 펩타이드 RRRRRRRRR-SKAKNPLYR(IK9R94S)의 경우 542%의 실질적인 Lck 활성도 증가가 관찰되었다. 또한 도 4에 도시된 바와 같이, 다양이온성 서열 KKKKKKKKK 또는 RHHHHHHHHH가 펩타이드 RSKAKNPLY(펩타이드 IK94K90 및 IK14010 참고)에 결합되었을 때 Lck 활성의 단지 약간의 증가(각각 49% 및 30%)가 관찰되었는데, 이는 Lck 활성화/자극이 폴리라이신 및 폴리히스티딘 서열보다 폴리아르기닌 서열에 의해 더 크게 향상된다는 것을 나타낸다.

[0748] Lck 활성도의 실질적인 증가는 또한 펩타이드 RSKAKNPLY가 2개 또는 3개의 인접한 다양이온성 서열(즉, 각각 폴리아르긴 또는 폴리히스티딘 서열로 이루어짐) 또는 도 4 및 도 5에 도시된 바와 같이 반복되는 RK 아미노산 이중항을 포함하는 다양이온성 서열에 커플링되었을 경우 얻어졌다. 사실, 펩타이드 IK11480 및 IK14810에 대해 각각 883% 및 899%의 Lck 활성도 증가가 얻어졌다. 실질적으로 증가된 Lck 활성도는 분지형 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRRRR-HHHHHHHHHH(Br IK14810)에서도 유지되었다.

[0749] 더욱이, 펩타이드 RVKVKVVVV(IK95000) 단독 또는 도 5에서 인지될 수 있는 바와 같이 5 내지 9개의 인접한 아르기닌 아미노산 잔기 범위에서 시험된 폴리 아르기닌 서열에 결합된 경우 Lck 활성도의 실질적인 증가가 얻어졌다.

[0750] 또한 그 표에 나타낸 바와 같이, 유사한 Lck 활성도의 증가가 펩타이드 RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R(IK80150)에 대해 얻어졌다.

[0751] 펩타이드 RVKVKVVV (IK95000)가 폴리아르기닌 및 폴리히스티딘 서열의 조합물 또는 반복되는 아르기닌 및 히스티딘(RH) 이중항을 포함하는 다양이온성 서열에 커플링된 경우 Lck의 자극에 대한 결과를 또한 도 5에 제시한다. 다시, Lck 활성도의 실질적인 증가가 관찰되었고, 펩타이드 RVKVK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH(IK50810)의 경우 대조군 활성도에 비해 778%의 Lck 활성도의 증가가 관찰되었다.

[0752] 이들 결과는, 놀랍게도, 비-Lck 활성화 폴리펩타이드(예를 들어, RSKAKNPLY)가 1uM에서 Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드(예를 들어, RRRRRRRRR)를 비롯한, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드에 의해서 Lck 활성화를 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0753] **실시예 5: Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH$_2$는 용량 의존적인 방식으로 Lck를 활성화시킨다.**

[0754] 도 6은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800") 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH$_2$("IK14804")가 용량 의존적인 방식으로 Lck를 활성화시킨다는 것을 입증한다. "(2Adod)$_4$"는 4개의 2-아미노 도데칸산을 나타낸다.

[0755] **실시예 6: Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0756] IL-2 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0757] 간략하면, 야생형 주카트 세포(인간 T 림프구 세포의 불멸화된 주)를 항-CD28 항체 및 아비딘의 존재 하에서 바이오티닐화된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 자극하였다. 배양 기간(48시간 또는 72시간) 동안 세포를 시험 폴리펩타이드에 노출시켰다. 세포 상청액을 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트를 사용하여 48 또는 72시간 이후에 IL-2에 대해서 검정하였다.

[0758] 도 7A는 Lck 활성화 폴리펩타이드 "IK00900" RRRRRRRRR이 48시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 도시한다.

[0759] 도 7B는 Lck 활성화 폴리펩타이드 "IK14800" RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 72시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 도시한다.

[0760] 이러한 데이터는, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 세포주에서 IL-2 분비를 유도할 수 있고, IL-2 분비는 비-자극된 주카트 세포에서 유도되지 않음을 입증한다.

[0761] **실시예 7: Lck 활성화 폴리펩타이드는 단리된 인간 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포로부터 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0762] 단리된 인간 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포로부터 IL-2 분비에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다.

[0763] 간략하면, CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포를 단리시키고, 건강한 인간 PBMC로부터 면역 자성에 의해서 분리시켰다. Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR의 존재 하에서 48시간 동안 항-CD3 및 항-CD28 자극 후 IL-2의 수준을 조사하였다.

[0764] 도 8은 Lck 활성화 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800")이 단리된 인간 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도한다는 것을 도시한다.

[0765] **실시예 8: Lck 활성화 폴리펩타이드는 단리된 인간 CD3+ T 세포로부터 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0766] 단리된 T 세포(CD3+ T 세포)로부터 IL-2 분비에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다.

[0767] 간략하면, 단리된 T 세포(CD3+)를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 72시간 동안 5-범위에 걸쳐서 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800"), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR("IK15800") 및 D 아미노산만을 포함한 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(즉, rvkvkvvvv-rrrrrrrrr; "IKD15800")와 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25 μM)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 수집하고, ELISA에 의해서 IL-2에 대해서 평가하였다.

[0768] 도 9는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 D 아미노산만을 포함하는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(즉, rvkvkvvvv-rrrrrrrrr)이 단리된 인간 T 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 나타낸다.

[0769] 자극된 CD4+ T 세포 검정에서 CD4+ T 세포로부터 IL-2 분비에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 또한 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 5-농도 범위에 걸쳐서 Lck 활성화 펩타이드 RRRRRRRRR("IK00900") 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR("IK14800")과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25 μM)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IL-2 및 IFN-γ에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR은 자극된 T 세포 검정에서 인간 CD4+ T 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도한다(데이터 나타내지 않음). 이러한 데이터는, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 인간 CD4+ T 세포로부터 IL-2 분비를 유도할 수 있다는 것을 나타낸다(데이터 나타내지 않음).

[0770] **실시예 9: Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL2Ra(CD25) 발현을 증가시킨다.**

[0771] T 세포주에서 IL2Ra(CD25) 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다.

[0772] 간략하면, 야생형 주카트 세포(1×10^6개 세포)를 상기와 같이 표준 RPMI 배지 및 10% 우태아 혈청에서 배양하고, 96시간의 기간 동안 PMA(50 ng/㎖) 및 이오노마이신으로 자극하거나 또는 자극하지 않았다. 세포를 전체 96시간의 배양 기간 동안 도 10에 열거된 시험 펩타이드(2.5μM 농도)에 노출시켰고, 상기에 기재된 바와 같은 표준 시판 ELISA 포맷을 사용하여 세포 용해물에서 IL-2R 알파 수준을 결정하였다.

[0773] 도 10은 자극된 세포를 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR(IK14900), HHHHH-RSKSKNPLY-RRRRRRRRR(IK11480), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH(IK14820) 및 특히 펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IK14800)에 노출하였을 때 IL-2R 알파(CD25) 발현이 증가되었다는 것을 나타낸다.

[0774] 이러한 데이터는, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 세포주에서 IL-2Ra 발현을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0775] **실시예 10: Lck 활성화 폴리펩타이드는 재자극 시 고갈된 CD4+ 세포에서 IL2Ra(CD25) 발현을 증가시킨다.**

[0776] T-세포 고갈은 T-세포 기능의 단계적이고 점진적인 손실을 특징으로 하며, 반응하는 세포의 물리적 결실을 초래할 수 있다. 인터류킨-2(IL-2) 생산은 소멸될 첫 번째 효과기 활동 중 하나이며, 그 다음 종양 괴사 인자-α(TNF-α) 생산이 이어지는 반면, 인터페론-γ(IFN-γ)의 생산 능력은 비활성화에 더 양호하게 저항성이다.

[0777] 1uM에서 Lck를 활성화시키지 않는 펩타이드 IK14000(RSKAKNPLYR)및 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 IK14800(RSKAKNPLYRRRRRRRRR) 및 IKD14800(rskaknply-rrrrrrrrr)의 IL2Ra 발현에 대한 효과를 조사하였다.

[0778] 뮤린 모델(Tg4 Ly5.1(MBP-트래커 마우스(Tracker Mouse)), B10PlxC57BL/6)을 사용하는 CD4+T 세포 고갈 검정을 사용함으로써, CD4+ T 세포 수용체 트랜스제닉 T 세포를 야생형 미엘린 염기성 단백질 펩타이드(WT-MBP)로 자극하여 완전 반응성 효과기 T 세포 또는 변경된 펩타이드 리간드 펩타이드 MBP(APL-MBP)를 생산하여 고갈된 T 세포를 생산한다. 이들을 IL-2에서 유지시키고, 조사 조사중인 임의의 치료와 함께 APL-MBP 펩타이드 용량인 APC로 2차 자극된다.

[0779] 세포 배양 절차

[0780] 상기에 언급된 마우스로부터 비장을 제거하고, 가공하여 비장세포의 단일 세포 현탁액을 생성시켰다. MBP-트래커 비장세포를 3×10^6/㎖로 재현탁시키고, WT-MBP(대조군, 비-고갈된 세포) 또는 APL-MBP(고갈된 세포를 생성시키기 위함)로 자극하였다. 세포를 72시간 동안 자극하였다. 자극 후, T 세포를 Ficoll 밀도 구배로 정제시키고, 그 다음 4일 동안 20U/㎖ IL-2에서 2×10^6/㎖로 재플레이팅하였다. 이러한 유지 기간 후, 세포를 재현탁시키고(4×10^5/㎖, 웰당 최종 2×10^4), 다양한 농도 범위에 걸쳐서 단일 용량의 APL-MBP 펩타이드 및 시험 펩타이드인 방사능 조사된 APC(B10PLxC57BL/6 마우스로부터, 4×10^6/㎖, 웰당 최종 농도 2×10^5개 세포)를 사용하여 재자극하였다. 48 내지 72b시간 배양 후, 세포를 IL-2Ra 및 증식의 마커(각각 CD25 및 Ki-67)에 대해서 유세포 분석법으로 평가하고, ELISA에 의해서 또는 멀티플렉싱 면역검정(multiplexed immunoassay)으로 사이토카인(IFN-γ 및 TNF-α) 생산을 평가하기 위해서 상청액을 수거하였다.

[0781] 세포를 배양물 중에서 72시간 후 유세포 분석법을 위해서 염색하여 CD25를 평가하였다(MFI, 상단, 발현 및 빈도의 수준을 나타내기 위해서, 하단). 살아있는 집단 내에서, 세포를 게이팅하여 CD4+ 세포에 초점을 맞췄고, 이어서 CD25+ 집단에 대해서 게이팅하였다.

[0782] 도 11은 CD25의 발현이 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 IK14800(RSKAKNPLY-RRRRRRRRR) 및 IKD14800(rskaknply-rrrrrrrrr)로의 재자극 시 고갈된 CD4+ T 세포에서 증가된다는 것을 입증하였다. 이러한 데이터는, Lck-활성화 폴리펩타이드가 재자극된 고갈된 T 세포에서 생리학적으로 제어되는 결과(예를 들어, IL-2Ra 발현)을 향상시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0783] **실시예 11: Lck 활성화 폴리펩타이드는 면역관문 차단으로부터 인간 T 세포주를 구제한다.**

[0784] 면역계의 과활성화를 예방하기 위해서, 예정사 1(PD-1) 경로가 면역관문으로 작용하여 T 세포 활성화를 제어한다. 이러한 경로는 리간드 PD-L1 및 PD-L2가 PD-1 수용체에 결합할 때 활성화되어, T 세포 활성화 및 증식의 가역적인 저해인 T 세포 "고갈"을 초래한다. PD-L1에 의해서 유도된 면역관문 차단으로부터 인간 T 세포를 구조하

는 능력을 위해서 본 발명의 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0785] 간략하면, 주카트 세포를 배양물 접시에 부착된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 활성화시켜 세포 예정사 수용체 1(PD-1)의 세포 표면 발현을 유도하였고, 48시간 동안 첨가제의 부재 하에서 또는 펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2(2.5μM의 IK14800) 단독과 함께, 세포에서 면역관문 차단을 유도하기 위해서 5㎍/㎖의 재조합 PD-L1(PD-1에 대한 리간드) 단독과 함께 또는 IK14800 펩타이드와 재조합 PD-L1과 함께 배양하였다. 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트에 의해서 IL-2R 알파(CD25)를 세포 용해물에서 측정하였다.

[0786] 상기에 제시된 데이터와 일관되게, 도 12는, 본 발명의 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드로 처리될 때, CD3-자극 세포(PD-L1의 부재 하에서)는 CD25 발현 수준을 증가시켰다.

[0787] 중요하게는, 도 12는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2의 첨가가 PD-1/PD-L1 상호작용에 의해서 유도된 IL-2R알파의 억제를 구제하였다는 것을 나타낸다.

[0788] 이 데이터는 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 PD-L1에 의해서 유도된 면역관문 차단으로부터 인간 T 세포를 구조할 수 있다는 것을 입증한다.

[0789] **실시예 12: Lck 활성화 폴리펩타이드는 항-CD3 자극된 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포에서 IL2Ra(CD25) 발현을 증가시킨다.**

[0790] 항-CD3 자극 PBMC로부터 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL2Ra(CD25) 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다. 새로 단리된 PBMC를 제시된 농도(μM)의 본 발명에 따른 Lck 활성화 폴리펩타이드; RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2("IK14800")의 존재 하에서 존재 하에서 항-CD3(1㎍/㎖)과 함께 또는 이것 없이(-aCD3) 24시간 동안 자극하였다.

[0791] 도 13은 항-CD3로 자극될 때 IL2Ra(CD25)의 발현이 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 증가된다는 것을 입증한다.

[0792] 이 데이터는, Lck-활성화 펩타이드가 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL-2Ra 발현을 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0793] 실시예 13: Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨다.

[0794] IL-12 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 야생형 주카트 세포(인간 T 림프구 세포의 불멸화된 주)를 항-CD28 항체 및 아비딘의 존재 하에서 바이오티닐화된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 자극하였다. 배양 기간(48시간) 동안 세포를 시험 폴리펩타이드에 노출시켰다. 세포 상청액을 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트를 사용하여 48시간 이후에 IL-12에 대해서 검정하였다.

[0795] 도 14A는 Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR이 48시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-12 분비를 유도하는 것을 도시한다. Lck 활성화 폴리아르기닌 폴리펩타이드 RRRRRRRRR도 48시간 노출 후에 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-12 분비를 유도하였다(데이터 나타내지 않음). 이러한 데이터는, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 세포주에서 IL-12 분비를 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0796] IL-12 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력에서 Lck의 역할을 또한 조사하였다. 간략하면, Lck가 결핍된 주카트 세포(J.Cam 1.6)를 항-CD28 항체 및 아비딘의 존재 하에서 바이오티닐화된 항-CD3 항체에 노출시킴으로써 자극하였다. 배양 기간(48시간) 동안 세포를 시험 폴리펩타이드에 노출시켰다. 세포 상청액을 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트를 사용하여 48시간 이후에 IL-12에 대해서 검정하였다.

[0797] 도 14B는 대조군에 비해서 주카트 세포에서 IL-12 분비를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IK14800)의 능력이 Lck의 존재에 의해서 향상된다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는, Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR에 의한 인간 T 세포주에서의 IL-12가 Lck의 존재에 의해서 향상된다는 것을 입증한다.

[0798] **실시예 14: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 PBMC에서 IL-12 분비를 증가시킨다.**

[0799] IL-12(IL-12p70) 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 추가로 조사하였다. 간략하면, 항-CD3

자극 PBMC를 항-CD40L 차단 항체의 존재 하에서 그리고 이의 부재 하에서 24시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR('IK15800") 및 RSKAKNPLYRRRRRRRRR("IK14800") 그리고 D 아미노산만을 포함하는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(각각 "IKD15800" 및 "IKD14800")과 함께 배양하였다. 상청액을 ELISA에 의해서 IL-12p70 수준에 대해서 평가하였다.

[0800] 도 15는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 그리고 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(각각 "IKD15800" 및 "IKD14800")이 IL-12의 생산을 저해하는 항-CD40L 차단 항체의 존재 하에서 항-CD3 자극된 PBMC에 비해서, 항-CD3 자극된 PBMC에서 IL-12 분비를 유도하는 것을 나타낸다.

[0801] 이러한 데이터는, 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 PBMC에서 IL-12p70 분비를 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0802] IL-12(IL-12p70) 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 펩타이드의 부재 조건과 비교하여 조사하였다. 간략하면, PBMC를 항-CD3(1ug/㎖) 및 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 또는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR과 함께 24시간 또는 72시간 동안 배양하였다. 상청액을 ELISA에 의해서 IL-12p70 수준에 대해서 평가하였다.

[0803] 도 16은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 24시간(그리고 72시간, 데이터 나타내지 않음)에 단백질의 부재 조건에 비해서 IL-12p70 분비를 유도하였다는 것을 나타낸다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)은 72시간에 펩타이드 대조군 부재 조건에 비해서 IL-12p70 분비를 유도하였다(데이터 나타내지 않음).

[0804] **실시예 15: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 PBMC에서 IL-12Rβ2 분비를 증가시킨다.**

[0805] IL-12 수용체 소단위 베타 2(IL-12Rβ2) 발현을 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0806] 항-CD3 자극된 PBMC를 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800) 그리고 비히클 대조군과 함께 72시간 동안 배양하고, 그 후 CD4+ T 세포 및 NK 세포($CD3^{neg}$ CD56+ 세포)를 유세포 분석법으로 IL-12Rβ2 발현에 대해서 평가하였다.

[0807] 도 17은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 NK 세포($CD3^{neg}$ CD56+ 세포)의 집단에서 IL-12Rβ2 발현을 유도한다는 것을 나타낸다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR은 또한 CD4+ T 세포의 집단에서 IL-12Rβ2 발현을 유도하였다(데이터 나타내지 않음).

[0808] **실시예 16: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 CD4+ T 세포에서 IL-21R 발현을 증가시키지 않는다.**

[0809] 자극된 CD4+ T 세포 검정에서 CD4+ T 세포에서 IL-21R (CD360) 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR과 함께 배양하고, 그 후 세포를 유세포 분석법으로 IL-21R 발현에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR(IK00900) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)은 인간 자극된 CD4+ T 세포에서 IL-21R 발현을 증가시키지 않는다(데이터 나타내지 않음).

[0810] **실시예 17: Lck 활성화 폴리펩타이드는 IFN-γ 분비를 유도한다.**

[0811] 인간 PBMC에 의해서 IFN-γ 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR와 함께 배양하고 48시간 동안 그 후 상청액을 수거하고, ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR은 펩타이드 부재 대조군에 비해서 IFN-γ 분비를 유도한다(데이터 나타내지 않음).

[0812] 자극된 CD4+ T 세포 검정 단리된 인간 CD4+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 또한 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 펩타이드 RRRRRRRRR(IK00900) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. 도 18은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 펩타이드 부재 대조군에 비해서 IFN-γ 분비를 유도한다는 것을 나타낸다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR은 펩타이드 부재 대조군(데이터 나타내지 않음)에 비해서 IFN-γ 분비를 유도하였다.

[0813] 자극된 CD8+ T 세포 검정에서 단리된 인간 CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD8+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 펩타이드 RRRRRRRRR(IK00900) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR and RSKAKNPLY-RRRRRRRRR은 펩타이드 부재 대조군에 비해서 IFN-γ 분비를 유도하였다(데이터 나타내지 않음). 이러한 데이터는 본 발명의 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 유도할 수 있다는 것을 입증한다.

[0814] **실시예 18: D 아미노산을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 인간 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 유도한다.**

[0815] 자극된 CD8+ T 세포 검정에서 단리된 인간 CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 변경시키는 D 아미노산을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0816] 간략하면, 단리된 CD8+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 D 아미노산만을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IKD14800)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. 도 19는 D 아미노산만을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IKD14800)가 펩타이드 부재 대조군에 비해서 자극된 인간 CD8+ T 세포에 의해서 IFN-γ 분비를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0817] 자극된 CD4+ T 세포 검정에서 단리된 인간 CD4+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 변경시키는 D 아미노산을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 또한 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IK14800), 또는 D 아미노산만을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IKD14800)과 함께 배양하였고, 그 후 상청액을 ELISA에 의해서 IFN-γ에 대해서 평가하였다. L 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR과 같이 D 아미노산만을 포함하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR는 펩타이드 부재 대조군에 비해서 자극된 인간 CD4+ T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 유도한다(데이터 나타내지 않음).

[0818] **실시예 19: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극된 CD8+ T 세포 검정에서 CD8+ T 세포의 증식을 증가시킨다.**

[0819] 자극된 CD8+ T 세포 검정에서 단리된 인간 CD8+ T 세포의 증식을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD8+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR와 함께 배양하고, 그 후 CD8+ T 세포를 유세포 분석법으로 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. Ki67은 주어진 세포 집단, 이 경우 CD8+ 세포의 성장 분율을 결정하기 위해서 사용되는 증식 마커이다. 도 20은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 인간 CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0820] **실시예 20: Lck 활성화 폴리펩타이드는 PBMC 내에서 CD8+ T 세포 및 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 증식을 증가시킨다.**

[0821] PBMC 내에서 단리된 인간 CD8+ T 세포의 증식을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 72시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RRRRRRRRR(IK00900) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)와 함께 배양하고, 그 후 CD8+ T 세포를 유세포 분석법으로 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. Ki67은 주어진 세포 집단, 이 경우 CD8+ 세포의 성장 분율을 결정하기 위해서 사용되는 증식 마커이다. 도 21은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 인간 CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0822] PBMC 내에서 단리된 인간 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 증식을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 72시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 rvkvkvvvv-rrrrrrrrr(IKD15800)와 함께 배양하고, 그 후 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포를 유세포 분석법으로 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. Ki67은 주어진 세포 집단, 이 경우 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 성장 분율을 결정하기 위해서 사용되는 증식 마커이다. Lck 활성화 폴리펩타이드 rvkvkvvvv-rrrrrrrrr(IKD15800)은 인간 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 증식 중인 집단을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0823] Lck 활성화 폴리펩타이드 rvkvkvvvv-rrrrrrrrr(IKD15800)는 또한 CD25 양성인 인간 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 집단, CD215 양성인 인간 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 집단 및 CD360 양성인 인간 $CD3^{neg}$ $CD56^{+}$ NK 세포의 집단을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0824] **실시예 21: Lck 활성화 폴리펩타이드는 CD8+ 세포 및 CD4+ T 세포에서 CD28 발현을 증가시킨다.**

[0825] CD28 발현을 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 72시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR와 함께 배양하고, 그 후 세포를 유세포 분석법으로 CD28의 발현에 대해서 평가하였다.

[0826] 도 22A는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 펩타이드 부재 대조군에 비해서 CD8+ T 세포의 CD28 발현을 유도하는 것을 나타낸다.

[0827] 도 22B는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 펩타이드 대조군이 없는 것에 비해서 CD4+T 세포에서 CD28 발현을 유도하는 것을 나타낸다.

[0828] **실시예 22: Lck 활성화 폴리펩타이드는 PBMC에서 IL-15R 발현 및 IL-15 분비를 증가시킨다.**

[0829] PBMC의 CD4+ T 세포에서 CD215(IL-15R) 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다. 간략하면, PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800) 및 RSKAKNPLYRRRRRRRRR과 함께 5-농도 범위(0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 72시간 동안 배양하였고, 그 후 세포를 유세포 분석법에 의해서 CD215(IL-15R)의 발현에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR는 인간 자극된 CD4+ T 세포에서 IL-15R 발현을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0830] 자극된 CD8+ T 세포 검정에서 CD8+ T 세포에서 IL-15R 발현 및 IL-15 분비에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 또한 조사하였다. 간략하면, PBMC를 항-CD3(1㎍/㎖) 자극 그리고 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IK14800)와 함께 5-농도 범위 (0 내지 1.25μM)에 걸쳐서 배양하였다. 상청액을 수거하고, ELISA에 의해서 IL-15에 대해서 평가하였다. 도 23A는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 CD8+ T 세포에서 IL-15R 발현을 증가시키고, 도 23B는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 CD8+ T 세포로부터의 IL-15 분비를 증가시킨다는 것을 나타낸다. 도 23C는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 또한 인간 자극된 CD8+ T 세포에서 IL-15R 발현을 증가시켰다는 것을 나타낸다.

[0831] **실시예 23: Lck 활성화 폴리펩타이드는 PBMC에서 CD28+ CD8+ T 세포의 증식을 증가시킨다.**

[0832] PBMC의 증식을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드를 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR과 함께 72시간 동안 배양하고, 그 후 세포를 유세포 분석법으로 Ki67 발현에 대해서 평가하였다. Ki67은 주어진 세포 집단, 이 경우 CD28+/CD8+ 세포의 성장 분율을 결정하기 위해서 사용되는 증식 마커이다.

[0833] 도 24는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 인간 CD28+/CD8+ T 세포의 증식 중인 집단을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0834] **실시예 24: Lck 활성화 폴리펩타이드는 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL-18Ra 발현을 증가시킨다.**

[0835] 자극된 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포 검정에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상의 IL-18Ra 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다. 간략하면, 단리된 CD8+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, 및 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR와 함께 배양하고, 그 후 세포를 유세포 분석법으로 IL-18Ra발현에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800) 및 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLYRRRRRRRRR(IKD15800)은 인간 자극된 CD8+ T 세포에서 IL-18Ra 발현을 증가시킨다(데이터 나타내지 않음).

[0836] 간략하면, 단리된 CD4+ T 세포를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고, 24시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, 및 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR와 함께 배양하고, 그 후 세포를 유세포 분석법으로 IL-18Ra발현에 대해서 평가하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800) 및 D 아미노산만을 포함하는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IKD15800)은 인간 자극된 CD4+ T 세포에서 IL-18Ra 발현을

증가시킨다(데이터 나타내지 않음).

[0837] **실시예 25: Lck 활성화 폴리펩타이드는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에서 pSTAT4 발현을 변경시킨다.**

[0838] CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에서 세포내 pSTAT4 발현에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 자극 T 세포 검정으로 조사하였다. 간략하면, 단리된 T 세포(CD3+)를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™로 자극하고 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR, RVKVKVVVVRRRRRRRRR 및 D 아미노산만을 포함하는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR와 함께 5-농도 범위에 걸쳐서 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 72시간 동안 배양하고, 그 후 상청액을 수거하고, 유세포 분석법으로 p-STAT4 발현에 대해서 평가하였다.

[0839] Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800), 및 D 아미노산만을 포함하는 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IKD15800)은 인간 자극된 CD4+ T 세포에서 p-STAT4 발현을 증가시킨다(데이터 나타내지 않음).

[0840] **실시예 26: Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 PBMC에서 조절 T 세포의 백분율을 감소시킨다.**

[0841] 인간 PBMC에서 조절 T 세포 구성원에 대한 Lck 활성화 폴리펩타이드의 효과를 조사하였다. 간략하면, 항-CD3 자극된 PBMC를 48시간 동안 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR 및 RSKAKNPLYRRRRRRRRR과 함께 배양하고, 그 후 CD4+ CD25+ $CD127^{low}$ 집단에서 세포의 Foxp3+ 비율을 측정함으로써 Treg 집단을 결정하였다. Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)는 Treg(Foxp3+)의 비율을 감소시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0842] **실시예 27: CD40L은 $CD14^{neg}$ $CD11c^{+}$ 수지상 세포 표현형을 향상시킨다.**

[0843] 단리된 미숙 DC 세포 배양물에서 수지상 세포 표현형에 대한 CD40L의 효과(CD14 발현)를 조사하였다. 간략하면, 미성숙 단핵구 유래된 DC(immature monocyte derived DC: iMoDC)를 MoDC 분화 배지에서 7일 동안 배양된 단리된 CD14+ 단핵구로부터 유도하였다. iMoDC를 CD40L(5ug/㎖) 및 항-CD3(1ug/㎖)의 존재 하에서 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후, 세포를 유세포 분석법으로 CD14 발현 및 CD11c 발현에 대해서 평가하여 DC 세포 표현형을 결정하였다. CD40L은 CD14음성 CD11c+ 수지상 세포의 비율을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0844] 단리된 미성숙 DC 배양물에서 수지상 세포(DC) 표현형에 대한 시험 펩타이드의 효과(CD14 발현)를 또한 조사하였다.

[0845] 간략하면, 미성숙 단핵구 유래 DC(iMoDCs)를 Mo-DC 분화 배지에서 7일 동안 배양된 단리된 CD14+ 단핵구로부터 유도하였다. iMoDC를 5-지점 농도 곡선의 시험 펩타이드의 존재 하에서 그리고 비히클 (0 내지 1.25μM) 및 항-CD3(1㎍/㎖)과 함께 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후, 세포를 유세포 분석법으로 CD14 발현 및 CD11c 발현에 대해서 평가하여 DC 세포 표현형을 결정하였다. 제공된 데이터는, 펩타이드 처리에 반응한 CD11c 양성 집단에서의 평균 각각의 CD14 양성 또는 음성 세포 집단(%)을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 데이터를 펩타이드 농도를 비히클과 비교하는 듀넷 사후 검정과 함께 RM 양측 ANOVA에 의해서 분석하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

[0846] Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)는 CD14 음성 수지상 세포의 집단을 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

[0847] **실시예 28: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극 T 세포 검정에서 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 상에서의 IL-12Rβ2 발현을 증가시킨다.**

[0848] T 세포에서 IL-12 수용체 소단위 베타 2(IL-12Rβ2) 발현을 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0849] 간략하면, 단리된 T 세포(CD3+)를 항-CD3 항-CD28 Dynabeads™으로 자극하고, 5-농도 범위에 걸친 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR과 함께 그리고 비히클 대조군(0 내지 1.25μM)과 함께 72시간 동안 배양하였고, 그 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 유세포 분석법에 의해서 IL-12Rβ2 발현에 대해서 평가하였다.

[0850] 도 25는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포에서 IL-12Rβ2 발현을 유도하는 것을 나타낸다.

[0851] **실시예 29: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극 PBMC 검정에서 NK 세포 상에서의 IL-2Rβ(CD122) 발현을 증가시킨다.**

[0852] NK 세포에서 IL-2 수용체 소단위 베타 2(IL-2Rβ) 발현을 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0853] 간략하면, 건강한 공여자로부터의 PBMC를 시험 펩타이드(0.08 내지 1.25μM) 또는 비히클 대조군의 존재 하에서 항-CD3(1㎍/㎖)로 72시간 동안 자극하였다. 배양 기간 후에, 세포를 수집하고, 유세포 분석법에 의해서 $CD3^{neg}CD56^{+/dim}$ NK 세포에서 IL-2Rβ(CD122) 발현에 대해서 측정하였다.

[0854] 도 26은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800) 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 CD3negCD56+/dim NK 세포에서 IL-2Rβ 발현을 유도하는 것을 나타낸다.

[0855] **실시예 30: Lck 활성화 폴리펩타이드는 CD8+ 세포 집단의 확장을 초래한다.**

[0856] *PBMC에서 CD8+ 세포 집단의 확장을 초래하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0857] 간략하면, 건강한 공여자로부터의 PBMC 또는 단리된 CD8+ T 세포를 TCR + IL-2를 통해서 10일 동안 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(0.08 내지 1.25μM) 또는 비히클 대조군의 존재 하에서 자극하였다. 배양 기간 후에, 세포를 수집하고, 유세포 분석법에 의해서 CD8+ 세포 비율에 대해서 분석하였다.

[0858] 도 27은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)이 PBMC 내에서 CD8+ 세포 집단의 확장을 유도하는 것을 나타낸다.

[0859] **실시예 31: Lck 활성화 폴리펩타이드는 CD4+ T-세포에 의한 IL-21 생산을 유도한다.**

[0860] CD4+ T 세포에 의한 IL-21 생산을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0861] 간략하면, CD4+ T 세포를 단리시키고, 항-CD3 항-CD28 자극 및 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR의 존재 하에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상청액을 ELISA에 의해서 IL-21에 대해서 평가하였다.

[0862] 도 28은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 CD4+ T-세포에 의해서 IL-21 생산을 유도하는 것을 나타낸다.

[0863] **실시예 32: 항원 자극 전에 제공된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 유도한다.**

[0864] 인간 T 림프구(주카트) 세포주에 의한 IL-2 생산을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0865] 간략하면, 5백만개의 세포를 T25 플라스크에 시딩하고, 상기 표에 제시된 바와 같은 다양한 농도의 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)로 1시간 동안 처리하고, 그 후 세포 현탁액을 원심분리시키고, 새로운 배지로 2회 세척하였다.

[0866] 배지 500uL 중의 바이오틴-항-CD3과 아비딘(5: 1.25ug)의 혼합물을 12웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 10분 후, 세포를 웰당 1백만개로 시딩하고, 배지를 사용하여 세포 현탁액을 최대 2㎖ 부피로 만들었다. 그 다음 샘플을 항-CD28(5ug/㎖)로 추가로 자극하고, 48시간 37℃에서 인큐베이션시키고, 이어서 상청액(100uL, n=3)을 ELISA에 의해서 IL-2 함량에 대해서 분석하였다.

[0867] 도 29는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 항원 자극 전에 투여되는 경우, 후속 자극 시 인간 T 세포주에 의한 IL-2 생산을 유도하는 것을 나타낸다.

[0868] **실시예 33: 마우스에게 투여된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 루이스 폐암 마우스(전이 모델)에서 CD4+ CD28+ T 세포를 유도한다.**

[0869] 마우스에서 CD4+ CD28+ T 세포를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0870] 간략하면, 루이스 폐암 세포를 ATCC에서 입수하였고, DMEM에서 70% 컨플루언스로 성장시키고, 떼어내고, PBS에서 세척하였다. 제0일에, 각각의 마우스에게 꼬리 정맥으로의 정맥내 주사에 의해 0.5×10^{6}개 LLC 세포를 제공하였다. 치료제(200㎕ 물 중의 250㎍의 용량의 IK14800)를 I.P.로 주 2회 투여하였다(세포 전달 후 제1일, 제4일, 제8일 및 제11일). 세포 접종 15일 후, 마우스를 안락사시키고, 비장을 제거하여 상기 프로토콜에 상술된 바와 같은 단일 세포 현탁액을 생성시켰다(이탤릭체). 이어서 단리된 비장세포 세포 현탁액을 유세포 분석법으로 CD4, CD8, NK1.1, CD28, CD215 및 pSTAT4의 발현에 대해서 평가하였다.

[0871] 도 30은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 루이스 폐암 마우스의 비장세포에서 CD28을

발현하는 CD4+ T 세포의 백분율 및 CD4+ T 세포에서 CD28의 상대적인 발현을 증가시키는 것을 나타낸다.

[0872] Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)은 또한 루이스 폐암 마우스의 비장세포에서 NK 세포에 대한 CD25의 상대적 발현을 증가시킨다(데이터 나타내지 않음).

[0873] 본 발명자들은 또한 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 인간 폐암 종양 침윤 림프구(TIL)의 CD25+ MFI 및 CD25+CD57+ MFI에 의해서 측정되는 바와 같이 TIL로부터 단리된 CD57+ NK 세포에서 CD25 발현을 유도한다는 것을 입증하였다. 간략하면, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)은 1.25um로의 처리 시 CD25 발현을 증가시켰다.

[0874] **실시예 34: 루이스 폐암 마우스(전이 모델)에 투여된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 비장세포에서 CD28 및 CD215를 발현하는 CD8+ T 세포를 유도한다.**

[0875] 마우스에서 CD28 및 CD215를 발현하는 CD8+ T 세포를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0876] 루이스 폐암 세포를 ATCC에서 입수하였고, DMEM에서 70% 컨플루언스로 성장시키고, 떼어내고, PBS에서 세척하였다. 제0일에, 각각의 마우스에게 꼬리 정맥으로의 정맥내 주사에 의해 0.5×10^6개 LLC 세포를 제공하였다. 치료제(200㎕ 물 중의 250㎍의 용량의 IK14800)를 I.P.로 주 2회 투여하였다(세포 전달 후 제1일, 제4일, 제8일 및 제11일). 세포 접종 15일 후, 마우스를 안락사시키고, 비장을 제거하여 상기 프로토콜에 상술된 바와 같은 단일 세포 현탁액을 생성시켰다(이탤릭체). 이어서 단리된 비장세포 세포 현탁액을 유세포 분석법으로 CD4, CD8, NK1.1, CD28, CD215 및 pSTAT4의 발현에 대해서 평가하였다.

[0877] 간략하면, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR로 처리된 루이스 폐암 마우스로부터의 비장세포를 단리시키고, 처리된 루이스 폐암 마우스의 CD28+ CD8+ 세포의 비율을 조사하였다.

[0878] 도 31은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)가 루이스 폐암 마우스의 비장 세포에서 CD4+ 세포 상에서 CD215(IL-15R) 및 CD28을 발현하는 CD8+ T 세포의 백분율을 증가시킨 것을 나타낸다.

[0879] **실시예 35: 마우스에게 투여된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 NK 세포에서 pSTAT4의 발현을 증가시킨다.**

[0880] 마우스에서 pSTAT4 발현을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0881] 루이스 폐암 세포를 ATCC에서 입수하였고, DMEM에서 70% 컨플루언스로 성장시키고, 떼어내고, PBS에서 세척하였다. 제0일에, 각각의 마우스에게 꼬리 정맥으로의 정맥내 주사에 의해 0.5×10^6개 LLC 세포를 제공하였다. 치료제(200㎕ 물 중의 250㎍의 용량의 IK14800)를 I.P.로 주 2회 투여하였다(세포 전달 후 제1일, 제4일, 제8일 및 제11일). 세포 접종 15일 후, 마우스를 안락사시키고, 비장을 제거하여 상기 프로토콜에 상술된 바와 같은 단일 세포 현탁액을 생성시켰다(이탤릭체). 이어서 단리된 비장세포 세포 현탁액을 유세포 분석법으로 CD4, CD8, NK1.1, CD28, CD215 및 pSTAT4의 발현에 대해서 평가하였다.

[0882] 간략하면, RSKAKNPLYRRRRRRRRR로 처리된 루이스 폐암 마우스로부터의 비장세포를 단리시키고, 처리된 루이스 폐암 마우스의 NK 세포에서 pSTAT4의 발현을 조사하였다.

[0883] 도 32는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 루이스 폐암 마우스로부터의 비장세포에서 NK 세포 상의 pSTAT4의 발현을 증가시키는 것을 나타낸다.

[0884] **실시예 36: 음이온성 잔기를 포함하는 폴리펩타이드는 Lck를 활성화시키지 않는다.**

[0885] Lck를 활성화시키는 음이온성 잔기를 포함하는 펩타이드의 능력을 조사하였다. 도 33은 폴리펩타이드 DDDDDDDDD가 Lck의 활성도를 증가시키지 않는 것을 나타낸다.

[0886] **실시예 37: Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0887] IL-2 분비를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력에서 Lck의 역할을 또한 조사하였다.

[0888] 간략하면, 12웰 플레이트를 PBS(200㎕)에서 제조된 항-CD3(5㎍/㎖) 용액으로 코팅하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 다음 날 항-CD3 용액을 흡인시키고, 웰을 배지(1㎖, 10분)로 2회 약간 세척하였다. 주카트 세포(WT 및 Lck 결핍)를 항-CD3 코팅된 12웰 플레이트에서 웰당 1백만개 로 시딩하고, 추가로 항-CD28(5㎎/㎖)로 자극하고, 0시간에 IK14800(2.5μM)으로 처리하였다. 세포를 24시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 상청액을 ELISA에 의해서 IL-2에 대해서 분석하였다.

[0889] 도 34는 대조군에 비해서, 주카트 세포에서 IL-2 분비를 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLYRRRRRRRRRR(IK14800)의 능력이 Lck에 좌우된다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는, Lck 활성화 융합 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR에 의한 인간 T 세포주에서 IL-2 분비는 Lck에 좌우된다는 것을 입증한다.

[0890] **실시예 38: Lck 활성화 폴리펩타이드는 자극 시에만 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0891] 자극의 존재 또는 부재 하에서 인간 T 림프구(주카트) 세포주에 의한 IL-2 생산을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0892] 간략하면, 12웰 플레이트를 PBS(200㎕)에서 제조된 항-CD3(5㎍/㎖) 용액으로 코팅하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서 항-CD3 용액을 흡인시키고, 웰을 배지(1㎖, 10분)로 2회 약간 세척하였다. 주카트 세포를 웰당 1백만개로 시딩하고, 항-CD28(5㎍/㎖)로 추가로 자극하고, 이어서 0시간에 RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR(IK14800)(2.5μM)로 처리하였다. 세포를 72시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 상청액을 ELISA에 의해서 IL-2에 대해서 분석하였다.

[0893] 도 35는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)로의 처리에 의한 IL-2 생산의 증가가 항원 자극의 부재 하에서 일어나지 않는다는 것을 나타낸다.

[0894] **실시예 39: Lck 활성화 폴리펩타이드에 의한 루이스 폐암 마우스(이종이식 모델)에서 종양 덩어리의 억제.**

[0895] 루이스 폐암(LLC) 마우스에서 종양 덩어리를 감소시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0896] 루이스 폐 암종 세포주를 대략 70%의 컨플루언시로 배양하고, 그 후 세포를 수거하고, 계수하고, 멸균 HBSS에서 5×10^6개/㎖로 재현탁시켰다. C57BL/6을 우측 옆구리에 1×10^6개 세포(100㎕)로 피하 주사하였다. 평균 종양 크기가 2개의 군 사이에서 대략 동일하도록 마우스를 종양 세포 이식 5일 후 치료군에 무작위로 배정하였다. 종양 세포 이식 10일 전부터, 비히클 처리군에서 종양이 평균 10㎜의 직경에 도달할 때까지, RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(물 200ul 중의 200ug) 또는 비히클(물)을 복강내(i.p) 주사를 통해서 주 2회(월요일과 목요일) 투여하였다. 처리군에 대해서 맹검된 과학자에 의해서 종양을 디지털 캘리퍼를 사용하여 매주 3회(월요일, 수요일, 금요일) 측정하였다. 비히클군에 대한 평균 종양 크기가 10㎜ 직경에 도달했을 때, 경추 탈골로 마우스를 희생시키고, 종양 및 비장을 수집하였다.

[0897] 종양을 콜라게나제(Collagenase) D(2㎎/㎖, 로슈사(Roche) 로트 번호28960126) 및 DNase I(100㎍/㎖, 시그마사 로트 번호 SLBV1446)를 함유하는 2㎖의 RPMI-1640에 넣고, 기계적으로 소화시키고, 그 후 80rpm으로 30분 동안 진탕 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션시켰다. 소화된 종양 샘플을 70㎛ 스트레이너(strainer)에 통과시키고, 얼음 냉각된 RPMI-10으로 2회 세척하였다. 샘플을 원심분리시키고, 적혈구 용해를 수행하였고, 그 후 세척하고, RPMI-10에 재현탁시켰다. 종양 세포를 트립토판 블루 배제로 나열하고, 면역 세포 마커 CD45(AF700)에 대해서 염색하였다.

[0898] 도 36은 복강내 투여되는 경우, RVKVKVVVVRRRRRRRRRR(IK15800)이 대조군에 비해서 종양 덩어리의 평균 면적을 감소시킨다는 것을 입증한다.

[0899] **실시예 40: 지방산에 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주로부터 IL-2 분비를 증가시킨다.**

[0900] IL-2 분비를 변경시키는 지방산에 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0901] 간략하면, 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서, 세포를 IK14804로 처리하고, 이어서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL-2 함량에 대해서 분석하였다.

[0902] 도 37은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK14804)가 48시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 나타낸다.

[0903] 이러한 데이터는, 본 발명의 지방산 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드가 인간 T 세포주에서 IL-2 분비를 유도할 수 있다는 것을 입증한다.

[0904] **실시예 41: Lck 활성화 폴리펩타이드는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨다.**

[0905] IL-12 분비를 변경시키는 지방산에 커플링된 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0906] 간략하면, 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 이어서 세포를 IK14800, IK15800, IK14804 및 IK15804로 처리하였다. 이어서 세포를 48시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100uL, n=3)을 IL-12 함량에 대해서 분석하였다.

[0907] 도 38은 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK14804) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK15804)가 48시간 노출 후 야생형 주카트 세포에서 대조군에 비해서 IL-2 분비를 유도하는 것을 나타낸다.

[0908] **실시예 42: Lck 활성화 폴리펩타이드는 세포막에서 UVB 지질 과산화를 저해한다.**

[0909] 세포막에서 지질 과산화를 변경시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드의 능력을 조사하였다.

[0910] 간략하면, 산화제는 지질 구조를 변경시켜, 말론다이알데하이드를 형성시키는 지질 과산화물을 생성시킬 수 있고, 이것은 티오바르비투르산-반응성 기질(thiobarbituric acid-reactive substance: TBARS)로서 측정될 수 있다.

[0911] 피부 섬유아세포 및/또는 각질세포의 방사선 조사 또는 모의 대조군-방사선 조사 후, 시험 펩타이드를 첨가하고, 90분 동안 인큐베이션시켰고, 그 후 상청액(900㎕)을 수집하였다. 90㎕의 부틸화 하이드록시톨루엔(에탄올 중의 2% w/w)을 첨가하고, 샘플을 TBARS 검정 시까지 냉동시켰다(-20℃). 로리 방법(Lowry OH et al, J. Biol. Chem., 1951, 193:265 - 275)에 의해 수행된 단백질 결정을 위하여, 페트리 접시를 1㎖의 HBSS로 2회 세척하고, 세포를 600㎕의 물 중에서 긁어내고, 60㎕의 0.5% 수성 Triton×100을 이 용액에 첨가하였다. TBARS는 (Morliere P et al, Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1084:261-268)에 기재된 바와 같이 형광측정으로(fluorometrically) 검정하였다. 간략하면, 해동을 위해서 샘플을 산성 조건의 티오바르비투르산의 존재 하에서 가열시키고, TBARS를 1-부탄올로 추출하고, 형광측정으로 정량하였다(λexc=515nm 및 λem=550nm). 검정 조건에서 말론다이알데하이드-티오바르비투르산 부가물을 정량적으로 산출하는 테트라에톡시 프로판을 보정을 위해서 사용한다. 말론다이알데하이드(MDA) 당량으로 표현되는, TBARS 값을 각각의 페트리 접시에 대해서 세포 단백질에 정규화한다. 각각의 TBARS 결정을 3회 수행한다(예를 들어, 데이터 지점당 3개의 페트리 접시 사용).

[0912] 도 39는 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)이 TRS%를 용량 의존적인 방식으로 감소시키는 것을 나타낸다.

[0913] **실시예 43: RSKAKNPLY-RRRRRRRRR은 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 증가시킨다.**

[0914] 상기에 논의된 바와 같이, Lck의 Tyr394의 포스포릴화는 Lck 키나제를 활성화시키는 Lck의 입체배좌 개방을 초래한다.

[0915] 웨스턴 블롯 연구를 하기와 같이 수행하였다:

[0916] **세포 유형:** 주카트 야생형

[0917] **세포 수:** 5×10^5개/1㎖

[0918] **배지:** RPMI-1640 MEDIUM(시그마사, R8758), 1X 페니실린-스트렙토마이신(시그마사, 100X, P0781), 10% FBS

[0919] **펩타이드:** IK14800(RSKAKNPLY-RRRRRRRRR)

[0920] **펩타이드 농도:** 1uM

[0921] **펩타이드 노출 시간:** 2시간

[0922] **세포 용해 용액:**

[0923] (100ul/웰/얼음에서 30분)

[0924] RIPA 완충제(시그마사, R0278): 97ul

[0925] 프로테아제 저해제 칵테일(P8340): 1.5ul

[0926] 포스파타제 저해제 칵테일 2(시그마사, P5726): 1.5ul

[0927] **단백질 검정:** 피어스사™ BCA 단백질 검정 키트(#23225)

[0928] **겔:** NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gels(라이프 테크놀로지즈사(Life Technologies), NP0335BOX), 로드 20ug 단백질

[0929] **전개 완충액(1x):** NuPAGE® MOPS SDS 전개 완충액(라이프 테크놀로지즈사, NP0001)

[0930] **Transfer Blot**: iBlot® Transfer Stack, 나이트로셀룰로스, Novex, 미니(라이프 테크놀로지즈사, IB3010-32)

[0931] **차단 용액**: TBS Blotto B(산타 크루즈사(Santa Cruz), SCZSC-2335)

[0932] **1차 항체:** p-Lck(Tyr 394), 토끼 다클론성 항체(산타 크루즈사, sc- 101728), 1/200 희석, 4℃에서 밤새 항-Lck 항체 [Y123], 토끼 단클론성 항체(압캠사(Abcam), ab32149), 1/1000 희색, 4℃에서 밤새

[0933] **2차 항체**: 염소 항-토끼 IgG-HRP(sc-2004), 1/5000 희석, 1시간

[0934] **ECL:** 아머샴 ECL 프라임 웨스턴 블로팅 검출 시약(Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent)

[0935] 도 40은 총 Lck의 수준이 변하지 않고 유지되면서, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 펩타이드 무함유 대조군에 비해서, 항-pY394 항체에 의해서 검출된 Y394에서 Lck의 포스포릴화를 증가시키는 것을 나타낸다.

[0936] 이러한 데이터는, Lck를 선택적으로 활성화시키는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR이 Lck의 자가 포스포릴화를 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0937] **실시예 44: 폴리펩타이드 RSKAKNPLYR 및 RSKAKNPLY는 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시키고, RSKAKNPLYR이 아닌 rskaknply이 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨다.**

[0938] IL-2 및 IL-12 분비를 변경시키는 폴리펩타이드 RSKAKNPLYR("14000"), RSKAKNPLY("IK94000") 및 rskaknply ("IKD94000")의 능력을 조사하였다.

[0939] 간략하면, 야생형 주카트 세포(인간 T 림프구 세포의 불멸화된 주)를 항-CD28 항체 및 아비딘의 존재 하에서 바이오티닐화된 항-CD3 항체에 대한 노출에 의해서 자극하였다. 세포를 웰(12웰 플레이트, 2㎖ 부피)당 1백만개 세포로 시딩하고, 바이오틴-항-CD3, 항-CD28 및 아비딘(5:5:1.25㎍)으로 자극하였다. 세포를 시험 펩타이드로 처리하고, 이어서 48시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서 상청액(100ul, n=3)을 IL-2 및 IL-12 함량에 대해서 분석하였다. 배양 기간(48시간) 후, 세포를 시험 폴리펩타이드 RSKAKNPLYR-$(2Adod)_4$-NH_2에 노출시켰다.

세포 상청액을 상기에 기재된 바와 같은 상업적으로 입수 가능한 표준 ELISA 키트를 사용하여 48시간 이후에 IL-2 및 IL-12에 대해서 검정하였다.

[0940] 도 41A는 폴리펩타이드 RSKAKNPLYR 및 RSKAKNPLY가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-2 분비를 증가시킨 것을 나타낸다.

[0941] 도 41B는 RSKAKNPLYR이 아니라 rskaknply가 인간 T 림프구(주카트) 세포주에서 IL-12 분비를 증가시킨 것을 나타낸다.

[0942] 본 발명의 다수의 실시형태가 상기에 기재된 바와 같더라도, 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변형 및 변화가 수행될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서 상기에 기재된 실시형태는 단지 예시이며, 제한으로 간주되어서는 안 된다.

[0943] **실시예 44: Lck 활성화 폴리펩타이드는 PBMC 공동 배양물에서 칼세인(Calcein)-AM 염색된 K562 세포의 특이적 세포독성의 백분율을 증가시킨다.**

[0944] 세포독성 반응을 유도하는 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK14804) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-$(2Adod)_4$-NH_2(IK15804)의 능력을 조사하였다.

[0945] 간략하면, PBMC를 48시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서 인간 재조합 IFN-α 2A(5ng/㎖)로 자극되거나 자극되지 않은 칼세인 AM 염색된 K562 세포와 함께 4시간 동안 공배양하였다. GloMax® Discover를 사용하여 상청액을 칼세인 녹색 형광 강도에 대해서 평가하고, 특이적 세포독성 백분율을 계산하였다. 제시된 데이터는 평균 특이적 세포독성 백분율을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 비히클 대조군과 비교하여 페어드 t 검정에 의해서 데이터를 분석하였다(*p<0.05).

[0946] PBMC를 또한 Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800),

RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2(IK14804) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2(IK15804)(0.08 내지 1.25 μM)와 함께 또는 이것 없이 48시간 동안 사전처리하고, 이어서 5:1비로 칼세인 AM 염색된 K562 세포와 공배양하고, 추가로 4시간 동안 인큐베이션시켰다. GloMax® Discover를 사용하여 상청액을 칼세인 녹색 형광 강도에 대해서 평가하고, 특이적 세포독성 백분율을 계산하였다. 제시된 데이터는 평균 특이적 세포독성 백분율을 나타낸다(+/- SEM, n=4). 펩타이드 처리와 비히클 대조군을 비교하는 홀름-시닥 사후 검정과 함께 양측 ANOVA를 반복적으로 측정하여 데이터를 분석하였다(*p<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****p<0.0001).

[0947] Lck 활성화 폴리펩타이드 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800), RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800), RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-$NH_{2(IK1}$4804) 및 RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2(IK15804)는 PBMC 공배양물에서 칼세인-AM 염색된 K562 세포의 특이적 세포독성 백분율을 IFN-α 2A에서 발견되는 것보다 더 높은 수준으로 증가시켰다(데이터 나타내지 않음).

도면

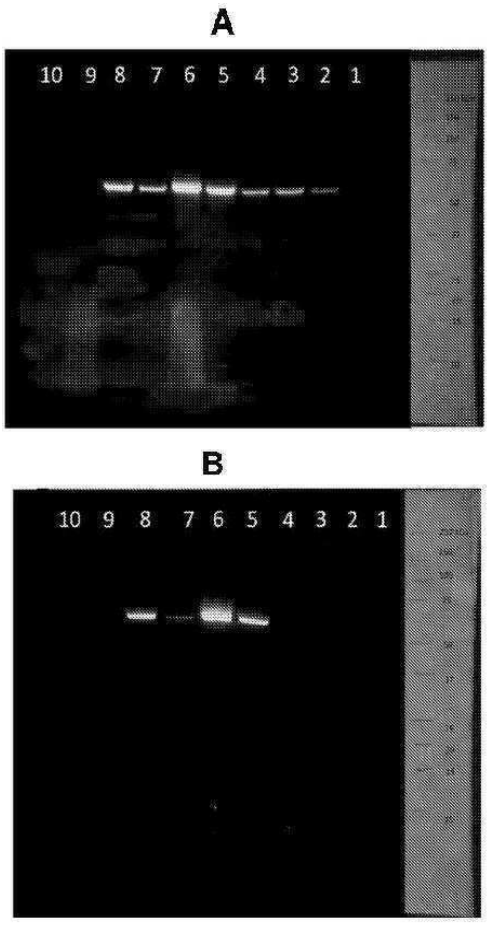
도면1

펩타이드	대조군을 초과한 Lck 활성도 (1μM)
RRRR (IK00400)	0%
RRRRR (IK00500)	0%
RRRRRR (IK00600)	0%
RRRRRRRR (IK00800)	126%
rrrrrrrr (IKD00800)	80%
RRRRRRRRR (IK00900)	325%
RRRRRRRRRR (IK00100)	389%
RRRRRRRRRRR (IK01200)	401%
RRRRRRRRRRRRR (IK01400)	351%
rrrrrrrrrrrrr (IKD01400)	228%
RRRRRRRRRRRRR-OH (IK014OH)	156%
RRRRRRRRRRRRRRRRRRR (IK00200)	279%
KKKKKKKKKK (10Lys)	161%
HHHHHHHHHH (10His)	0%
OrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrn (10 Orn)	13%
HHH-RRRRRRRRR-HHH (IK03930)	386%
HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH (IK05950)	286%
KKKKKKKK-HHHHHHHHHH (IK00K10)	70%
RRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK00810)	259%
RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK00910)	348%
DDDDDDDDD-NH_2 (IKD9)	0%
DSEAENPLY-DDDDDDDDD-NH_2 (IKDE800)	0%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH_2 (IK14800)	377%
RSKAKNPLYR-RRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2 (IK14804)	468%
RVKVKVVVVR-RRRRRRRR-(2Adod)$_4$-NH_2 (IK15804)	335%

도면2

펩타이드	대조군을 초과한 Lck 활성도 (1 μM)							
	Blk	cSRC	Fgr	Fyn	Hck	Lck	Lyn	Yes
IK00800	0%	0%	%	0%	0%	126%	0%	0%
IK00100	0%	0%	0%	0%	0%	389%	0%	0%
10Lys	0%	0%	0%	0%	0%	161%	0%	0%
10His	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
IK14800	0%	0%	0%	0%	0%	578%	0%	0%
IKD14800	0%	0%	0%	0%	0%	490%	0%	0%
IK15800	0%	0%	0%	0%	0%	593%	0%	0%

도면3



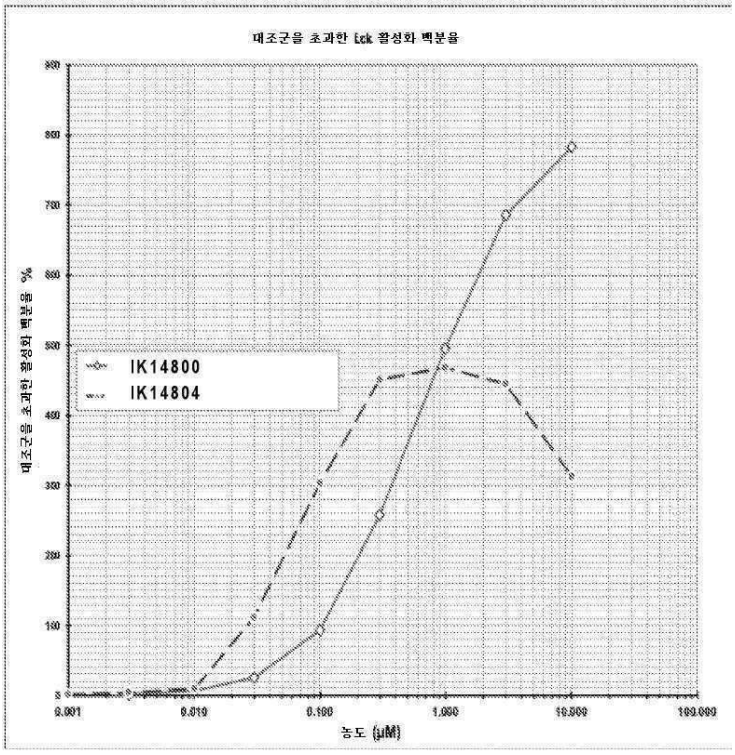
도면4

펩타이드	대조군을 초과한 Lck 활성도 (1 μM)
RSKAK (IK5000)	5%
RSKAK-R (IK50100)	0%
RSKAK-RR (IK50200)	5%
RSKAK-RRR (IK50300)	0%
RSKAK-RRRR (IK50400)	0%
RSKAKNPLY (IK94000)	0%
RSKAKNPLYR (IK14000)	0%
RSKAKNPLY-RRRR (IK14300)	0%
RSKAKNPLY-RRRRR (IK14400)	85%
RSKAKNPLY-RRRRRR (IK14500)	82%
r s k a k n p l y-r r r r r r (ID94600)	60%
C-RSKAKNPLY-RRRRRR-C (고리화됨) (IK14500C)	221%
RSKAK-RRRRRRRRR (IK50900)	531%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)	496%
r s k a k n p l y - r r r r r r r r r (IKD14800)	490%
r r r r r r r r - y l p n k a k s r (IKR81400)	616%
IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IKM14800)	454%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG (IK148MP9)	320%
RRRRRRRRR-SKAKNPLYR (IK9R94S)	542%
RRRRRRRRR-YLPNKAKSR (IK9R94Y)	630%
RSKAKNPLY-KKKKKKKKK (IK94K90)	49%
RSKAKNPLY-RHHHHHHHHHH (IK14010)	30%

도면5

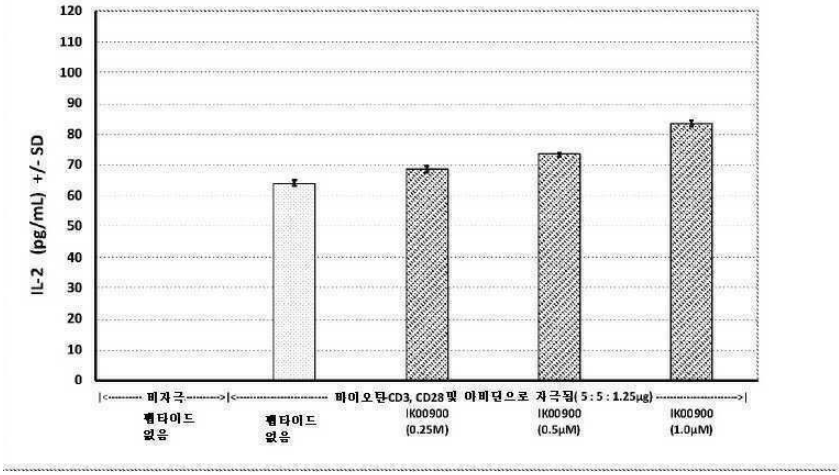
펩타이드	대조군을 초과한 Lck 활성도 (1 μM)
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK14510)	524%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK14810)	899%
분지형 < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (Br IK14810)	596%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK14820)	556%
HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK11480)	883%
HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR (IK59514)	441%
RRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR (IK81140)	567%
HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK51455)	685%
RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK (IK94RK0)	456%
RVKVKVVVV (IK95000)	518%
RVKVKVVVV-RRRRR (IK15400)	382%
RVKVKVVVV-RRRRRRRR (IK15700)	512%
RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)	479%
RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R (IK80150)	520%
RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)	778%
RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH (IK52820)	408%
KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)	778%
RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH (IK52820)	408%
KEKLKNPLFK-RRRRRRRR-HHHHHHHHHH IKB2810	379%

도면6

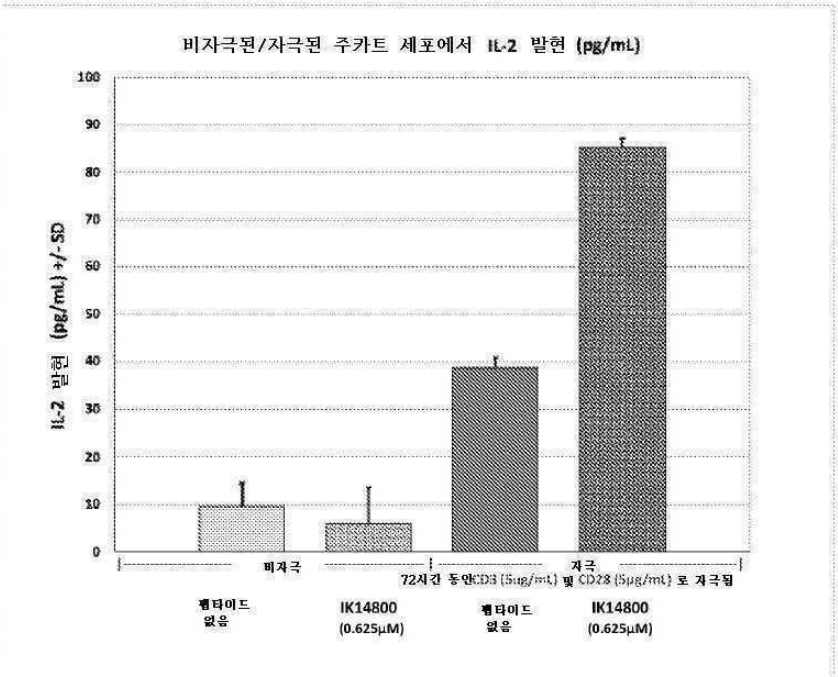


도면7

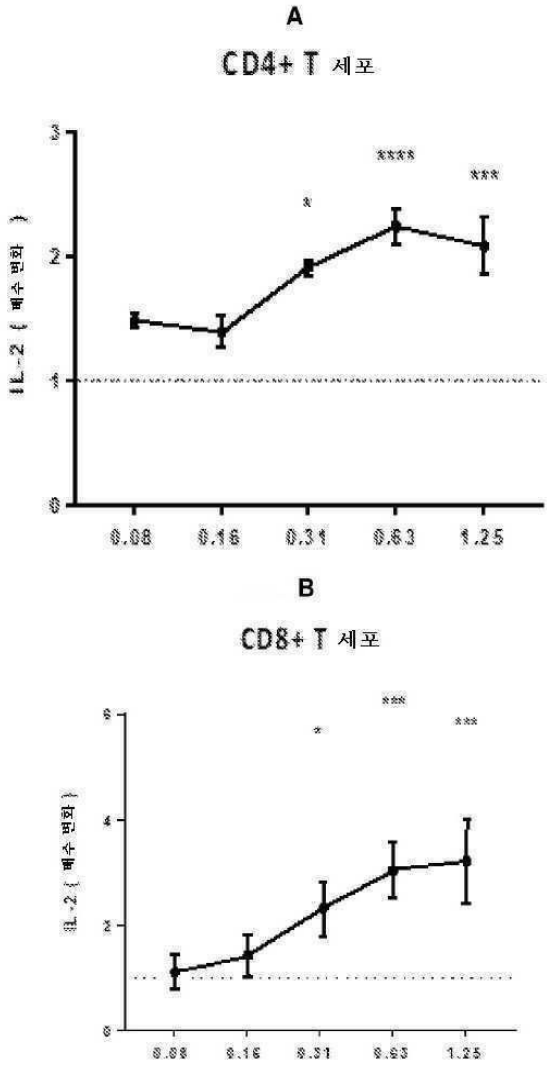
A


IL-2 (pg/mL) +/- SD
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
비자극
바이오탄CD3, CD28 및 아비딘으로 자극됨(5 : 5 : 1.25μg)
펩타이드 없음
펩타이드 없음
IK00900 (0.25M)
IK00900 (0.5μM)
IK00900 (1.0μM)

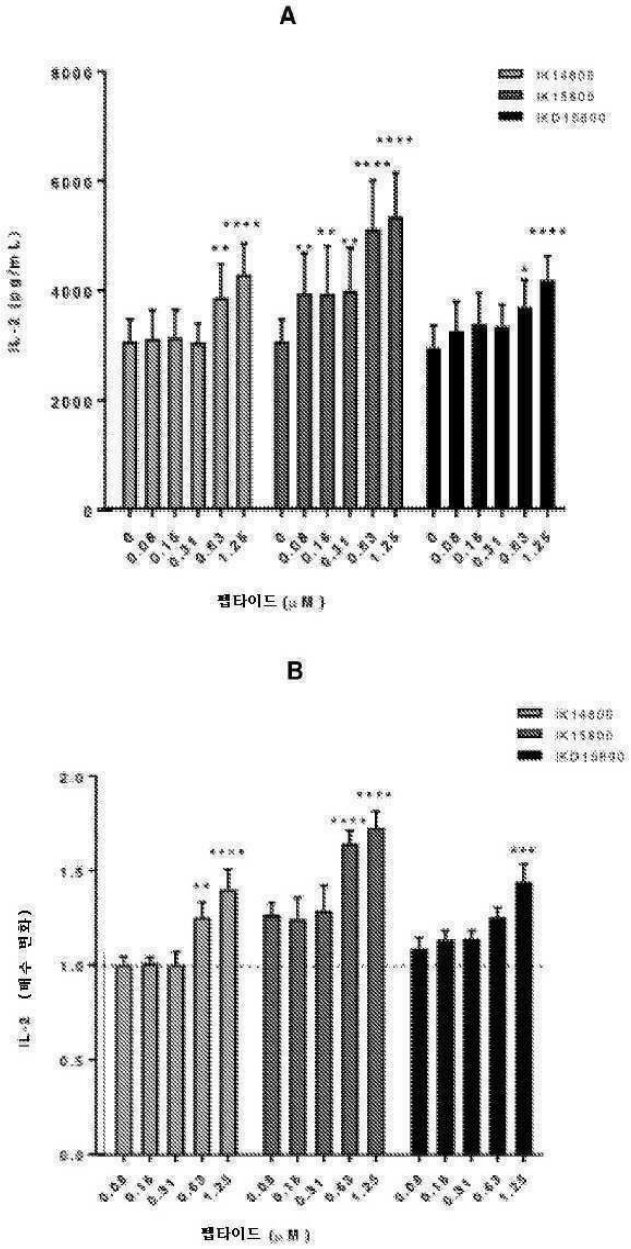
B


비자극된/자극된 주카트 세포에서 IL-2 발현 (pg/mL)
IL-2 발현 (pg/mL) +/- SD
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
비자극
자극
72시간 동안CD3 (5μg/mL) 및 CD28 (5μg/mL) 로 자극됨
펩타이드 없음
IK14800 (0.625μM)
펩타이드 없음
IK14800 (0.625μM)

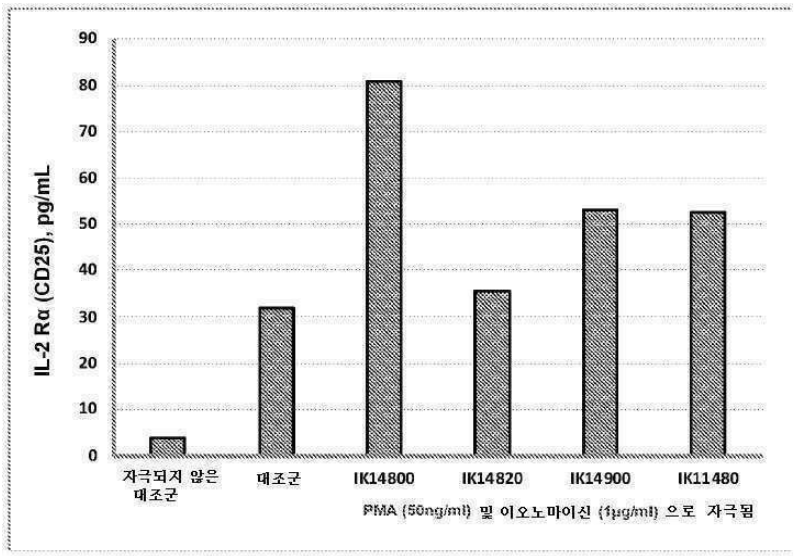
도면8



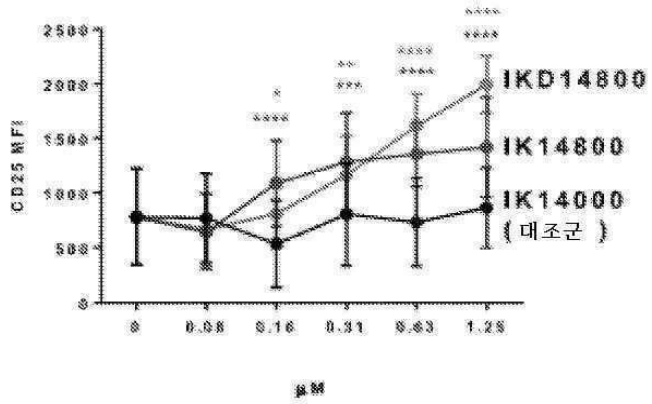
도면9



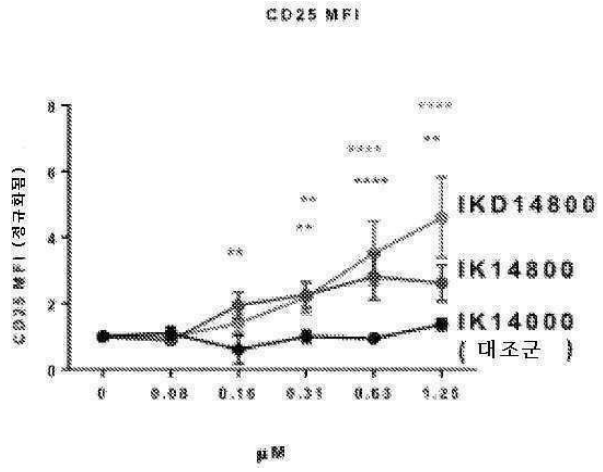
도면10



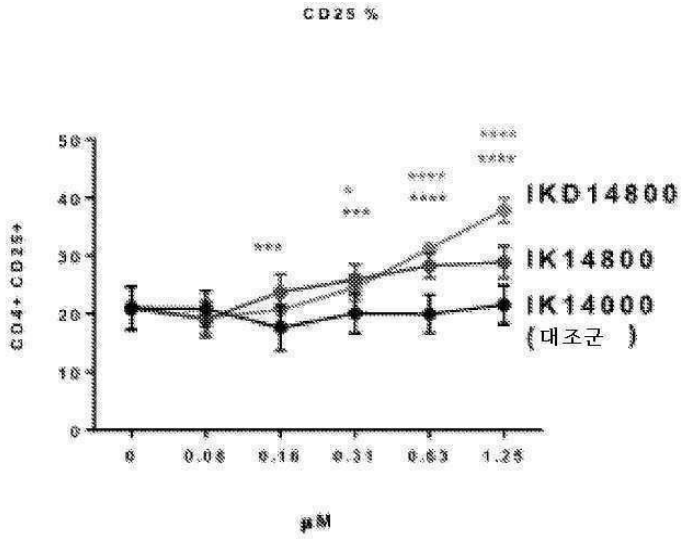
도면11a



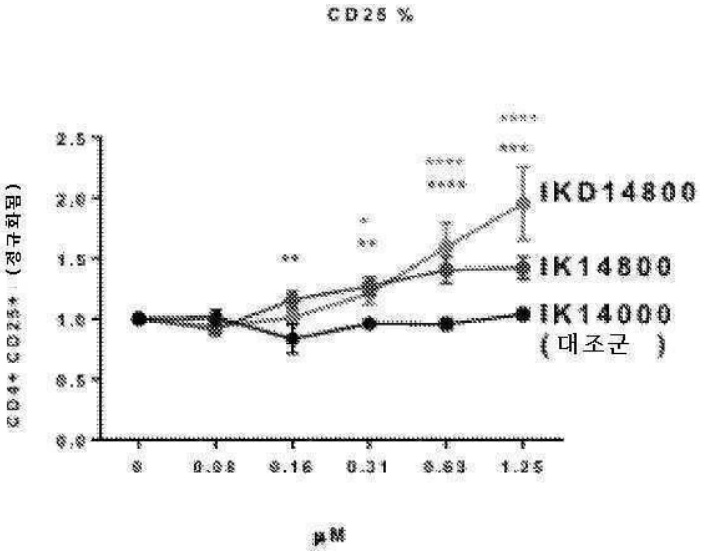
도면11b



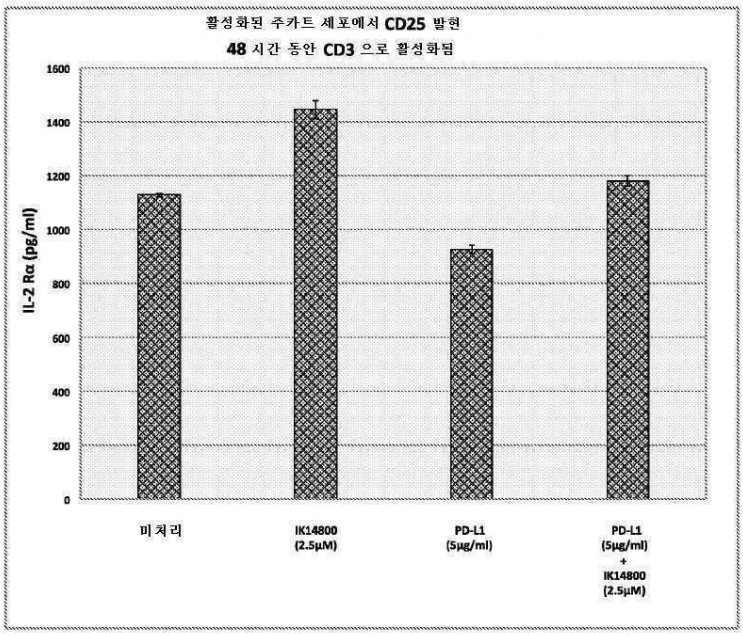
도면11c


CD25 %
CD4+ CD25+
IKD14800
IK14800
IK14000
(대조군)
μM

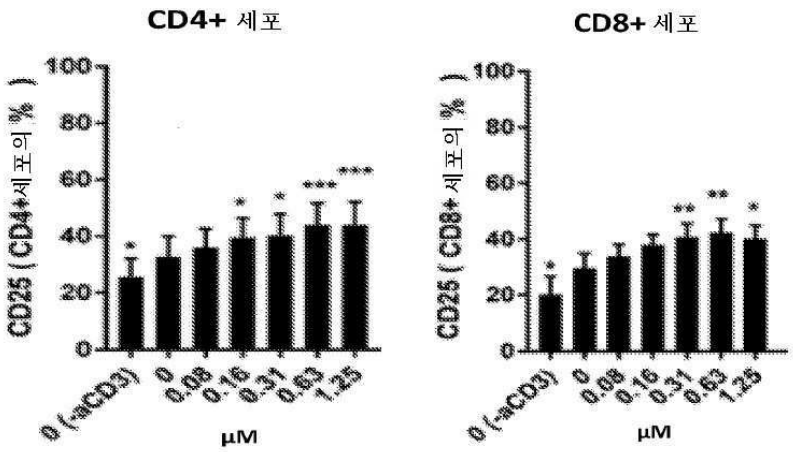
도면11d


CD25 %
CD4+ CD25+ (정규화됨)
IKD14800
IK14800
IK14000
(대조군)
μM

도면12

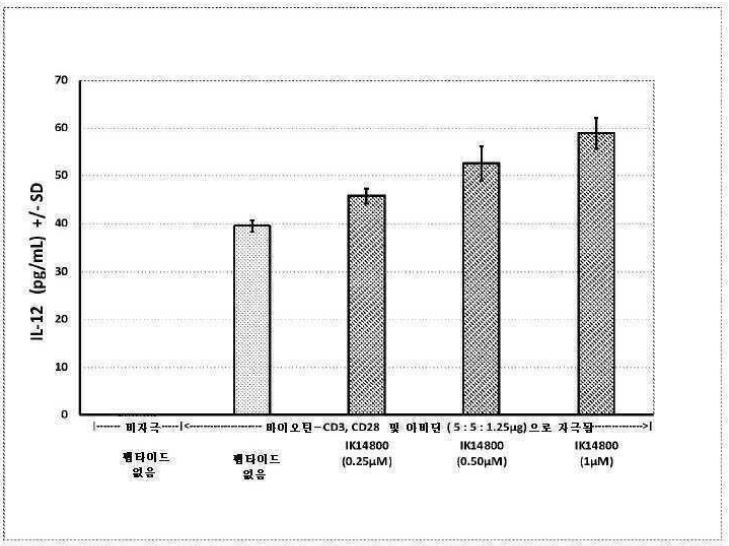

활성화된 주카트 세포에서 CD25 발현
48 시간 동안 CD3 으로 활성화됨
IL-2 Rα (pg/ml)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
미처리
IK14800 (2.5μM)
PD-L1 (5μg/ml)
PD-L1 (5μg/ml) + IK14800 (2.5μM)

도면13

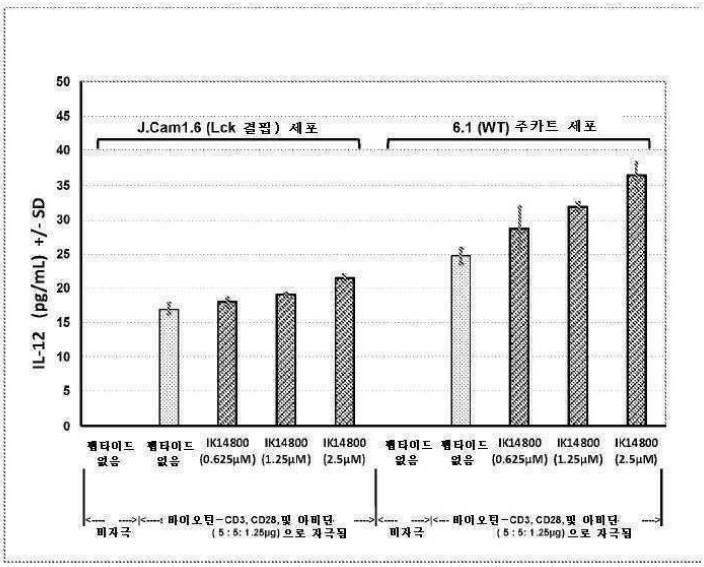

CD4+ 세포
CD8+ 세포
CD25 (CD4+세포의 %)
CD25 (CD8+세포의 %)
100
80
60
40
20
0
0 (-αCD3)
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
μM

도면14

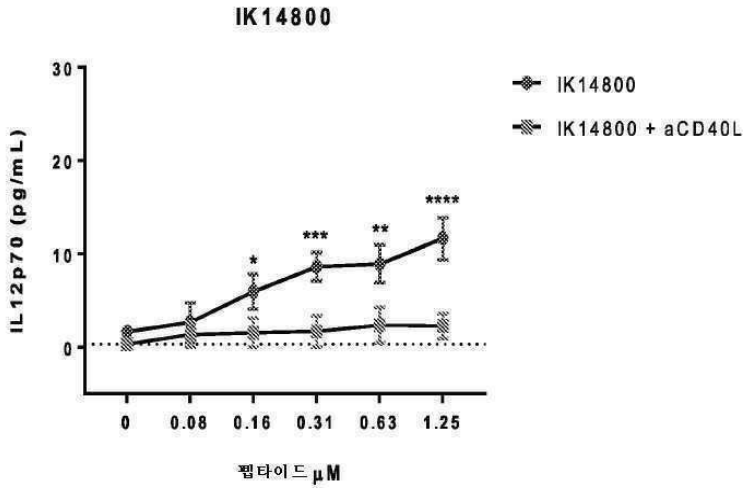
A


IL-12 (pg/mL) +/- SD
70
60
50
40
30
20
10
0
비자극
바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘 (5 : 5 : 1.25μg)으로 자극됨
캡타이드 없음
캡타이드 없음
IK14800 (0.25μM)
IK14800 (0.50μM)
IK14800 (1μM)

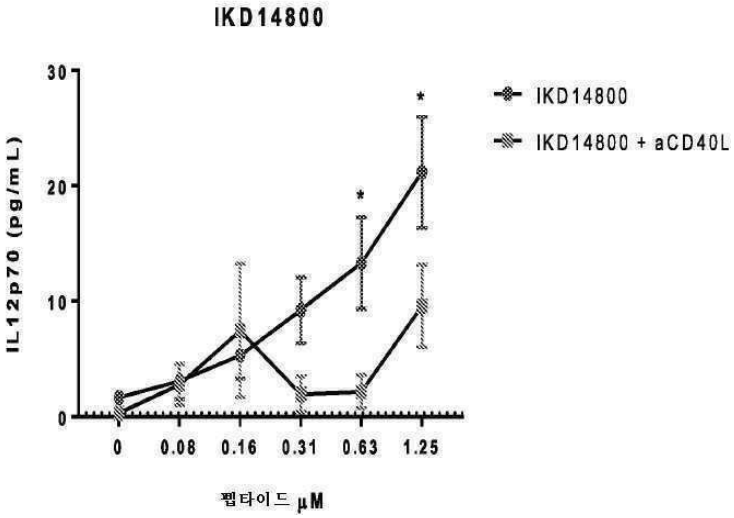
B


IL-12 (pg/mL) +/- SD
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
J.Cam1.6 (Lck 결핍) 세포
6.1 (WT) 주카트 세포
캡타이드 없음
캡타이드 없음
IK14800 (0.625μM)
IK14800 (1.25μM)
IK14800 (2.5μM)
캡타이드 없음
캡타이드 없음
IK14800 (0.625μM)
IK14800 (1.25μM)
IK14800 (2.5μM)
비자극
바이오틴-CD3, CD28, 및 아비딘 (5 : 5: 1.25μg) 으로 자극됨
비자극
바이오틴-CD3, CD28, 및 아비딘 (5 : 5: 1.25μg) 으로 자극됨

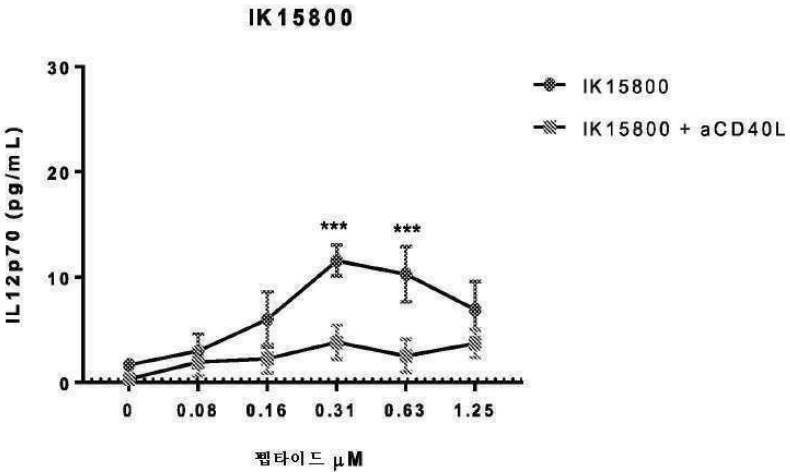
도면15a



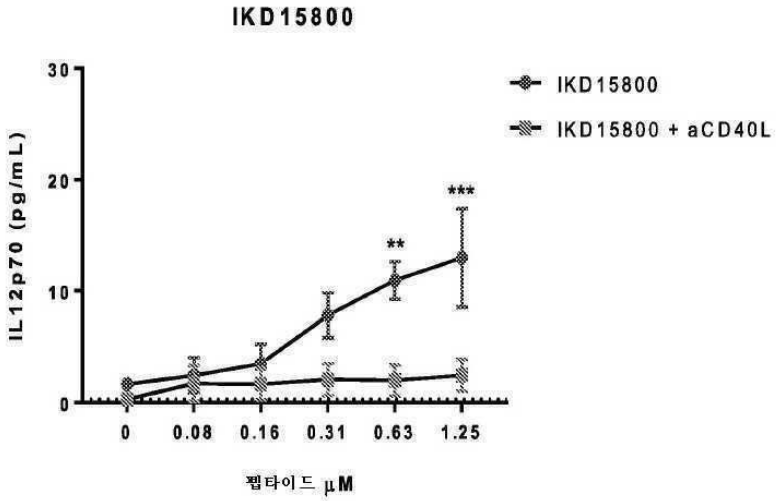
도면15b



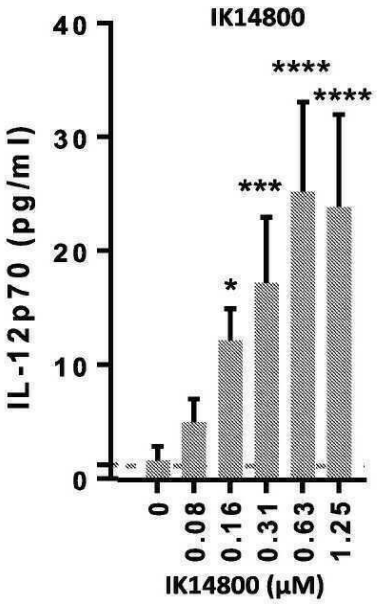
도면15c



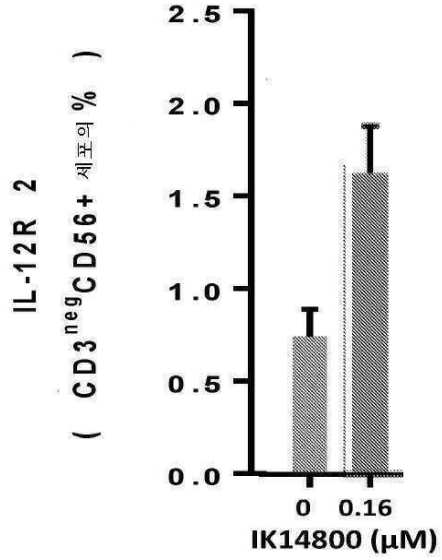
도면15d


IKD15800
IKD15800
IKD15800 + aCD40L
IL12p70 (pg/mL)
30
20
10
0
**
***
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
펩타이드 μM

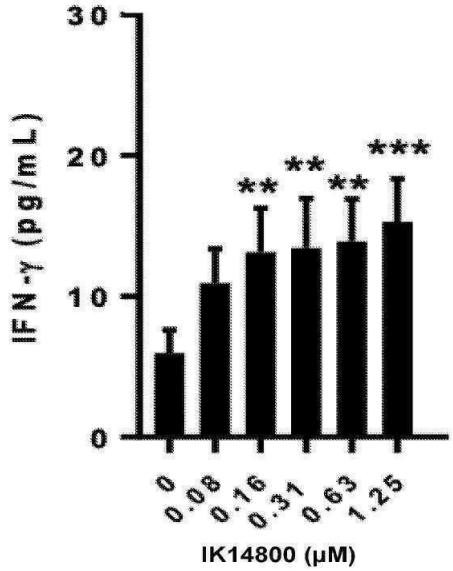
도면16


IK14800
IL-12p70 (pg/ml)
40
30
20
10
0
*
***
****
****
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK14800 (μM)

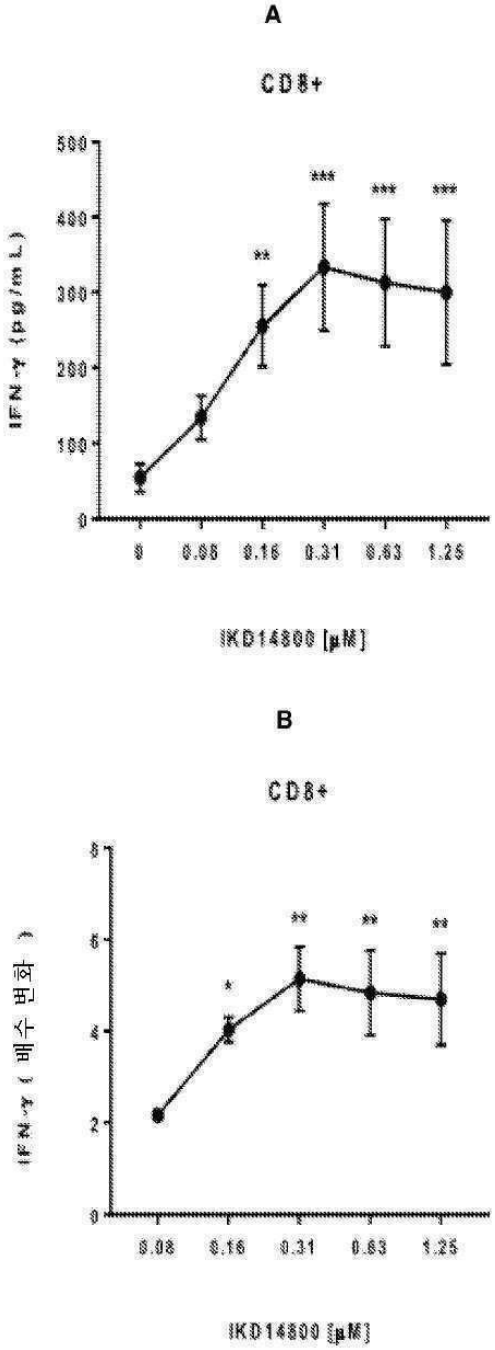
도면17


IL-12R 2
(CD3negCD56+ 세포의 %)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
0.16
IK14800 (μM)

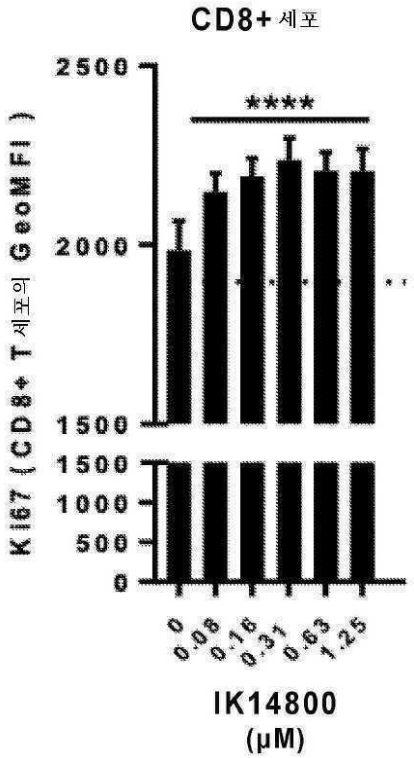
도면18


IFN-γ (pg/mL)
30
20
10
0
**
**
**
***
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK14800 (μM)

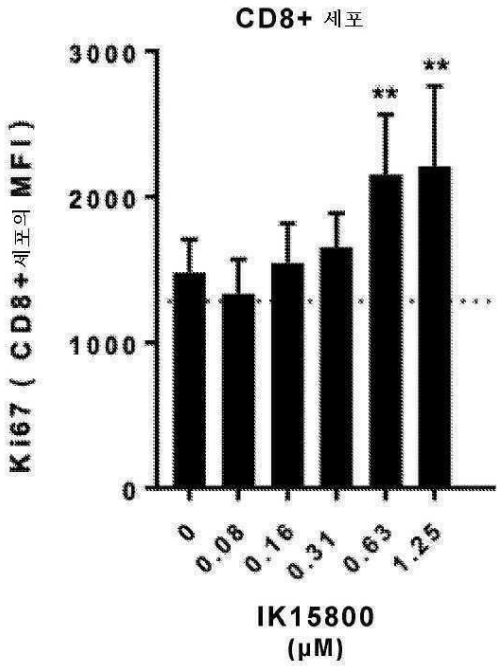
도면19


A
CD8+
IFN-γ (pg/mL)
500
400
300
200
100
0
**
***
***
***
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IKD14800 [μM]
B
CD8+
(IFN-γ (배수 변화))
8
6
4
2
0
*
**
**
**
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IKD14800 [μM]

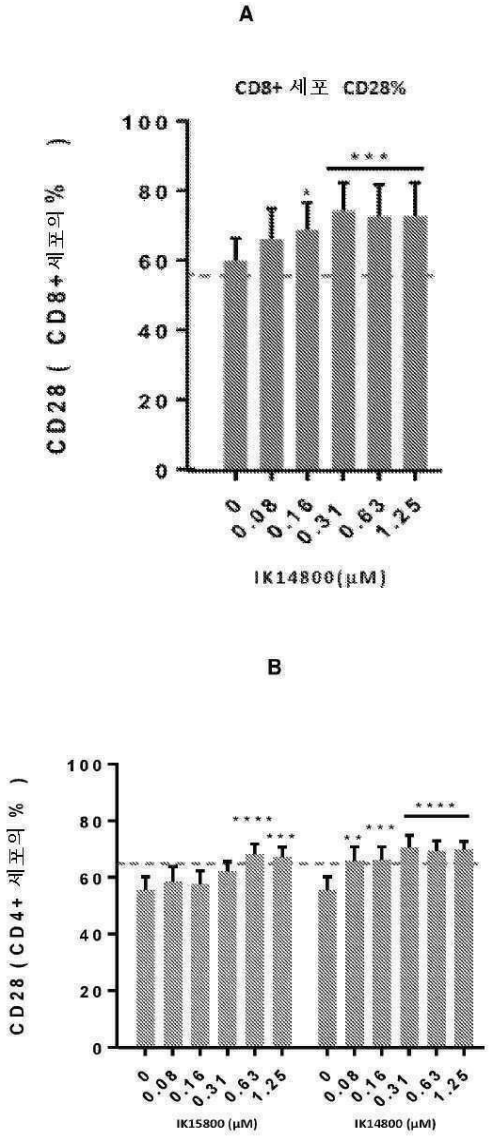
도면20


CD8+ 세포
Ki67 (CD8+ T세포의 GeoMFI)
2500
2000
1500
1500
1000
500
0
****
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK14800
(μM)

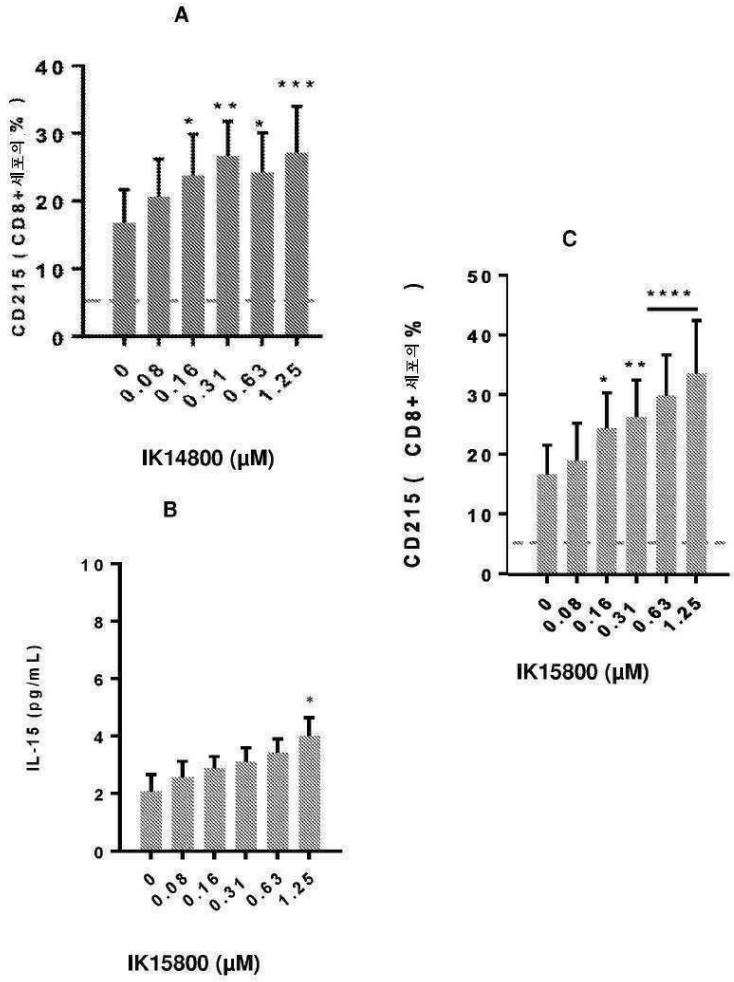
도면21


CD8+ 세포
Ki67 (CD8+세포의 MFI)
3000
2000
1000
0
**
**
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK15800
(μM)

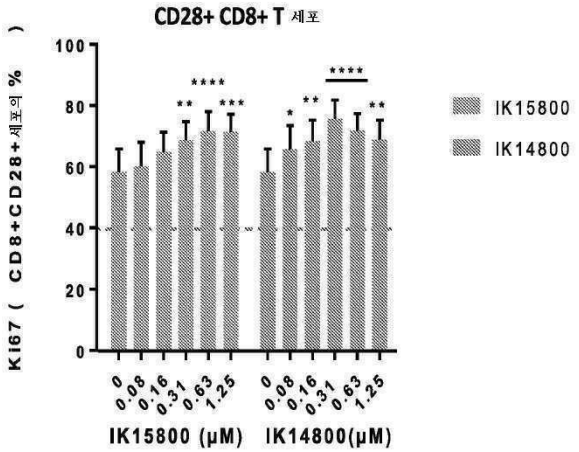
도면22


A
CD8+ 세포 CD28%
CD28 (CD8+세포의 %)
100
80
60
40
20
0
***
*
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK14800(μM)
B
CD28 (CD4+ 세포의 %)
100
80
60
40
20
0
****
***
**
***
****
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK15800 (μM)
IK14800 (μM)

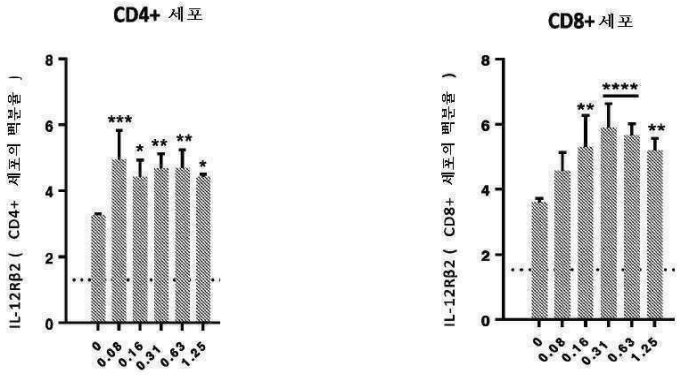
도면23


A
CD215 (CD8+세포의 %)
IK14800 (μM)
B
IL-15 (pg/mL)
IK15800 (μM)
C
CD215 (CD8+세포의 %)
IK15800 (μM)

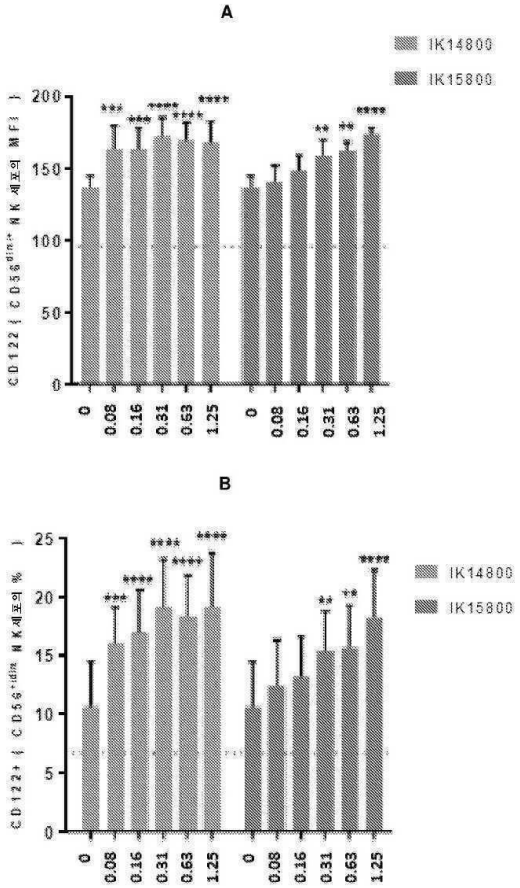
도면24


CD28+ CD8+ T 세포
KI67 (CD8+CD28+세포의 %)
IK15800
IK14800
IK15800 (μM)
IK14800(μM)

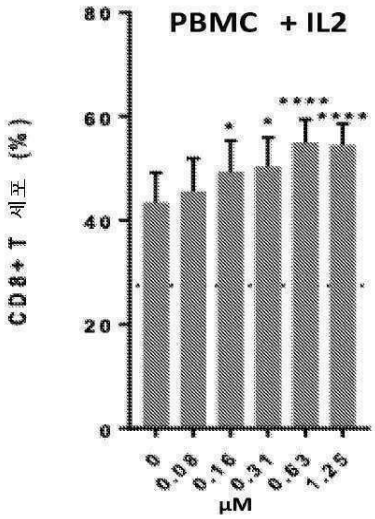
도면25


CD4+ 세포
IL-12Rβ2 (CD4+ 세포의 빈분율)
CD8+ 세포
IL-12Rβ2 (CD8+ 세포의 빈분율)
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25

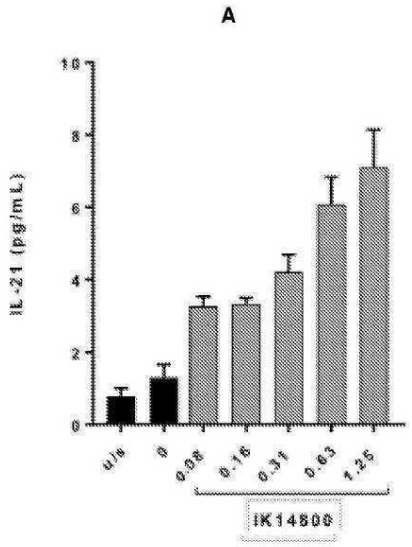
도면26

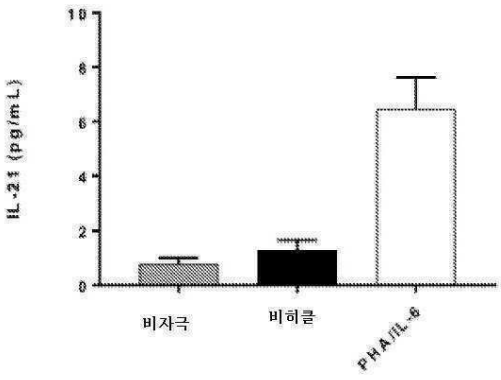

A
IK14800
IK15800
B
IK14800
IK15800
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25

도면27

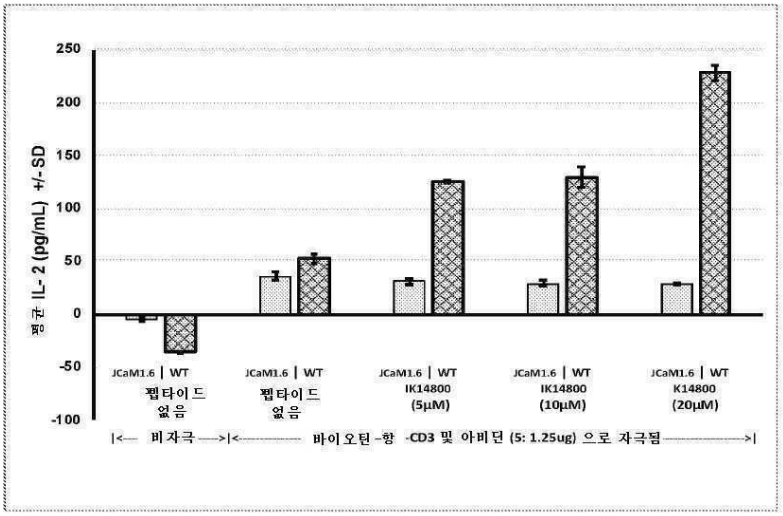

PBMC + IL2
CD8+ T 세포 (%)
80
60
40
20
0
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
μM

도면28

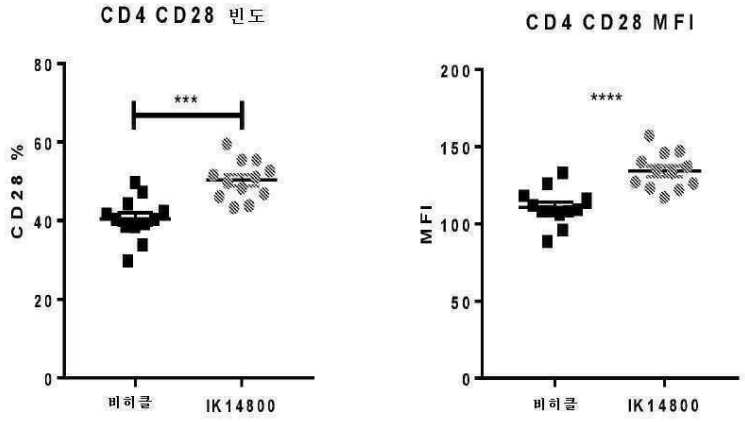

A
IL-21 (pg/mL)
u/s
0
0.08
0.16
0.31
0.63
1.25
IK14800


B
IL-21 (pg/mL)
비자극
비히클
PHA/IL-6

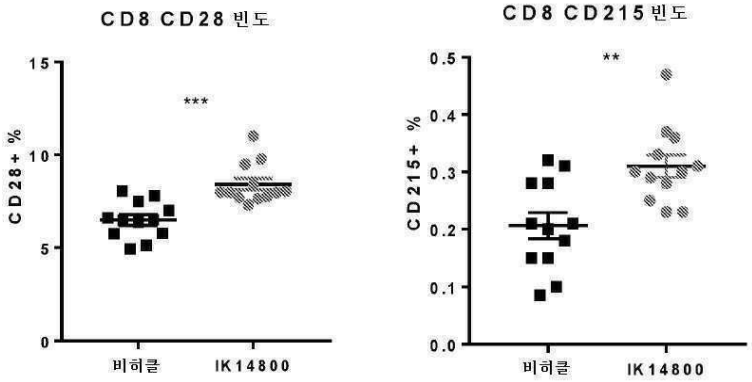
도면29



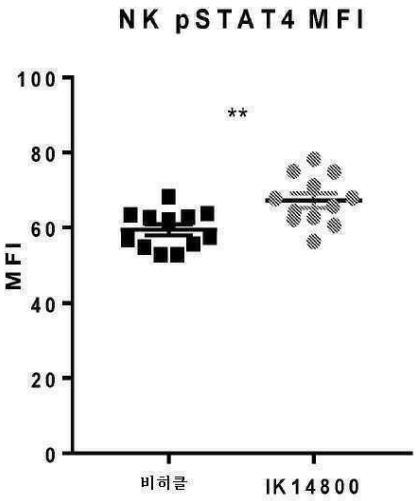
도면30



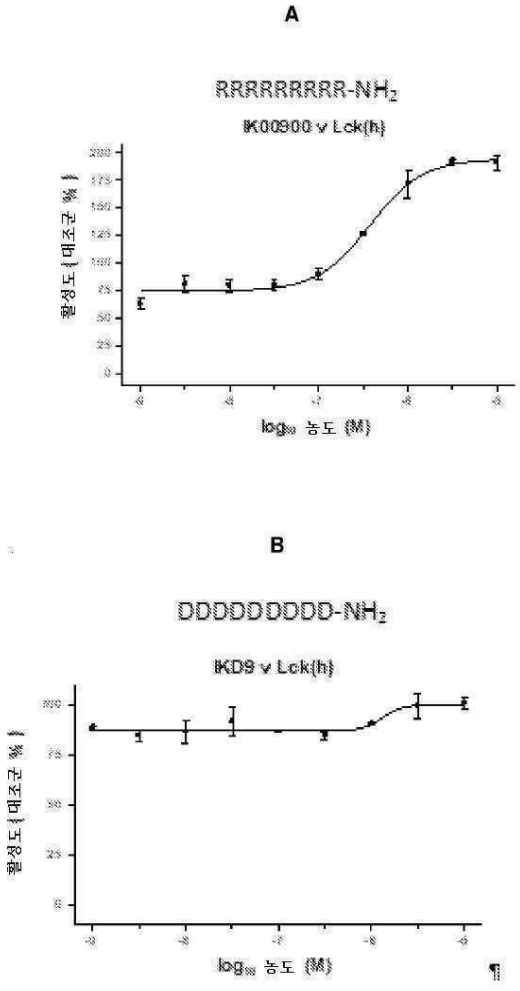
도면31



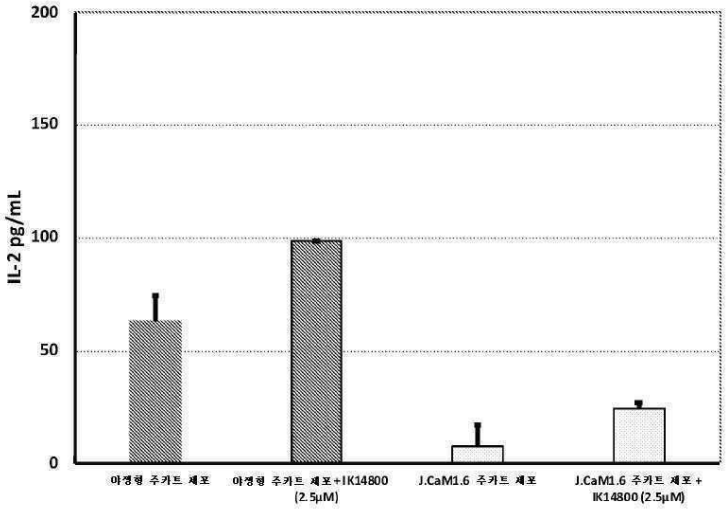
도면32


NK pSTAT4 MFI
MFI
100
80
60
40
20
0
**
비히클
IK14800

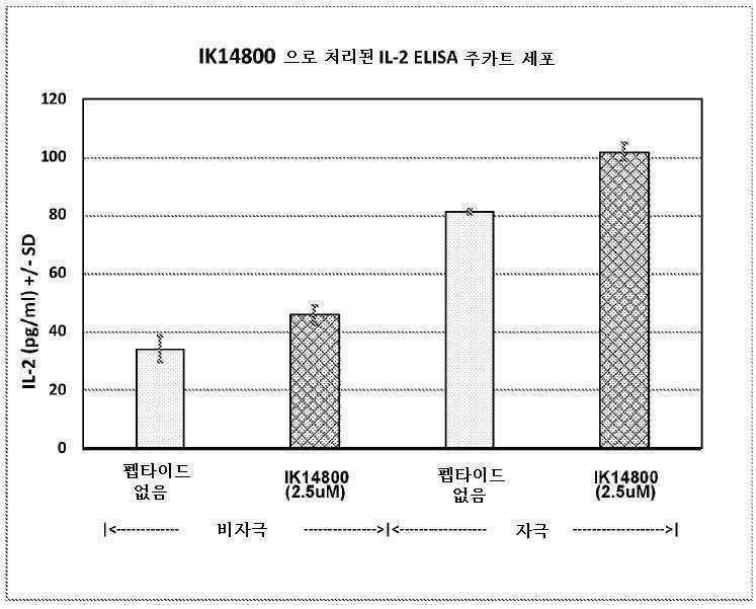
도면33


A
RRRRRRRRR-NH2
IK00900 v Lck(h)
활성도 (대조군 %)
log10 농도 (M)
B
DDDDDDDDD-NH2
IKD9 v Lck(h)
활성도 (대조군 %)
log10 농도 (M)

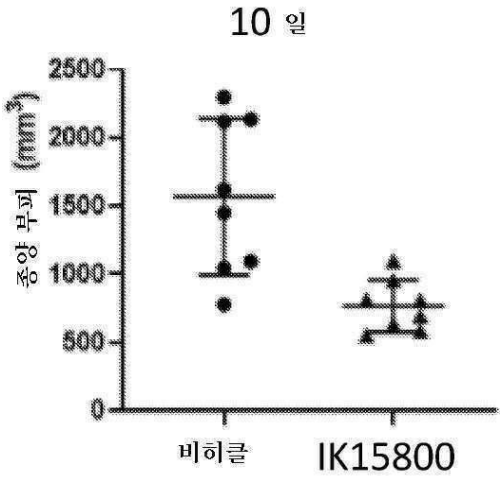
도면34


200
150
100
50
0
IL-2 pg/mL
야생형 주카트 세포
야생형 주카트 세포+IK14800 (2.5μM)
J.CaM1.6 주카트 세포
J.CaM1.6 주카트 세포 + IK14800 (2.5μM)

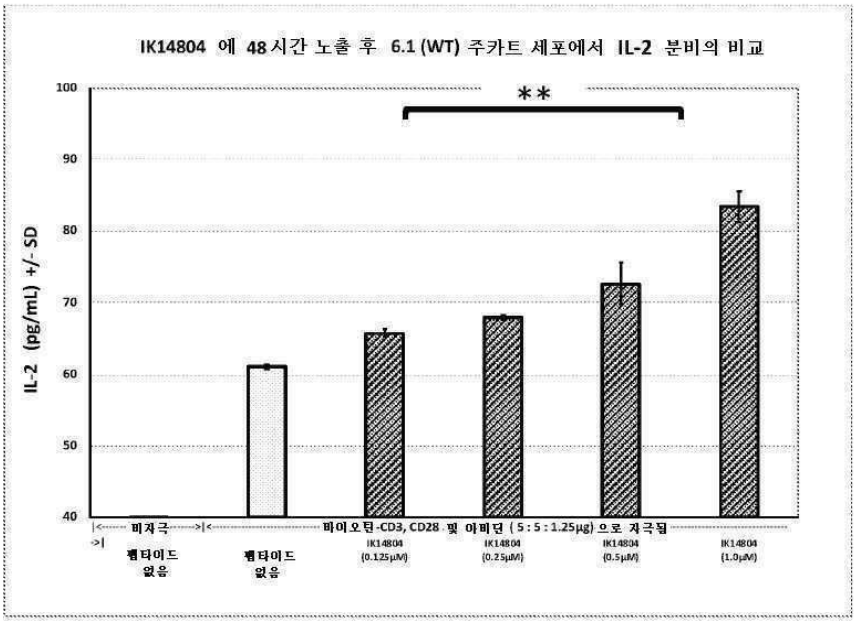
도면35


IK14800 으로 처리된 IL-2 ELISA 주카트 세포
120
100
80
60
40
20
0
IL-2 (pg/ml) +/- SD
펩타이드 없음
IK14800 (2.5uM)
펩타이드 없음
IK14800 (2.5uM)
비자극
자극

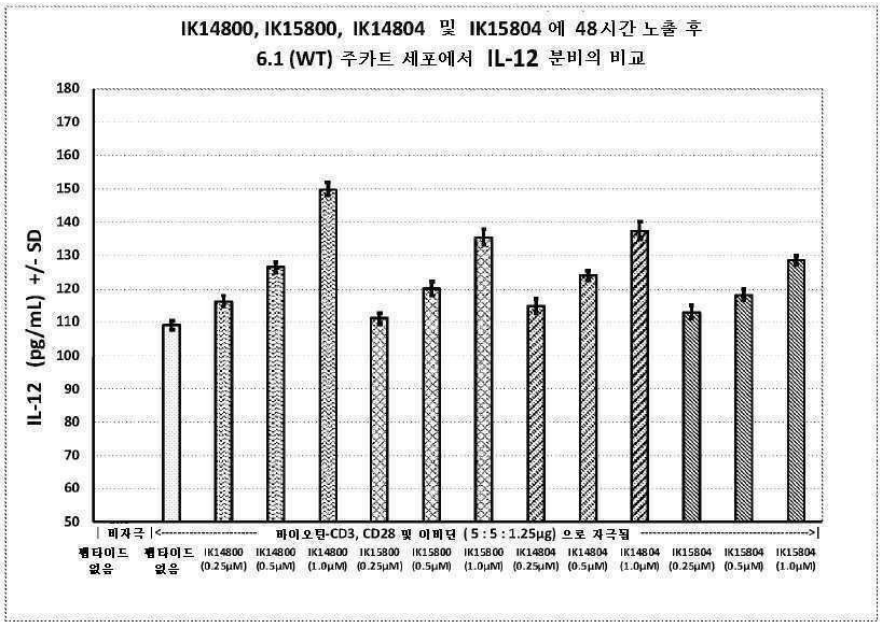
도면36


10 일
종양 부피 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
비히클
IK15800

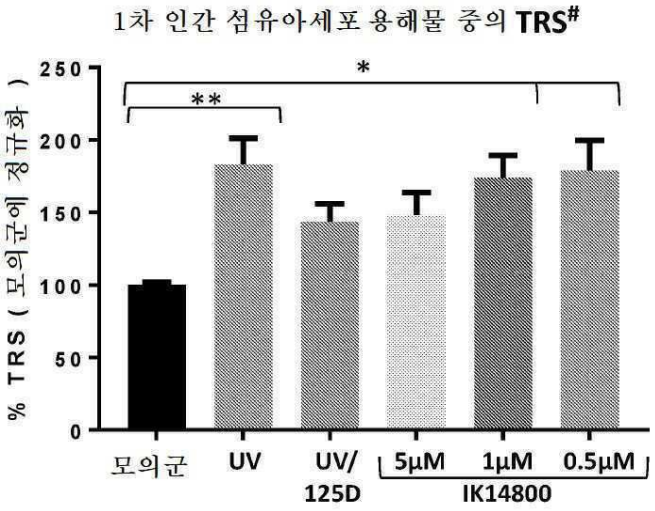
도면37


IK14804 에 48 시간 노출 후 6.1 (WT) 주카트 세포에서 IL-2 분비의 비교
IL-2 (pg/mL) +/- SD
100
90
80
70
60
50
40
**
비자극
->|
캡타이드 없음
캡타이드 없음
바이오틴-CD3, CD28 및 아비딘 (5 : 5 : 1.25μg) 으로 자극됨
IK14804 (0.125μM)
IK14804 (0.25μM)
IK14804 (0.5μM)
IK14804 (1.0μM)

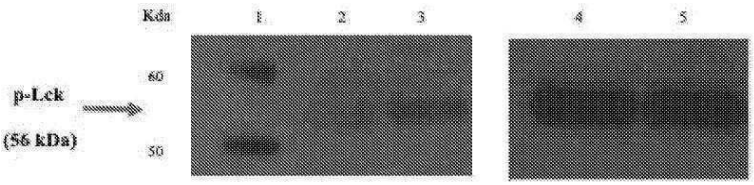
도면38



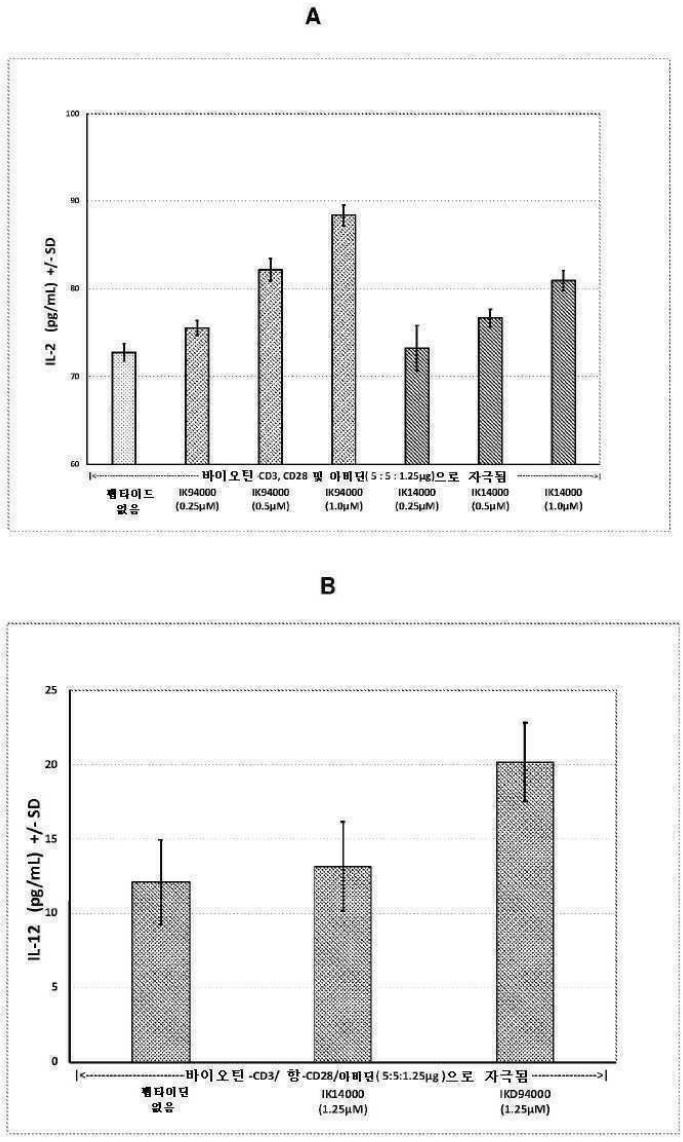
도면39



도면40



도면41



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> InterK Peptide Therapeutics Limited

<120> ACTIVATING AGENTS

<130> WO/2019/218015

<140> PCT/AU2019/050462

<141> 2019-05-15

<150> AU 2018901672

<151> 2018-05-15

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 1

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(8)

<223> D amino acids

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 9

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(14)

<223> D amino acids

<400> 10

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg

20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(10)

<223> Xaa is Orn

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His

1 5 10 15

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

His His His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His

1 5 10 15

His His His

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 18

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys His His His His His His His His

1 5 10 15

His His

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His His His His His His

1 5 10 15

His His

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His His His His His

1 5 10 15

His His His

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 22

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400

> 23

Asp Ser Glu Ala Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 24

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 25

Arg Ser Lys Ala Lys

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Arg Ser Lys Ala Lys Arg

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

Arg Ser Lys Ala Lys Arg Arg

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Arg Ser Lys Ala Lys Arg Arg Arg

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Arg Ser Lys Ala Lys Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 32

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 33

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 34

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> D amino acids

<400> 35

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> Cyclised

<400> 36

Cys Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Cys

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 37

Arg Ser Lys Ala Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> D amino acids

<400> 38

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> D amino acids

<400> 39

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asn Lys Ala Lys
1 5 10 15

Ser Arg

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 40

Ile Ala Gly Gln Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20

<210> 41

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 41

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Gly Pro Leu Gly
20

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 42

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu
1 5 10 15

Tyr Arg

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 43

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asn Lys Ala Lys
1 5 10 15

Ser Arg

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 44

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 45

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg His His His His His His

1 5 10 15

His His His His

20

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 46

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His

20

<210> 47

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 47

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His

20 25

<210> 48

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220

><221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> Branched

<400> 48

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His

20 25

<210> 49

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 49

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His His His

20 25 30

<210> 50

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 50

His His His His His Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20

<210> 51

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 51

His His His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His

1 5 10 15

His His His Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg

20 25

<210> 52

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 52

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His His His His His His

1 5 10 15

His His Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg

20 25

<210> 53

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 53

His His His His His Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His His His

20 25

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 54

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Lys Arg Lys Arg Lys Arg

1 5 10 15

Lys Arg Lys

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 55

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val

1 5

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 56

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 57

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 58

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 59

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Val Lys Val Lys Val Val Val

1 5 10 15

Val Arg

<210> 60

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 60

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His His

20 25

<210> 61

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 61

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg His Arg His Arg His Arg

1 5 10 15

His Arg His Arg His Arg His Arg His His His

20 25

<210> 62

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic polypeptide

<400> 62

Lys Glu Lys Leu Lys Asn Pro Leu Phe Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His

20 25

<210> 63

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 63

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg His Arg His Arg His Arg

1 5 10 15

His Arg His Arg His Arg His Arg His Arg His

20 25

<210> 64

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 64

Lys Glu Lys Leu Lys Asn Pro Leu Phe Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg His His His His His His His His His His
20 25

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic polypeptide

<220><221> LIPID

<222> (18)..(18)

<223> 2-amino-dodecanoic acid x 4

<220><221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> AMIDATION

<400> 65

Arg Ser Lys Ala Lys Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> LIPID

<222> (18)..(18)

<223> 2-amino-dodecanoic acid x 4

<220><221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> AMIDATION

<400> 66

Arg Val Lys Val Lys Val Val Val Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg