



(45)授权公告日 2018.09.14

[illegible]

1. 一种肽,由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) (BNZ- γ) 组成,其中所述氨基酸序列包括至少两个IL蛋白 γ c-盒D螺旋域的部分序列,并且其中所述肽能够抑制选自由IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15或IL-21组成的组的两种或多种 γ c-细胞因子的活性。

2. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述肽抑制IL-15和IL-9的活性。

3. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述肽抑制IL-2、IL-15和IL-9的活性。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的肽,其特征在于,所述肽与BSA、白蛋白、IgG的Fc域或聚乙二醇(PEG)结合。

5. 一种药物组合物,包括治疗有效量的权利要求1-4中任一项的肽,以及药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或其组合。

6. 权利要求1-4中任一项所述的肽或权利要求5的药物组合物用于制备用于改善或治疗人源T细胞嗜淋巴细胞的I型和II型(HTLV-I和HTLV-II)-相关疾病的药物的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述人源T细胞嗜淋巴细胞的I型和II型(HTLV-I和HTLV-II)-相关的疾病选自由如下组成的组:成人T细胞性白血病(ATL)、HTLV-相关的脊髓病/热带痉挛轻截瘫(HAM/TSP),以及与HTLV相关的其他非肿瘤的炎性疾病。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述与HTLV相关的其他非肿瘤的炎性疾病选自由葡萄膜炎(HU)、关节病、肺病、皮炎、外分泌腺体病和肌炎组成的组。

调节 γ -C-细胞因子活性的组合物及方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2011年1月18日递交的美国临时申请第61/433,890号、以及2011年8月24日递交的美国临时申请第61/527,049号的优先权,这些申请的所有内容以引用的方式被结合在本文中。

技术领域

[0003] 本实施方案涉及 γ c-家族细胞因子的肽拮抗剂, γ c-家族细胞因子是一组哺乳动物细胞因子,主要由上皮、基质和免疫细胞产生,控制着不同系列的淋巴细胞的正常及病理性激活。本实施方案也涉及这些肽在治疗某些人类疾病上的治疗用途。本实施方案还涉及这些肽的药用化妆品应用。本文公开了这些肽的靶疾病、药用化妆品应用,以及给药方法、生产以及商业化的描述。

背景技术

[0004] 细胞因子是一组各种不同的可溶性因子,调节多种细胞功能,例如生长、功能分化,以及促进或预防程序性细胞死亡(凋亡性细胞死亡)。细胞因子不同于激素,并非是由分化的腺组织产生,而是可由多种细胞类型,例如上皮、基质或免疫细胞产生。

[0005] 迄今为止已经鉴定出了多于100种细胞因子,被认为是从原始基因池中通过基因复制的方式发展而来(参见Bazan, J.F. 1990, Immunol. Today 11:350-354)。为支持这一观点,一群细胞因子共有其多亚基受体系统中的一个组分是很常见的。研究最为充分的T细胞中共有的细胞因子亚基为共同的 γ 亚基(γ c-亚基)。 γ c-亚基由6种已知的细胞因子共有(白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-7 (IL-7)、白细胞介素-9 (IL-9)、白细胞介素-15 (IL-15) 和白细胞介素-21 (IL-21),共同称为“ γ c-细胞因子”或“ γ c-家族细胞因子”),在为这些细胞因子传递细胞激活信号上发挥着不可缺少的作用。另外,对于每一种 γ c-细胞因子,均有一或两种私有的细胞因子-特异性受体亚基,当与 γ c-亚基复合时,得到全功能的受体。(参见Rochman等人, 2009, Nat Rev Immunol. 9:480-90.)

[0006] γ c-家族细胞因子是一组哺乳动物细胞因子,主要由上皮、基质和免疫细胞产生,控制着不同系列的淋巴细胞的正常及病理性激活。在胸腺中T细胞的早期发育中以及它们在外周的稳态中均极为需要这些细胞因子。例如,如果不含 γ c-亚基,则在小鼠中不会发育出T、B和NK细胞。(参见Sugamura等人, 1996, Annu. Rev. Immunol. 14:179-205)。

[0007] 与 γ c-细胞因子相关的病理学

[0008] 最新研究表明, γ c-细胞因子的表达调节异常及功能障碍会导致多种人类免疫学及造血疾病。

[0009] IL-2

[0010] 虽然IL-2曾被认为是一种原型T细胞生长因子,但是缺乏IL-2表达的敲除小鼠的生成显示IL-2对体内常规T细胞的生长或发育并非是关键。然而,IL-2的过表达会导致T细胞的一个亚类:调节T细胞(T-reg)会优先扩张。(参见Antony等人, 2006,

J. Immunol. 176:5255-65.) T-regs抑制了其他细胞的免疫反应,从而起到维持外周耐受的作用(在Sakaguchi等人,2008,Cell 133:775-87中综述过)。研究认为外周耐受的破坏引起了人类中的自身免疫病。因此,T-regs的免疫抑制功能被认为可以预防自身免疫病的发生(参见Sakaguchi等人,2008,Cell 133:775-87)。T-regs也与癌症有关,其中实体瘤和血液恶性肿瘤与T-regs的升高的值有关(参见De Rezende等人,2010,Arch. Immunol. Ther. Exp. 58:179-190)。

[0011] IL-4

[0012] 在T辅助细胞分化成Th2(T辅助细胞2型)亚类中IL-4是非丰余的抑制细胞因子,可以促进早熟的B细胞分化成产生IgE的浆细胞。在变应性哮喘中IgE的水平升高。因此,IL-4与变应性哮喘的发展有关。可采用靶向于IL-4的抗体治疗或甚至预防变应性哮喘的发作。(参见Le Buanec等人,2007,Vaccine 25:7206-16.)

[0013] IL-7

[0014] IL-7对于B细胞发育及胸腺中T细胞的早期发育是必不可少的。在小鼠中,IL-7的表达异常引起了T细胞相关的白血病。(参见Fisher等人,1993,Leukemia 2:S66-68.)然而在人类中,IL-7的误调节似乎不会引起T细胞相关的白血病。在人类中,单独或与另一种 γ c-细胞因子家族成员IL-15协同上调IL-7与大颗粒淋巴细胞(LGL)白血病有关。

[0015] IL-9

[0016] 与其他 γ c-细胞因子家族成员相比,IL-9的作用人体相当不典型。缺少IL-9基因的小鼠看上去很正常,并且在淋巴和造血隔室中的细胞中也不缺少任何亚类。然而近期研究显示,IL-9在生成Th17(由白细胞介素-17诱导的T辅助)细胞中发挥体内作用(参见Littman等人,2010,Cell 140(6):845-58;以及Nowak等人,2009,J. Exp. Med. 206:1653-60)。

[0017] IL-15

[0018] IL-15在NK细胞、NK-T细胞、上皮内淋巴细胞(IELs)的一些亚类、 $\gamma\delta$ -细胞,以及记忆-表型CD8T-细胞的发育过程中非常关键(参见Waldmann,2007,J. Clin. Immunol. 27:1-18;和Tagaya等人,1996,EMBO J. 15:4928-39.)。在小鼠中IL-15的过表达导致发育出NK T-细胞和CD8细胞型T细胞白血病(参见Fehniger等人,2001,J. Exp. Med. 193:219-31;Sato等人,2011Blood in press)。这些实验上诱导的白血病看上去与人类LGL(大颗粒淋巴细胞)白血病相似,因为在这两者中白血病细胞均表达CD8抗原。

[0019] 同样怀疑IL-15-介导的自分泌机制可能与CD4T淋巴细胞的白血病转化有关。(参见Azimi等人,1998,Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2452-7;Azimi等人,1999,J. Immunol. 163:4064-72;Azimi等人,2000,AIDS Res. Hum. Retroviruses 16:1717-22;以及Azimi等人,2001,Proc. Natl. Acad. Sci. 98:14559-64)。例如,引起人类中成人T细胞白血病的CD4-向性HTLV-I通过生成IL-15和IL-15R α 而诱导病毒转化的T细胞的自分泌生长(Azimi等人,1998,Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2452-7)。

[0020] 除白血病转化外,近期的研究暗示了IL-15在脂泻病(CD),一种自身免疫病的病理性发展中起作用。已知IL-15会通过诱导细胞溶解酶(即,粒酶和穿孔素)以及干扰素- γ 的表达而刺激NK、CD8和小肠上皮内淋巴细胞(IEL)分化成淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞。脂泻病(本文中以CD表示)是一种免疫介导的肠病,在表达特异性的HLA-DQ等位基因的个体中由食用含谷蛋白的食物而引起。在西方人群中该病的发病率为1%。目前对CD唯一的治疗是

从患者的饮食中彻底除去谷蛋白。CD的病理学主要是由对肠粘膜的大面积损坏而造成,这是由激活的CD8T细胞渗透到小肠固有层而引起的。这些CD8T细胞似乎是通过涉及IL-15的机制而被激活的。最近的一篇出版物显示,在小鼠中由肠上皮细胞异位过表达IL-15导致了肠病的发生,这与CD患者中的损害非常类似。中和IL-15的活性显著降低了病理变化。因此,通过IL-15介入阻断CD8T细胞的激活看上去提供了相对于常规的无谷蛋白饮食而应对CD的一种可选的策略。

[0021] IL-21

[0022] IL-21是 γ c-家族中最新发现的一个成员。不同于其他家族成员,IL-21看上去并不具有强力的生长促进作用。相反,IL-21被认为相比于控制细胞增殖的因子而更多地起到分化因子的作用(参见Tagaya,2010,J.Leuk.Biol.87:13-15)。

[0023] 当前治疗 γ c-细胞因子-介导的紊乱的策略

[0024] 由于 γ c-细胞因子被认为涉及到多种人类疾病,现在已经给出了几种通过抑制 γ c-细胞因子家族活性而治疗 γ c-细胞因子相关疾病的方法。这些方法包括在体内使用细胞因子-特异性的单克隆抗体中和靶向的细胞因子的活性;使用靶向于私有的细胞因子-特异性的受体亚基(除共有的 γ c-亚基外的亚基)的单克隆抗体以选择性抑制细胞因子的活性;以及使用阻断下游的细胞内细胞因子信号转导通路的化学抑制剂。虽然细胞因子-特异性抗体通常为在设计治疗方法上的第一选择,但共有受体组分的细胞因子显示出重叠的功能(参见Paul,W.E.,1989,Cell57:521-24),并且多于一种细胞因子可协作引起疾病(参见下文所述的例子)。因此,涉及中和单种细胞因子的方法在治疗细胞因子相关的人类疾病中可能并不有效。

[0025] 也提出过通过识别共有的受体组分的抗体而抑制多种细胞因子的功能的设计治疗方法的策略。然而,细胞因子受体系统多亚基的特性及单种细胞因子的功能受体能够采用不同构型的事实使得这一方法非常困难。例如,功能性IL-15受体既可以为IL-15RB/ γ c,也可以为IL-15R α / β / γ c。(参见Dubois等人,2002,Immunity17:537-47。)IL-15RB受体的抗体(TMB1)是IL-15功能的一种高效的抑制剂,但只有在受体复合物中不含IL-15R α 分子的时候才是如此。(参见Tanaka等人,1991,J.Immunol.147:2222-28。)因此,不管是针对共有的还是私有的亚基,单克隆抗受体抗体的效力在体内都是取决于背景的且是不可预见的。

[0026] 虽然将单克隆抗体用于针对与疾病的发病机理相关的生物学活性因子或受体的临床用途是一种惯例,但很少有成功的案例。此外,确定一种适于临床的单克隆抗体治疗方法是一个非常漫长及困难的过程,成功生成中和抗体大部分是运气的成分。例如,由于 γ c-亚基在通过 γ c-家族细胞因子介导信号通路的极端重要性,已经付出了很多努力以生成针对 γ c-亚基的多克隆和单克隆抗体,目前有一些识别小鼠和人的 γ c-亚基的商业化抗体。然而很奇怪地,这些抗 γ c-亚基抗体中没有一种能够阻断 γ c-细胞因子的功能。

[0027] 单克隆抗体的治疗用途的另一个问题在于单克隆抗体通常是用人类蛋白使啮齿类免疫产生的,因此所生成的抗体是异种蛋白,因此高度致免疫。为了规避这一问题,对单克隆抗体的氨基酸序列进行了分子改良,使得抗体分子被识别为人源免疫球蛋白(一种称为人源化的过程),但这一过程需要时间和费用。

[0028] 靶向于JAK3,一种抑制多种 γ c-细胞因子的现有的可选示例

[0029] γ c-亚基和 γ c-细胞因子间的相互作用导致一种称为Janus激酶3(Jak3)的细胞

内蛋白酪氨酸激酶的激活。Jak3反过来将多种信号分子包括STAT5和PI3激酶磷酸化。 γ c-亚基与Jak3的相互作用非常特异。实际上,没有其他的受体分子需要Jak3进行信号转导。(参见O'Shea,2004,Ann.Rheum.Dis.63:(suppl.II):ii67-7.)因此,可以通过阻断Jak3激酶的活性而通过 γ c-亚基抑制细胞因子信号。因此,市场上已经出现了靶向于Jak3激酶活性的多种化学抑制剂。(参见Pesu等人,2008,Immunol.Rev.223:132-142.)一种这样的例子为CP690,550。

[0030] 这些蛋白激酶抑制剂的主要缺点是缺乏对Jak3激酶的特异性。这些药物阻断了ATP(腺苷-三磷酸)分子与Jak3激酶的结合,这是一种对许多蛋白激酶共同的生化反应,因此可能会阻断与Jak3激酶无关、其作用对于各种组织中的正常细胞的健康极为需要的多种细胞内蛋白激酶的作用。因此,需要对于通过 γ c-亚基的信号传递更为特异性的抑制剂。

[0031] 因此,对于治疗 γ c-细胞因子相关的疾病的另外一种可供选择的策略具有很大需要。

发明内容

[0032] 一个实施方案涉及被分离或纯化的肽,基本上由19-元氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)所组成(在本文中被 称为“BNZ- γ ”)。

[0033] 另一个实施方案涉及通过一种或多种 γ c-细胞因子家族成员而阻断信号传递的方法,包括将细胞与基本上由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成的被分离或纯化的肽接触。

[0034] 另一个实施方案涉及通过一种或多种 γ c-细胞因子家族成员而阻断信号传递的方法,包括将细胞与基本上由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成的被分离或纯化的肽接触,其中所述细胞为免疫细胞。

[0035] 另一个实施方案涉及通过一种或多种 γ c-细胞因子家族成员而阻断信号传递的方法,包括将细胞与基本上由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成的被分离或纯化的肽接触,其中所述 γ c-细胞因子家族成员选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15或IL-21组成的组。

[0036] 另一个实施方案涉及由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成的肽的衍生肽,其中所述衍生肽具有与由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成的肽相似的理化性质,但衍生肽具有不同的生物活性。

[0037] 另一个实施方案涉及定制肽(custom peptide),其中所述定制肽的氨基酸序列通过保守置换一个或多个氨基酸而不同于氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)。

[0038] 另一个实施方案涉及一种定制肽,基本上由19-元氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成。

[0039] 另一个实施方案涉及定制肽,其中所述定制肽的氨基酸序列通过将6-位的谷氨酰胺(Q)用另一种极性氨基酸取代而不同于氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)。

[0040] 另一个实施方案涉及一种定制肽,其中定制肽的氨基酸序列通过用与含序列I-K-

E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的氨基酸具有相似的生化特性的一种或多种氨基酸取代而不同于氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1)。

[0041] 另一个实施方案涉及氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S 的定制肽衍生物, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列为 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的肽具有相似的理化性质, 但具有不同的生物活性, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 共有至少 50% 的序列同源性。

[0042] 另一个实施方案涉及基本上由氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 组成的肽与现有的生物学蛋白/肽的 N 末端、C 末端和/或侧链残基的结合用于在体内高效递送和改善生物学稳定性。这种结合的例子为 BSA、白蛋白、IgG 的 Fc 域、起到支架作用的其他生物学蛋白、不同分子量的聚乙二醇或 (PEG) 或其他相似的部分。

[0043] 另一个实施方案涉及氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的定制肽衍生物与现有的生物学蛋白/肽的 N 末端、C 末端和/或侧链残基的结合, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列为 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的肽具有相似的理化性质, 但具有不同的生物活性, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 共有至少 50% 的序列同源性。这种结合的例子为白蛋白、IgG 的 Fc 域、起到支架作用的其他生物学蛋白、不同分子量的或聚乙二醇或 (PEG) 或其他相似的部分。

[0044] 另一个实施方案涉及一种抑制 γ c-细胞因子活性的方法, 包括将 γ c-细胞因子与基本上由氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 组成的肽进行接触。

[0045] 另一个实施方案涉及针对含氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的免疫原性肽得到的多克隆和单克隆抗体。

[0046] 另一个实施方案涉及针对氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的定制肽衍生物得到的多克隆和单克隆抗体, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列为 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的肽具有相似的理化性质, 但具有不同的生物活性, 其中定制肽的氨基酸序列与氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 共有至少 50% 的序列同源性。

附图说明

[0047] 图 1A 示出了人类 γ c-细胞因子家族成员的 D 螺旋域的比对。

[0048] 图 1B 描述了得到 γ c-细胞因子的 D 螺旋域附近的共有序列的 γ c 盒及 IL-2/IL-15 盒基序。

[0049] 图 2 描述了表示氨基酸的生化特性的图示。

[0050] 图 3A 显示了在 PT-18 增殖试验中 BNZ- γ 对 IL-2、IL-15 和 IL-9 活性的抑制。

[0051] 图 3B 显示了在含 IL-2 或 IL-15 以及 0、0.1、1 或 10 μ M BNZ- γ 下生长的 CTTL2 细胞的增殖试验。

[0052] 图 3C 显示了由 BNZ- γ 抑制 IL-15-介导的酪氨酸-磷酸化。

[0053] 图4A显示了使用HAM/TSP外周血进行的来自体内的T-细胞增殖试验。T-细胞增殖通过加入BNZ- γ 而被抑制。

[0054] 图4B显示,在使用HAM/TSP外周血的来自体内的T-细胞增殖试验中,CD4+CD25+细胞的群在向培养物中加入BNZ- γ 后而被减小。

[0055] 图4C显示,在使用HAM/TSP外周血的来自体内的T-细胞增殖试验中,CD4+Ki67细胞的群在向培养物中加入BNZ- γ 后而被减小。

[0056] 图4D显示,在使用HAM/TSP外周血的来自体内的T-细胞增殖试验中,通过Guava染色的活细胞的百分率在向培养物中加入BNZ- γ 后并未受影响。

具体实施方式

[0057] 综述

[0058] 在构成免疫系统的淋巴细胞,特别是T、B和NK细胞的发育过程中, γ c-细胞因子是重要的一员。此外, γ c-细胞因子与多种人类疾病有关。因此,抑制 γ c-细胞因子活性的因子可提供有用的工具用于阐明淋巴细胞亚类的发育机制以及治疗免疫功能紊乱和 γ c-细胞因子-介导的疾病。

[0059] 已知在小鼠中编码 γ c-亚基的基因的种系缺失或在人类中 γ c-亚基的突变通过破坏NK、T和B细胞的正常出现或功能而引起了严重联合免疫缺陷(SCID)。在显示从这些小鼠及人类患者中淋巴细胞对 γ c-细胞因子的应答的研究中指出了 γ c-亚基在 γ c-细胞因子,IL-2、-4、-7、-9、-15、-21的信号转导中的重要性(在Sugamura等人,1995Adv.Immunol.59:225-277中综述过)。这表明破坏 γ c-亚基与 γ c-细胞因子之间的相互作用会通过 γ c-细胞因子家族成员而有效阻断细胞内的信号传递事件。因此按照本文的实施方案的拮抗剂肽被认为会有效地阻断罹患由 γ c-细胞因子家族成员的误调控介导的疾病的人类中的病原性变化。

[0060] 作为调节单种 γ c-细胞因子活性的抗体-介导的方法的一种替换方法,申请人设计了一种在本文中称为“同时-阻断(Simul-Block)”的新型低分子量的化合物,可抑制多种 γ c-细胞因子的活性。这些低分子量化合物包括化合物和肽两者,比抗体具有更低的免疫原性。这些特性显示同时-阻断是一种在临床介入中调节 γ c-细胞因子活性的更为高效的策略。

[0061] γ c-盒的发现

[0062] γ c-细胞因子的C末端(D螺旋)含有所建议的用于与多单位细胞因子受体的共同的 γ c-亚基发生相互作用的位点。(Bernard等人,2004J.Biol.Chem.279:24313-21.)通过对小鼠和人类中所识别的所有 γ c-细胞因子的氨基酸的生化特性进行比较,结果显示在 γ c-细胞因子家族成员中的D螺旋的许多位点处,氨基酸的化学性质,例如疏水性、亲水性、碱/酸性,如果不相同,也是保守的。相反,与 γ c-细胞因子IL-4相关但不与 γ c-亚基结合的IL-13的序列并不表现出与 γ c-细胞因子的D螺旋域显著的同源性,这表明D螺旋域中的序列同源性与和 γ c-亚基结合相关。如图1所示,人类中 γ c-细胞因子家族成员的D螺旋域的氨基酸序列的比对显示了在这些细胞因子中的中等序列同源性的基序,在本文中被称为“ γ c-盒”。

[0063] γ c-盒包括19个氨基酸,其中在这19个位点中,位点4、5和13分别为完全保守的苯

丙氨酸、亮氨酸和天冬酰胺。在 γ c-盒的第6、7和11位观察到保守性较差,其中氨基酸为共有理化性质的两种或三种相关氨基酸中的一种:第6位可由极性氨基酸谷氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺所占据;非极性氨基酸丝氨酸或精氨酸可占据第7位;第11位可由非极性脂肪族氨基酸亮氨酸或异亮氨酸所占据。第9位和第16位可由非极性氨基酸异亮氨酸或极性氨基酸赖氨酸所占据。参见图1B。在 γ c-细胞因子亚家族中,在第9和16位观察到了 γ c-盒的氨基酸组成上的一些差异。各种类型间的 γ c-细胞因子的对比表明,在IL-2/15亚家族中异亮氨酸出现在第9和6位,而另一种 γ c-家族成员(例如IL-4、IL-21)在这些位点处具有赖氨酸。并非希望受限于某一具体理论,异亮氨酸和赖氨酸是生化不同的,因此有可能使IL-2/15亚家族和其他 γ c-细胞因子之间具有特异的构象差异。

[0064] 位于D螺旋域中的天冬酰胺(Asn,Q)残基对 γ c-细胞因子结合到 γ c-亚基上很关键这一研究结果支持了 γ c-细胞因子间 γ c-盒基序的保守性。(Bernard等人,2004J.Biol.Chem.279:24313-21.)

[0065] γ c-细胞因子活性的肽抑制剂

[0066] γ c-家族细胞因子的活性可通过破坏 γ c-细胞因子和 γ c-亚基之间的相互作用,例如通过引入能与 γ c-亚基发生相互作用而不会通过多亚基细胞因子受体刺激信号传递的竞争性抑制剂而被阻断。并非是受限于某一具体理论,参与 γ c-家族细胞因子结合到 γ c-亚基中的保守的 γ c-盒基序含有一个核心碱性氨基酸序列,可被用于设计 γ c-细胞因子信号传递的肽抑制剂。

[0067] 核心 γ c-盒氨基酸序列包括:D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q(SEQ ID NO:2)(其中X表示任意氨基酸)。本文所描述的实施方案涉及能够抑制一种或多种 γ c-细胞因子的活性的核心 γ c-盒氨基酸序列的定制肽衍生物。定制肽衍生物包括其部分氨基酸序列与核心 γ c-盒氨基酸序列表现出大约50%、50-60%、60-70%、70-80%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.8%同一性的任何肽。定制肽衍生物进一步包括该肽衍生物的部分氨基酸序列包括与核心 γ c-盒的氨基酸具有相似理化性质的氨基酸的任意肽。例如,具有相似理化性质的氨基酸可以包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸,均为芳香族氨基酸。图2给出了具有相似理化性质的氨基酸的图示,其可被用于替换含核心 γ c-盒的氨基酸。核心 γ c-盒的肽衍生物的长度可以为11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、24、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50或多于50个氨基酸。在一些实施方案中,定制肽衍生物可以结合到现有的生物学蛋白/肽的N末端、C末端或结合到其侧链残基上。

[0068] 基于对细胞因子中与 γ c-亚基结合的保守 γ c-盒基序的鉴定,申请人设计了一种新型的19-元定制衍生肽,这是一种人工合成的肽,与人源IL-2和IL-15 γ c-盒的氨基酸序列结合。该19-元肽,在本文中称为BNZ- γ ,由氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)组成,其中以黑体字显示的氨基酸在IL-2和IL-15之间是保守的,带下划线的氨基酸表示氨基酸的理化性质是保守的位点。

[0069] 申请人发现,19-元BNZ- γ 抑制IL-15和IL-19诱导的细胞增殖,但不抑制IL-2或IL-4诱导的细胞增殖。参见图3A和实施例2。申请人进一步证明,BNZ- γ 抑制IL-15介导的细胞内细胞因子信号转导分子STAT-5的磷酸化。参见图3C和实施例5。这些结果证明,保守的 γ c-盒基序的定制肽衍生物能够抑制多种 γ c-细胞因子的活性。

[0070] 多个实施方案涉及19-元BNZ- γ 氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-

N-T-S (SEQ ID NO:1) 的定制衍生肽,其能够抑制一种或多种 γ c-细胞因子的活性。19-元 BNZ- γ 氨基酸序列的定制肽衍生物包括其部分氨基酸序列与氨基酸序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 表现出大约 50%、50-60%、60-70%、70-80%、80%、90%、95%、97%、98%、99% 或 99.8% 同一性的任意肽。定制肽衍生物进一步包括该肽衍生物的部分氨基酸序列包括与序列 I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (SEQ ID NO:1) 的氨基酸具有相似理化性质的氨基酸的任意肽。在多个实施方案中,定制衍生肽的氨基酸残基具有与 BNZ- γ 的氨基酸残基相似的理化性质,但表现出与原始 19-元肽不同的对 6 γ c-细胞因子家族成员的生物学抑制特异性。BNZ- γ 的肽衍生物的长度可以为 19、20、21、22、24、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50 或多于 50 个氨基酸。在一些实施方案中,定制肽衍生物可以结合到现有的生物学蛋白/肽的 N 末端、C 末端或结合到其侧链残基上。

[0071] 多个实施方案涉及 IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 或 IL-7 的 γ c-盒基序的定制肽衍生物,这在图 1A 中进行了描述。其他实施方案涉及的定制衍生肽为将人源 IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 和 IL-7 γ c-盒基序中的两种或更多种的氨基酸序列结合起来的人工复合肽。多个实施方案涉及的 IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 或 IL-7 的 γ c-盒基序的定制肽衍生物的部分氨基酸序列表现出与 IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 或 IL-7 的 γ c-盒基序的氨基酸序列具有大约 50%、50-60%、60-70%、70-80%、80%、90%、95%、97%、98%、99% 或 99.8% 的同一性。IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 或 IL-7 的 γ c-盒基序的定制肽衍生物进一步包括该肽衍生物的部分氨基酸序列包括与 IL-15、IL-2、IL-21、IL-4、IL-9 或 IL-7 的 γ c-盒基序的序列的氨基酸具有相似理化性质的氨基酸的任意肽。

[0072] 多个实施方案涉及的定制肽衍生物可以抑制 γ c-细胞因子中的一个、所有或选择的成员的功能。在一些实施方案中,定制肽衍生物选择性地靶向于单个 γ c-细胞因子家族成员。例如,定制肽衍生物能够选择性地抑制 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 或 IL-21 的功能。在其他实施方案中,定制肽衍生物能够抑制 2 种或更多种 γ c-细胞因子家族成员。例如,本文的实施方案的定制肽衍生物能够选择性地抑制 IL-2 连同 IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 中的一种或多种的功能; IL-4 连同 IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 中的一种或多种的功能; IL-7 连同 IL-9、IL-15 和 IL-21 中的一种或多种的功能; IL-9 连同 IL-2、IL-4、IL-7、IL-15 和 IL-21 中的一种或多种的功能; IL-15 连同 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-21 中的一种或多种的功能; 或 IL-21 连同 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 中的一种或多种的功能。在其他实施方案中,定制肽衍生物能够全面地靶向于所有的 γ c-细胞因子家族成员。并非希望受限于某一具体理论,定制肽衍生物能够通过减少 γ c-细胞因子与 γ c-亚基的结合而抑制 γ c-细胞因子的所有成员或选择的成员的功能,例如,可以为竞争性抑制剂。这种定制肽衍生物可被用于多种应用,包括作为临床用药。

[0073] 当指代与本发明的实施方案所提供的定制肽衍生物时,术语“寡肽”、“多肽”、“肽”和“蛋白”能够互换使用并且能够用于指定任意长度的一系列氨基酸残基。根据本发明的实施方案的肽也可包括非自然的氨基酸。连接子元件能够通过肽键或通过化学键与本发明的实施方案的肽连接。本发明的实施方案的肽可以是线性或环状的,并且可以包括 (D) 及 (L) 氨基酸。本发明的实施方案的肽也可包含一种或多种稀有氨基酸(例如 4 羟脯氨酸或羟赖氨酸),常见氨基酸的有机酸或酰胺和/或衍生物,例如 C 末端羧酸酯化(例如苯甲酯、甲酯或乙酯)或酰胺化和/或对 N 末端氨基具有修饰(例如乙酰化或烷氧羰基氨基化)的氨基酸,含或

不含任意多种侧链修饰和/或取代(例如,甲基化、苄化、叔丁基化、甲苯磺酰化、烷氧羰基氨基化等等)。可能含有的除常见氨基酸外的残基包括但不限于青霉胺、四亚甲基半胱氨酸、环戊烷半胱氨酸、巯基丙酸、环戊烷-巯基丙酸、2-巯基苯、2-巯基苯胺、2-巯基脯氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、氨基己二酸、间-氨基苯甲酸和二氨基丙酸。

[0074] 可以通过本领域技术人员已知的多种方法制造和获得本发明的实施方案的肽。例如,肽可以通过基因工程,基于编码本发明的实施方案的肽的核苷酸序列而制造出,或者是通过化学合成,依靠肽固相合成等等而制造出,或者通过它们的组合而制造并得到。本领域技术人员能够基于本发明的保守的 γ c-盒基序以及在图2中描述的氨基酸的生化特性的知识合成定制肽衍生物。一些实施方案还涉及含编码本发明的肽的核苷酸序列的多核苷酸。“核苷酸序列”、“多核苷酸”或“核酸”能够互换使用,并且被理解为指的是双链DNA、单链DNA或所述DNA的转录产物(例如RNA分子)。多核苷酸可被施用到细胞或受试者中并由细胞或受试者表达,而非施用肽本身。多个实施方案还涉及包括编码本发明的肽的多核苷酸序列的基因构件。基因构件也可包括其他调控元件例如启动子和增强子以及任选地,选择性标记物。

[0075] 治疗 γ c-细胞因子介导的疾病的方法

[0076] 多个实施方案涉及 γ c-拮抗剂肽在治疗 γ c-细胞因子介导的疾病中的用途。使用按照本发明的实施方案定制肽衍生物使得可以灵活设计治疗制剂(肽的定制设计),能够得到更综合的结果,这是由使用抗细胞因子或抗细胞因子受体抗体的常规策略所无法实现的。

[0077] 本文所描述的是一种阻断 γ c-家族细胞因子的作用的新型方法。这样的操作可以得到一种很有效的临床介入治疗与 γ c-细胞因子的调节异常或功能障碍有关的疾病的方法。可通过破坏 γ c-细胞因子与 γ c-亚基之间的相互作用而治疗的疾病的例子包括自身免疫病例如系统性红斑狼疮、干燥综合症、韦格纳肉芽肿痛、脂泻病、桥本或自免疫甲状腺炎;胶原性疾病包括类风湿性关节炎、炎症性肠病、糖尿病、自身免疫皮肤病例如牛皮癣;退行性神经疾病例如多发性硬化、眼睛的葡萄膜炎或炎症以及交感性眼炎、移植物抗宿主病(GvHD)和重症肌无力。

[0078] 在一些实施方案中,本文所描述的 γ c-拮抗剂肽可被用于治疗I-人源T细胞嗜淋巴细胞的I型和II型(HTLV-I和HTLV-II)-相关的疾病,包括成人T细胞性白血病(ATL)、HTLV-相关的脊髓病/热带痉挛性轻截瘫(HAM/TSP),以及与HTLV相关的其他非肿瘤的炎性疾病例如葡萄膜炎(HU)、关节病、肺病、皮炎、外分泌腺体病和肌炎。在一些实施方案中,本文所描述的 γ c-拮抗剂肽可被用于治疗其他病毒性疾病例如流感、艾滋病、HBV和疱疹或寄生虫病。

[0079] 在多个实施方案中, γ c-拮抗剂肽可以作为免疫抑制剂而在移植多种器官之前、期间或之后施用。

[0080] 在一些实施方案中,本文所描述的 γ c-拮抗剂肽可被用于治疗免疫介导的疾病例如哮喘和其他炎性的呼吸道疾病,例如但不限于鼻窦炎、花粉热、支气管炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、变应性鼻炎、急性和慢性耳炎、肺纤维化。在一些实施方案中,可以施用 γ c-拮抗剂肽以治疗或预防由于接触过敏原、化学试剂或急性呼吸道疾病的其他常见病因的变态反应。在一些实施方案中, γ c-拮抗剂肽可被施用以治疗或预防由病毒、细菌、化学试剂和

生化试剂引起的炎症反应。

[0081] 在多个实施方案中， γ c-拮抗剂肽可被施用以治疗有些类型的恶性肿瘤例如LGL白血病、上皮内淋巴瘤和顽固性脂泻病中的白血病、NK白血病/淋巴瘤和NK-T白血病/淋巴瘤。

[0082] 在一些实施方案中，按照本文所描述的实施方案的定制肽衍生物由于其抗炎特性而可被用于化妆品的用途，例如治疗痤疮、脱发、晒黑和指甲保养，包括用作抗老化组分的软膏。

[0083] 多个实施方案涉及的治疗用拮抗剂肽可以抑制 γ c-细胞因子的所有或选择的成员的功能。在一些实施方案中，治疗用拮抗剂肽选择性地抑制了单个 γ c-细胞因子家族成员(定制肽)。在其他实施方案中，治疗用拮抗剂肽能够全面抑制所有的 γ c-细胞因子家族成员(同时-阻断)。在一些实施方案中，治疗用拮抗剂肽选择性地抑制了 γ c-细胞因子的亚类。并非希望受限于某一具体理论，肽拮抗剂能够通过减少 γ c-细胞因子与 γ c-亚基的结合而抑制 γ c-细胞因子的所有成员或选择的成员的功能，例如，可以为竞争性抑制剂。

[0084] 在实验小鼠模型中， γ c-细胞因子家族的多个成员，IL-2、IL-7和IL-15而非IL-4与移植物抗宿主病(GvHD)相关联。(Miyagawa等人, 2008J. Immunol. 181:1109-19.) 一个实施方案涉及使用选择性抑制IL-2、IL-7和IL-15活性的治疗用拮抗剂肽以治疗人类中的GvHD，使得移植的组织或骨髓细胞存活下来。其他实施方案涉及使用选择性抑制IL-2和IL-7、IL-2和IL-15，或IL-7和IL-15的组合的治疗用拮抗剂肽以治疗GvHD。其他实施方案涉及使用选择性抑制IL-2、IL-7或IL-15的治疗用拮抗剂肽的组合。

[0085] 一些实施方案涉及使用选择性抑制IL-2功能的治疗用拮抗剂肽以治疗T-regs发挥作用的自身免疫病。在一些实施方案中，肽介导的T-regs的抑制能够增强人类中天然的抗癌免疫力，这提供了一种新型的抗癌治疗方法。

[0086] 多个实施方案涉及使用选择性抑制IL-4的治疗用拮抗剂肽以治疗哮喘。

[0087] 一些实施方案涉及使用单独选择性抑制IL-7的治疗用拮抗剂肽或与选择性抑制 γ c-细胞因子家族成员IL-15的治疗用拮抗剂肽结合用作LGL白血病的治疗试剂。在一些实施方案中，选择性抑制IL-7和IL-15两者活性的治疗用拮抗剂肽可被用于治疗LGL白血病。多个实施方案涉及将BNZ- γ 用于治疗LGL白血病。在一些实施方案中，仅选择IL-15的特异性 γ c-拮抗剂肽或者选择IL-15和IL-7的特异性 γ c-拮抗剂肽被用作CD4/CD8T淋巴细胞相关的白血病包括由HTLV-I所引起的白血病的治疗剂。

[0088] 多个实施方案涉及将单独选择性抑制IL-9活性的 γ c-拮抗剂肽或与另一种 γ c-细胞因子家族成员结合用作涉及Th17细胞发育异常的人类疾病的治疗剂。

[0089] 多个实施方案涉及将选择性抑制IL-15活性的治疗用拮抗剂肽用作治疗CD的治疗剂。一篇最近的出版文章表明除IL-15外，IL-21可能在CD的发病机理中发挥作用。(参见Bodd等人, 2010, Mucosal Immunol. 3:594-601.) 这表明，通过常规的抗-细胞因子或细胞因子-受体抗体对CD的最佳的治疗会受益于属于IL-15和IL-21系统的至少两种抗体识别组分的组合。在一些实施方案中，将选择性抑制IL-15和IL-21二者活性的定制衍生物拮抗剂肽用作治疗CD的治疗剂。

[0090] 除具有治疗应用外， γ c-拮抗剂肽还可用于消费产品中。多个实施方案涉及 γ c-拮抗剂肽用于护肤品中，例如抗老化、抗炎、抗痤疮和其他相关的应用。一些实施方案涉及

γ c-拮抗剂肽在护发产品中作为抗脱发成分以治疗由自身免疫紊乱造成的脱发的应用。

[0091] 另一个实施方案涉及开发立体结构与19-元氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的类似并且能够装进 γ c-亚基的口袋中以从结构上阻碍 γ c-细胞因子与 γ c-亚基结合的化合物(非肽,非蛋白)。一些实施方案涉及将结构上类似的化合物用作 γ c-细胞因子活性的抑制剂。这种进一步改进在结构上与现有的生物学肽/蛋白相似的合成的化合物的开发的分子模拟策略在Orzaez等人,2009Chem.Med.Chem.4:146-160中描述过。另一个实施方案涉及施用与19-元氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)具有相似的3D结构的化合物(非肽,非蛋白)以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。

[0092] 多个实施方案涉及施用氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的肽以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。另一个实施方案涉及施用氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的衍生肽,其中衍生肽的氨基酸序列具有与氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的肽相似的理化性质,但具有不同的生物活性,以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。另一个实施方案涉及向患者施用与现有的生物学蛋白/肽的N和C末端或与其侧链残基相连的氨基酸序列为I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的肽以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。

[0093] 多个实施方案涉及向患者中施用针对含氨基酸序列为I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的肽的多克隆和单克隆抗体作为免疫原以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。另一个实施方案涉及向患者中施用针对氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的衍生肽得到的多克隆和单克隆抗体作为免疫原,其中衍生肽的氨基酸序列具有与氨基酸序列I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S(SEQ ID NO:1)的肽相似的理化性质,但具有不同的生物活性,以治疗 γ c-细胞因子介导的疾病。

[0094] γ c-拮抗剂肽的施用

[0095] 本发明的实施方案还包括将 γ c-拮抗剂肽用于制造用于治疗疾病的药剂。本发明的实施方案还包括一种药物组合物,所述药物组合物包括 γ c-拮抗剂肽连同药学上可接受的载体。药物组合物可以包括药学上可接受的载体及非毒性的治疗有效量的 γ c-拮抗剂肽,或本发明的实施方案的其他组合物。

[0096] 本发明的实施方案提供了使用包括在合适的稀释剂或载体中的有效量的 γ c-细胞因子拮抗剂的药物组合物的方法。本发明的实施方案的 γ c-拮抗剂可以按照用于制备药学上有用的组合物的已知的方法进行配制。 γ c-拮抗剂既可以作为单独的活性物质也可以与其他已知的活性物质一起,与药学上合适的稀释剂(例如,磷酸酯、醋酸酯、Tris-HCl)、防腐剂(例如硫汞撒、苄醇、对羟基苯甲酸酯)、乳化化合物、增溶剂、佐剂、和/或载体例如牛血清清蛋白混合在混合物中。合适的载体及它们的制剂在Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿氏药理学),第16版,1980Mack Publishing CO.中描述过。另外,这些组合物可以含有与聚乙二醇(PEG)、金属离子络合,或结合进聚合物例如聚乙酸、聚乙醇酸、水凝胶等等,或结合进脂质体、微乳剂、胶束、单层或多层气泡、红细胞血影或球芽的 γ c-拮抗剂。这些组合物会影响物理状态、可溶性、稳定性、体内释放速率,以及体内清除速率或 γ c-

拮抗剂。 γ c-拮抗剂能够连接至针对细胞特异性抗原、受体、配基的抗体上,或连接至组织特异性受体的配基上。

[0097] 施用本发明的实施方案的 γ c-拮抗剂的方法可以酌情选择,这取决于各种因素,例如疾病类型、受试者的状况,和/或靶向的位点。 γ c-拮抗剂可通过局部、口服、肠胃外、直肠,或通过吸入施用。术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌肉内、腹膜内、脑池内注射,或浸入技术。这些组合物通常会单独包括有效量的 γ c-拮抗剂或与有效量的任意其他活性物质结合。本发明的实施方案的药物组合物中含有的肽的量、药物组合物的剂型、给药频率等等可以酌情选择,这取决于各种因素,例如疾病类型、受试者状况和/或靶向的位点。在所述组合物中含有的这些剂量和所希望的药物浓度可受多种参数的影响,包括计划的用途、患者的体重和年龄,以及给药途径。首先会使用动物研究进行预实验,向人给药的量可按照本领域的习惯做法进行。

[0098] 在一个实施方案中,向受试者中施用已经用编码至少一种 γ c-拮抗剂肽的多核苷酸进行基因修饰的宿主细胞,以治疗增殖紊乱和/或降低恶性肿瘤细胞的生长。多核苷酸由宿主细胞表达,从而在受试者体内生成所述肽。优选地,宿主细胞对受试者是异源的或自体的。

[0099] 在进一步方面, γ c-拮抗剂肽可与其他疗法结合使用,例如抑制癌症细胞增殖和生长的疗法。短语“联合治疗”施用 γ c-拮抗剂肽及其他的治疗试剂作为在与这些治疗试剂的共同作用下带来有益效果的具体治疗方案的一部分。与这些治疗试剂联合施用通常在一个确定的时间内进行(通常为分钟、小时、天或星期,这取决于所选择的组合)。

[0100] 联合治疗包括以顺序方式施用这些治疗试剂,即,其中每一种治疗试剂在不同的时间下施用,还包括以基本上同时的方式施用这些治疗试剂,或至少两种治疗试剂。基本上同时施用可通过例如向受试者中施用每种治疗试剂有固定比例的单种胶囊或施用多种含单种治疗试剂的单种胶囊。顺序或基本上同时施用每种治疗制剂会受到合适的路径的影响,包括但不限于口服路径、静脉内路径、肌肉路径,以及通过粘膜组织直接吸收。因此治疗试剂可通过相同的路径或不同的路径施用。治疗试剂施用的顺序并不是非常关键的。

[0101] 联合治疗也可包括进一步与其他生物学有效成分(例如但不局限于第二及不同的治疗试剂)和非药物疗法(例如但不局限于手术或放射疗法)组合施用如上所述的治疗试剂。如果联合治疗进一步包括放射疗法,则放射疗法可在任何合适的时间进行,只要能够取得治疗试剂与放射疗法组合的共同作用的有益效果即可。例如,在合适的情况下,当从施用治疗试剂中暂时去除放射疗法,或者几天乃至几星期后仍能取得有益效果。

[0102] 在一些实施方案中, γ c-拮抗剂肽能够与至少一种抗增生试剂组合施用,所述抗增生试剂选自如下组成的组:化学治疗剂、抗代谢物,以及抗致癌剂,以及抗有丝分裂剂,以及抗病毒剂,以及抗肿瘤剂,免疫治疗剂和放射治疗剂。

[0103] 在一些实施方案中, γ c-拮抗剂肽能够与至少一种抗炎剂组合施用,所述抗炎剂选自类固醇、皮质类固醇和非类固醇抗炎药组成的组中。

[0104] 本发明还提供了进行任何上述方法的试剂盒。试剂盒可以包括按照本发明的实施方案的 γ c-拮抗剂。在一些实施方案中,试剂盒可包括说明书。说明书可以为书面或统计图表的形式,或可以在记录介质上,包括录音磁带、音频CD、录像磁带、DVD、CD-ROM等。试剂盒可以包括包装。

[0105] 定义

[0106] 在本文中使用时,术语“患者”指的是治疗性处理的接受者,包括动物界内的所有有机体。在优选实施方案中,动物为哺乳科内的,例如人、牛、羊、猪、猫、水牛、犬、山羊、马、驴、鹿和灵长类。最优选的动物为人。

[0107] 在本文中使用时,术语“治疗”或其任何变型(例如,疗法、处理等)指的是对被诊断为患有如下生物学状况的患者的任何治疗,例如CD4、CD8和LGL白血病、自身免疫病、系统性红斑狼疮、干燥综合症、韦格纳肉芽肿痛、脂泻病、桥本甲状腺炎;胶原性疾病、类风湿性关节炎、炎症性肠病、糖尿病、牛皮癣、神经退行性疾病、多发性硬化、葡萄膜炎、眼睛的炎症、移植物抗宿主病(GvHD)、重症肌无力、1-人源T细胞嗜淋巴细胞的I型和II型(HTLV-I和HTLV-II)-相关的疾病、成人T细胞性白血病(ATL)、HTLV-相关的脊髓病/热带痉挛性轻截瘫(HAM/TSP)、葡萄膜炎(HU)、关节病、肺病、皮炎、外分泌腺体病、肌炎、流感、艾滋病、HBV、疱疹、哮喘、鼻窦炎、花粉热、支气管炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、变应性鼻炎、急性和慢性耳炎、肺纤维化、NK白血病/淋巴瘤和NK-T白血病/淋巴瘤。在本文中使用的术语治疗包括:(i)预防或延迟在尚未表现出与所关心的生物学症状有关的病症的具有患病风险的患者中表现出与所关心的生物学症状有关的病症;(ii)改善在被诊断患有所关心的生物学症状的患者中与所关心的生物学症状相关的病症;(iii)预防、延迟或改善具有患病风险的患者或被诊断为患有所关心的生物学症状的患者中表现出与所关心的生物学症状相关的并发症、症状或疾病相关的病症;(iv)减缓、延迟或停止生物学症状的进展;和/或(v)预防、延迟、减缓、停止或改善炎症的细胞事件。

[0108] 本文中使用的术语“症状”指的是患者遭受具体的症状或疾病的常见的病征或迹象。

[0109] 本文所使用的术语“有效量”指的是取得所希望的生物学效应所需要的量。根据本发明的实施方案, γ c-拮抗剂的有效量为在用于治疗生物学症状中取得至少一个生物学因素的可观察到的作用所需要的量。

[0110] “重组DNA技术”或“重组体”指的是从已经被克隆或合成的DNA序列转化或转染能够生物合成异种肽的微生物(例如细菌、酵母)、无脊椎动物(昆虫)、哺乳细胞或生物(例如转基因动物或植物)生成具体的多肽的所使用的技术和方法。只有哺乳动物细胞表达系统能够实现原生糖基化模式。原核表达系统缺乏向合成的蛋白添加糖基化的能力。酵母和昆虫细胞提供了独特的糖基化模式,可能与原生模式不同。

[0111] “核苷酸序列”指的是源自DNA或RNA的以分开的片段或作为更大的DNA构件的一个组分形式的多核苷酸,至少分离了一次,处于基本上纯的形式,不含污染性内源物质,其量或浓度可以进行鉴定、操作,并且通过标准分子生物学方法(例如在分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)中所列的)还原其组分核苷酸序列。

[0112] “重组表达载体”指的是包括含如下组件的转录单元的质粒:(1)在基因表达中具有调控作用的一个遗传元件或多个遗传元件包括启动子和增强子,(2)编码按照本发明的实施方案的多肽的构件或编码序列,以及(3)合适的转录及翻译起始序列,以及如果需要的,终止序列。计划用于酵母及哺乳动物系统的结构元件优选包括能够由酵母或哺乳动物宿主细胞在细胞外分泌翻译的多肽的信号序列。

[0113] “重组微生物表达系统”指的是具有在染色体DNA中稳定整合的重组转录单元或携

带重组转录单元作为残余质粒的一个组分的合适的宿主微生物,例如细菌如大肠杆菌或酵母如啤酒酵母的基本上同源的单种培养物。通常,构成重组微生物表达系统的宿主细胞为单种祖转化细胞的后代。重组微生物表达系统在引入与待表达的结构核苷酸序列连接的调控元件后可表达异种多肽。

[0114] 为了进行说明,给出了如下的实施例,这些实施例不应被解释为是一种限制。

[0115] 实施例

[0116] 实施例1

[0117] 测定 γ c-拮抗剂肽的抑制活性的方法

[0118] 采用哺乳动物细胞试验测量它们对 γ c-细胞因子家族成员的增生性应答,测定按照本发明的实施方案制备的任意定制衍生肽抑制 γ c-细胞因子家族成员的能力。

[0119] 对于六种 γ c-细胞因子中的每一种,指示细胞系:CTLL-2,一种从美国模式培养物保藏所获得的鼠源CD8T细胞系,以及PT-18,一种鼠源肥大细胞系及其亚克隆PT-18 β 用人源IL-2R β 基因进行转染,使得细胞对IL-2和IL-15发生应答(Tagaya等人,1996,EMBO J.15:4928-39),并被用于定量测定 γ c-细胞因子的生长促进活性(参见Wiley和Sons的免疫学实验指南(Current protocols in Immunology)以参考方法学)。当用比色WST-1试验在一定范围的浓度下测量时(对于试剂和方法的详细描述,参见Clontech PT3946-1及相关的用户手册,以引用的方式被结合到本文中)指示细胞显示出半线性的剂量依赖性响应。一旦从指示细胞系中测定到适当剂量的细胞因子产生了50%及95%最大响应,则向含细胞因子及指示细胞的每个孔中加入各种浓度(从1pM到10 μ M)的纯化的或合成的定制衍生肽。将在450nm下的光吸光度的降低用作抑制细胞因子刺激的细胞增殖的指示。通常,细胞受到细胞因子的刺激,使得含指示细胞系和细胞因子的孔的吸光度为2.0-3.0,当加入抑制肽后可降至0.1-0.5。

[0120] 实施例2

[0121] BNZ- γ 肽特异性地抑制IL-9和IL-15的生长促进活性

[0122] 使用如上所述的PT-18 β 细胞,测定BNZ- γ 肽特异性抑制选择的 γ c-细胞 因子的生长促进活性的能力(图3A)。将IL-3,一种支持PT-18 β 细胞的生长的非 γ c-细胞因子用作阴性对照。简要说,将PT-18 β 细胞用两种不同稀释度的由HEK293T细胞生成的BNZ- γ 肽(用BNZ- γ 表达构件转染的HEK293T细胞的原始上清液的1:20或1:50稀释度)或不含BNZ- γ 肽在IL-3、IL-9、IL-15或IL-4中孵育(培养物中每种细胞因子1nM)。采用WST-1试验,在引入BNZ- γ 肽和细胞因子两天后测定细胞的生长-响应。IL-3(非 γ c-细胞因子)的生长促进活性并没有受到BNZ- γ 的抑制。相反,IL-15和IL-9的活性则被BNZ- γ 肽显著(T检验 $p < 0.01$)降低。由IL-4,另一种 γ c-细胞因子刺激的细胞增殖并没有受到加入BNZ- γ 肽的影响。IL-3、IL-9、IL-15和IL-4的结果在图3A中示出。

[0123] 在相似的试验中,采用鼠源细胞系CTLL2。在该试验中,将细胞用含0.5nM的重组体IL-2的RPMI10%胎牛血清培养。为准备增殖试验,将细胞洗涤3遍以除去细胞因子。将细胞向96-孔板的每孔中接种 1×10^5 个细胞,终浓度为50pM的IL-2或IL-15。向每孔中加入各种浓度的BNZ- γ 肽(0.1、1和10 μ g/ml)。将细胞培养20小时,在最后的14小时中,向培养板中加入 3 H-胸苷。使用读板仪收集细胞。数据在图3B中示出。

[0124] 实施例3

[0125] 通过分析作为细胞增殖标记物的 ^3H -胸苷的结合而测量抑制 γc -细胞因子活性的方法

[0126] 通过 ^3H 胸苷结合试验而测量拮抗剂定制衍生肽对指示细胞群的 γc -细胞因子-诱导的增殖的抑制作用。简要说来,向含细胞因子的正在增殖的20-50,000个细胞中加入放射性标记的胸苷(1微居)。通过采用常规的收集器(例如Perkin-Elmer公司的Filtermate Universal Harvester)将细胞结合的放射性截留在玻璃-纤维过滤器中而测量细胞结合的放射性,此后,使用b计数器(例如1450,Trilux微板闪烁计数器)测量器放射性。

[0127] 实施例4

[0128] 通过分析作为细胞增殖标记物的细胞追踪染料的结合而测量 γc -细胞因子活性的方法

[0129] 将指示细胞在选择的 γc -细胞因子下,或在选择的 γc -细胞因子及选择的定制衍生肽下孵育。然后使用细胞追踪染料,例如Invitrogen公司的CMFDA、C2925,在体外标记细胞群,使用流式细胞仪(例如Beckton-Dickinson FACScalibur)监测每次细胞分裂的细胞绿色荧光的衰减。一般地,在绿色荧光通道中会出现响应 γc -细胞因子刺激的对应于细胞所经历的分裂次数的7-10个不同的峰。将细胞与选择的 γc -细胞因子及拮抗剂定制衍生肽孵育将峰的数量降至仅有1-3,这取决于抑制的程度。

[0130] 实施例5

[0131] 通过BNZ- γ 及其衍生物拮抗剂而抑制细胞内信号传递

[0132] 除刺激细胞增殖外, γc -细胞因子结合到其受体上会引起不同系列的细胞内事件。(Rochman等人,2009Nat.Rev.Immunol.9:480-90,Pesu等人,2005,Immunol.Rev.203:127-142.)在细胞因子与其受体结合即刻后,一种称作Jak3(Janus激酶3)的酪氨酸激酶就被招募到细胞质膜处的受体上。这种激酶将多种蛋白的酪氨酸残基磷酸化,包括 γc -亚基、STAT5(信号转导与转录激活因子5)及PI3(磷脂酰肌醇3)激酶的亚基。其中,在许多研究中涉及STAT5的磷酸化与由 γc -细胞因子引起的细胞增殖有关。(在Hennighausen和Robinson,2008Genes Dev.22:711-21.中综述过)根据这些公开的数据,检测BNZ- γ 肽是否会抑制由IL-15刺激的PT-18 β 细胞中STAT5分子的酪氨酸磷酸化(结果在图3C中示出)。

[0133] 在含或不含BNZ- γ 肽下由IL-15对PT-18 β 细胞进行刺激。按照如在Tagaya等人,1996,EMBO J.15:4928-39中描述的常规方法从细胞中提取胞浆蛋白。将提取的胞浆蛋白采用标准SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)解析,使用免疫印迹法,通过抗磷酸-STAT5抗体(Cell Signaling Technology公司,编号#9354,马萨诸塞州,丹弗斯)证实其磷酸化状态(参见图3C,顶部条带)。为了证实每条通道表示相似的总蛋白上样量,然后将膜洗脱,用抗-STAT5抗体(Cell Signaling Technology公司,编号#9358)再次进行标记(参见图3C,底部条带)。

[0134] 这些结果显示,在PT-18 β 细胞中,STAT5(一种信号转导标记物)的酪氨酸磷酸化受到IL-15的诱导,STAT5的酪氨酸磷酸化被BNZ- γ 肽显著降低。

[0135] 实施例6

[0136] BNZ- γ 衍生物拮抗肽的合理设计

[0137] 基于核心序列D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q(SEQ ID NO:2)(其中X表示任意氨基酸),通过将核心序列的确定的氨基酸替换成如图2所示的具有相同理化性质的氨

基酸而制备衍生肽。

[0138] 实施例7

[0139] 鉴别拮抗定制衍生肽的抑制特异性的方法

[0140] 通过分析定制衍生肽抑制细胞因子-应答的细胞系对6种 γ c-细胞因子中的每一种的增生响应情况的能力而测定拮抗定制衍生肽的 γ c-细胞因子的抑制特异性。例如,使用一种小鼠细胞系CTLL-2测定待测的肽是否抑制IL-2和IL-15的功能。使用PT-18(β)细胞测定待测肽是否抑制IL-4和IL-9的功能。使用PT-17(7 α)细胞测定待测肽是否抑制IL-7的功能,以及使用PT-18(21 α)细胞测定待测肽是否抑制IL-21的功能。PT-18(β)表示通过基因转染而外源性表达人源IL-2RB的PT-18细胞的亚克隆(参见Tagaya等人,1996),PT-18(7 α)表示通过基因转染而表达人源IL-7R α 的亚克隆,PT-18(21R α)细胞表达人源IL-21R α 。

[0141] 另一种替换方法是使用对一系列细胞因子响应的其他细胞系。这种细胞系的一个例子为可从ATCC(编号#CRL-2407)商业购买到的一种人源NK细胞系NK92。这种细胞系为IL-2依赖的细胞系,对其他细胞因子包括IL-9、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21发生响应(Gong等人,1994,Leukemia8:652-658,Kingemann等人,1996,Biol Blood Marrow Transplant2:68;75,Hodge DL等人,2002,J.Immunol.168:9090-8)。

[0142] 实施例8

[0143] γ c-拮抗剂肽的制备

[0144] 通过人工及自动化的方法化学合成定制衍生的 γ c-拮抗剂肽。

[0145] 人工合成:采用经典的液相合成,包括将一个氨基酸的羧基或C末端与另一个氨基酸的氨基或N末端连接。可选地,使用固相肽合成(SPPS)。

[0146] 自动化合成:许多商业公司提供了付费的自动化肽合成。这些公司使用各种商业化的肽合成器,包括由Applied Biosystems(ABI)提供的合成器。通过自动化的肽合成器合成定制衍生的 γ c-拮抗剂肽。

[0147] 实施例9

[0148] 采用重组技术生物生成定制衍生的 γ c-拮抗剂肽

[0149] 将定制衍生的 γ c-拮抗剂肽生物合成为前肽,所述前肽由合适的标记肽、信号肽或源自已知的可提高或稳定BNZ- γ 肽的结构并改善其生物活性的人源蛋白的肽组成。如果需要的话,可以设计出针对肽的N末端进行的合适的酶裂解序列以从最终蛋白中除去肽的标记物或任何部分。

[0150] 向一种商业化载体中插入在3'末端具有终止密码子的编码衍生肽的核苷酸序列,所述商业化载体含有源自大肠杆菌的硫氧还蛋白的标记物部分,以及介入到标记物部分及编码定制衍生肽的核苷酸序列之间的由适当的蛋白水解酶(例如肠激酶)所识别和消化的特异性肽序列,以及终止密码子。一种合适的载体的例子为从加利福尼亚州Invitrogen公司获得的pThioHis质粒。也可使用其他的表达载体。

[0151] 实施例10

[0152] 将BNZ- γ 及衍生物结合到载体蛋白上用于免疫目的以及生成抗BNZ- γ 抗体

[0153] 使用BNZ- γ 及其他定制衍生肽将动物免疫,得到多克隆和单克隆抗体。采用戊二醛或间马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯,通过常规方法将肽连接至合适的载体蛋白(例如牛血清清蛋白,钥孔戚血蓝素(KLH)等等)的N或C末端。然后将连接的肽及合适的佐

剂用于免疫动物例如兔、啮齿类或 驴。使用常规方法检测合成的抗体的特异性。如果得到的抗体与免疫原性肽反应,然后按照在实施例1-3中描述的细胞增殖试验对其测定抑制单种 γ c-细胞因子活性的能力。由于衍生肽的合成的特性,由于这些肽的合成的特性,因此能够生成同时识别两种不同的细胞因子的单一抗体。

[0154] 实施例11

[0155] 大规模生成定制衍生的 γ c-拮抗剂肽的方法

[0156] 通过使用在其他地方描述的无细胞系统而大规模地生成重组蛋白。(参见Takai等人,2010Curr.Pharm.Biotechnol.11(3):272-8.) 简要说,将编码 γ c-拮抗剂肽的cDNA及标记物亚克隆进合适的载体中(参见Takai等人,2010Curr.Pharm.Biotechnol.11(3):272-8),进行体外转录,随后立即进行体外翻译,生成被标记的肽。然后将前多肽采用识别被标记的表位的固定抗体进行纯化,用蛋白水解酶处理,采用常规的18%N-三(羟甲基)甲基甘氨酸-SDS-PAGE(Invitrogen)及常规的考马斯染色对洗出液(主要含有所关心的定制衍生肽)进行纯度测定。如果肽没有达到所希望的纯度(>98%),则将混合物用常规的HPLC(高效液相色谱)进行进一步提纯。

[0157] 实施例12

[0158] 定制衍生的 γ c-拮抗剂肽阻断HAM/TSP中细胞因子功能的用途

[0159] HTLV-1-相关的脊髓病(HAM)/热带痉挛性轻截瘫(TSP)是一种慢性进展性的脊髓病,可在一些感染了人源T-嗜淋巴细胞病毒I型(HTLV-I)的人中看到。脊髓中淋巴细胞浸润与对HTLV-I的免疫反应有关,这导致了释放一些细胞因子。这些细胞因子中的一些也可能会损伤神经。

[0160] 患有HAM/TSP的患者表现出免疫系统的状态升高,这与在自身免疫病中观察到的(Oh等人,2008Neurol Clin.26:781-785)类似。这种升高的状态可以通过HAM/TSP患者的T细胞在不含外源性添加细胞因子的体外培养基中培养大约一周时进行自发性增殖的能力表现出来。HAM/TSP患者中T细胞的自发性增殖至少部分归因于IL-2、IL-9和IL-15的自分泌/旁分泌性循环。已经显示,增加IL-2或IL-15受体的阻断抗体能够抑制HAM/TSP体外培养系统中自发性的T细胞增殖。这些观察,以及源自体外研究的其他数据,已经提供了将两种单克隆抗体(抗IL-2受体 α 或抗-Tac及抗IL-15受体 β 链)引入到临床以治疗HAM/TSP的理论基础(Azimi等人,2001Proc.Natl.Acad.Sci.98:14559-64.,Azimi等人,1999J.Immunol163:4064-72)。按照本文所描述的实施方案的抗-细胞因子受体拮抗剂,不但可作为用于HAM/TSP的疗法的治疗用免疫调节剂,而且通过按照本发明的实施方案的抗-细胞因子受体拮抗剂调节HAM/TSP中的免疫反应起到了将按照本发明的实施方案的抗-细胞因子受体拮抗剂用在其他自身免疫病的疗法中的概念验证作用。

[0161] 为了显示按照本文所描述的实施方案的定制衍生的 γ c-拮抗剂肽的效力,我们采用HAM/TSP体外培养系统,在自发性T细胞增殖试验中测试了BNZ- γ 肽阻断对HTLV-I的免疫反应的能力。在加入或不加入BNZ- γ 的HAM/TSP患者血样中进行增殖试验。这些试验评价了在体外HAM/TSP患者血液培养物中BNZ- γ 阻断细胞因子,例如IL-2和IL-15的功能以及在这些样品中预防自发性T细胞增殖的能力。

[0162] 在体外自发性T细胞增殖试验中,将来自HAM/TSP患者的PBMC培养在96孔板的RPMI-10%FCS中,每孔 1×10^6 个细胞。向每孔中加入增加浓度的BNZ- γ 肽。作为对照,以相

似的方式使用一种不相干的肽。将细胞在37℃CO₂培养箱中培养3、4及6天。向细胞中加入1uCi的量的³H-胸苷。在培养了另外6个小时后,收集细胞,测定它们的增殖速度。代表性的HAM/TSP患者的数据在图4A-D中示出。如在图4中所示出的,BNZ-γ肽在大约1ug/ml的浓度下抑制了HAM/TSP培养物中T细胞的自发性增殖。

[0163] 在该试验中还测定了其他的免疫标记物。在体外培养期间,使用病毒蛋白四聚物测量了病毒特异性的CD8细胞的百分率。在流式细胞试验中,监测了CD4+CD25+细胞的数量(一种T细胞激活的标志),以及Ki67染色(T细胞增殖的标志)。

[0164] 可以在相似的将来的试验中使用其他形式的连接的BNZ-γ肽衍生物。这些包括在化学合成后能够与肽连接的白蛋白、BSA、PEG。BNZ-γ肽连接物的其他生物学形式可以包括融合至BNZ-γ肽衍生物的已知的蛋白实体的域(包括但不限于人源IgG的Fc域)。

[0165] 实施例13

[0166] 通过施用定制衍生的γc-拮抗剂肽而治疗人类患者中成人T细胞性白血病(ATL)的方法

[0167] 鉴别出患有成人T细胞性白血病的人类患者。由医生决定的有效剂量的定制衍生的γc-拮抗剂肽,例如BNZ-γ,在由医生决定被施用到患者中一段时间。如果患者出现缓解则认定治疗有效。

[0168] 实施例14

[0169] 通过施用定制衍生的γc-拮抗剂肽而治疗人类患者中的HAM/TSP的方法

[0170] 鉴别出患有HAM/TSP的人类患者。由医生决定的有效剂量的定制衍生的γc-拮抗剂肽,例如BNZ-γ,在由医生决定被施用到患者中一段时间。如果患者的病症得到改善,或者如果疾病的进展已经被停止或减慢,则认定治疗有效。

[0171] 参考文献

[0172] Antony,P.A.,Paulos,C.M.,Ahmadzadeh,M.,Akpınarli,A.,Palmer,D.C.,Sato,N.,Kaiser A.,Heinrichs,C.S.,Klebanoff,C.A.,Tagaya,Y.,and Restifo,NP., Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo.2006 J.Immunol.176:5255-66.

[0173] Azimi,N.,Nagai,M.,Jacobson,S.,Waldmann,T.A.,IL-15plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8 cells in HAM/TSP patients.2001Proc.Natl.Acad.Sci.98:14559-64.

[0174] Azimi,N.,Mariner J.,Jacobson S.,Waldmann T.A.,How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis?2000 AIDS Res.Hum.Retroviruses16:1717-22.

[0175] Azimi,N.,Jacobson,S.,Leist,T.,Waldmann,T.A.,Involvement of IL-15in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis:implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor.1999J.Immunol.163:4064-72.

[0176] Azimi,N.,Brown,K.,Bamford,R.N.,Tagaya,Y.,Siebenlist,U.,Waldmann,T.A., Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site.1998

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:2452-7.

[0177] Bazan,J.F.,Hematopoietic receptors and helical cytokines.1990 Immunol.Today 11:350-354.

[0178] Bettini,M.,and Vignali,D.A.,Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity.2009 Curr.Opin.Immunol.21:612-8.

[0179] Bodd,M.,Raki,M.,Tollefsen,S.,Fallang,L.E.,Bergseng,E.,Lundin,K.E., Sollid,L.M.,HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22.2010Mucosal Immunol.3:594-601.

[0180] De Rezende,L.C.,Silva I.V.,Rangel,L.B.,Guimaraes,M.C.,Regulatory T cells as a target for cancer therapy.2010 Arch.Immunol.Ther.Exp.58:179-90.

[0181] Dubois,S.,Mariner,J.,Waldmann,T.A.,Tagaya,Y.,IL-15Ralpha recycles and presents IL-15In trans to neighboring cells.2002 Immunity17:537-47.

[0182] Dodge DL.Et al.,IL-2 and IL-12 alter NK cell responsiveness to IFN-gamma-inducible protein 10 by down-regulating CXCR3 expression.J.Immun.168: 6090-8.

[0183] Fehniger,T.A.,Suzuki,K.,Ponnappan,A.,VanDeusen,J.B.,Cooper,M.A., Florea,S.M.,Freud,A.G.,Robinson,M.L.,Durbin,J.,Caligiuri,M.A.,Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+T cells.2001 J.Exp.Med.193:219-31.

[0184] Fisher,A.G.,Burdet,C.,LeMeur,M.,Haasner,D.,Gerber,P.,Cerediq,R., Lymphoproliferative disorders in an IL-7 transgenic mouse line.1993 Leukemia 2:S66-68.

[0185] Gong JH,et al.Characterization of a human cell line (NK-92)with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells.Leukemia 8:652-658,1994.

[0186] Hennighausen,L.,Robinson,G.W.,Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B.2008 Genes Dev.22:711-21.

[0187] Klingemann HG,et al.A cytotoxic NK-cell line (NK-92)for ex vivo purging of leukemia from blood.Biol.Blood Marrow Transplant.2:68-75,1996.

[0188] Krause,C.D.and Pestka,S.,Evolution of the Class2cytokines and receptors,and discovery of new friends and relatives.2005 Pharmacol.and Therapeutics 106:299-346.

[0189] Kundig,T.M.,Schorle,H.,Bachmann,M.F.,Hengartner,H.,Zinkernagel,R.M., Horak,I.,Immune Responses of the interleukin-2-deficient mice.1993 Science 262:1059-61.

[0190] Le Buanec,H.,Paturance,S.,Couillin,I.,Schnyder-Candrian,S.,Larcier, P.,Ryffel,B.,Bizzini,B.,Bensussan,A.,Burny,A.,Gallo,R.,Zagury,D.,Peltre,G., Control of allergic reactions in mice by an active anti-murine IL-4 immunization.2007 Vaccine 25:7206-16.

- [0191] Littman,D.R.,Rudensky,AY.,Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation.2010 Cell 140(6):845-58.
- [0192] Miyagawa,F.,Tagaya,Y.,Kim,B.S.,Patel,H.J.,Ishida,K.,Ohteki,T.,Waldmann,T.A.,Katz,S.I.,IL-15serves as a costimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft-versus-host-like disease.2008J.Immunol.181:1109-19.
- [0193] Noguchi,M.,Yi,H.,Rosenblatt,H.M.,Filipovich,A.H.,Adelstein,S.,Modi,W.S.,McBride,O.W.,Leonard,W.J.,Interleukin 2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans.1993 Cell 73:147-157.
- [0194] OH,U.,Jacobson S.,Treatment of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic
- [0195] Paraparesis:Towards Rational Targeted Therapy2008Neurol Clin.200826:781-785.
- [0196] Orzaez,M.,Gortat,A.,Mondragon,L.,Perez-Paya,E.,Peptides and Peptide Mimics as Modulators of Apototic Pathways.2009Chem.Med.Chem.4:146-160.
- [0197] O' Shea,J.J.,Targeting the Jak/STAT pathway for immunosuppression.2004Ann.Rheum.Dis.63:(suppl II):ii67-71.
- [0198] Paul,W.E.,Pleiotropy and redundancy:T cell-derived lymphokines in the immune response.1989Cell57:521-4.
- [0199] Pesu M,Candotti F,Husa M,Hofmann SR,Notarangelo LD,and O' Shea JJ.Jak3,severe combined immunodeficiency,and a new class of immunosuppressive drugs.2005 Immunol.Rev.203:127-142.
- [0200] Pesu,M.,Laurence,A.,Kishore,N.,Zwillich,S.,Chan,G.,O' Shea,J.J.,Therapeutic targeting of Janus kinases.Immunol.2008 Rev.223:132-142.
- [0201] Rochman,Y.,Spolski,R.,Leonard,W.J.,New Insights into the regulation of T cells by gamma c family cytokines.2009 Nat.Rev.Immunol.9:480-90.
- [0202] Sakaguchi,S.,Yamaguchi,T.,Nomura,T.,Ono,M.,Regulatory T cells and immune tolerance.2008 Cell133:775-87.
- [0203] Sato,N.,Sabzevari,H.,Fu,S.,Ju,W.,Bamford,R.N.,Waldmann,T.A.,and Tagaya,Y.,Development of an IL-15-Autocrine CD8 T-cell Leukemia in IL-15 Transgenic mice requires the cis-expression of IL-15R apha.Blood 2011 in press.
- [0204] Sugamura,K.,Asao,H.,Kondo,M.,Tanaka,N.,Ishii,N.,Nakamura,M.,Takeshita,T.,The common gamma-chain for multiple cytokine receptors.1995 Adv.Immunol.59:225-277.
- [0205] Sugamura,K.,Asao,H.,Kondo,M.,Tanaka,N.,Ishii,N.,Ohbo,K.,Nakamura,M.,Takeshita,T.,The interleukin-2 receptor gamma chain:its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID.1996

Annu.Rev.Immunol.14:179-205.

[0206] Tagaya,Y.,Burton,J.D.,Miyamoto,Y.,Waldmann,TA.,Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells.1996 EMBO J.15:4928-39.

[0207] Tagaya,Y.,Memory CD8 T cells now join“Club21”.2010 J.Leuk.Biol.87:13-15.

[0208] Takai,K.,Sawasaki,T.,and Endo.Y.The Wheat-Germ Cell-Free Expression System,2010Curr.Pharm.Biotechnol.11:272-8.

[0209] Tanaka,T.,et al.,A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain.Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4cells.1991J.Immunol.147:2222-28.

[0210] Takeshita,T.,Asao,H.,Ohtani,K.,Ishii,N.,Kumaki,S.,Tanaka,N.,Manukata,H.,Nakamura,M.,Sugamura,K.,Cloning of the Gamma chain of the Human IL2 receptor.1992 Science 257:379-382.

[0211] Waldmann,T.A.,Anti-Tac (daclizumab,Zenapax) in the treatment of leukemia,autoimmune diseases,and in the prevention of allograft rejection:a 25-year personal odyssey.2007 J.Clin.Immunol.27:1-18.

序列表

<110> Y·塔加亚
 N·阿齐米
 <120> 调节 γ -C-细胞因子活性的组合物及方法
 <130> FP1V130914LD/USKMOB/MY
 <150> 61/433, 890
 <151> 2011-01-18
 <150> 61/527, 049
 <151> 2011-08-24
 <160> 8
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> BNZ- γ 肽
 <400> 1
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Arg Phe Ile His Ile Val Gln Ser Ile Ile
 1 5 10 15
 Asn Thr Ser

[0001]

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> γ -c-细胞因子抑制肽
 <220>
 <221> 变异体
 <222> (1)... (1)
 <223> Xaa = Asp 或 Glu
 <220>
 <221> 变异体
 <222> (4)... (4)
 <223> Xaa = Glu, Gln 或 Asn
 <220>
 <221> 变异体
 <222> (5)... (5)
 <223> Xaa = Ser 或 Arg
 <220>
 <221> 变异体
 <222> (6)... (6)
 <223> Xaa = 任意氨基酸
 <220>
 <221> 变异体
 <222> (7)... (7)
 <223> Xaa = Ile 或 Lys

<220>
<221> 变异体
<222> (8)... (8)
<223> Xaa = 任意氨基酸

<220>
<221> 变异体
<222> (9)... (9)
<223> Xaa = Leu 或 Ile

<220>
<221> 变异体
<222> (10)... (10)
<223> Xaa = 任意氨基酸

<400> 2
Xaa Phe Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln
1 5 10

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-15 D-螺旋肽

<400> 3
Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
1 5 10 15
Asn Thr Ser

[0002]

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 D-螺旋肽

<400> 4
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
1 5 10 15
Ser Thr Leu Thr
20

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-21 D-螺旋肽

<400> 5
Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile
1 5 10 15
His Gln His Leu Ser
20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-4 D-螺旋肽

<400> 6
Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr
1 5 10 15
Ser Lys Cys Ser Ser
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-9 D-螺旋肽

[0003] <400> 7
Ala Leu Thr Phe Leu Glu Ser Leu Leu Glu Leu Phe Gln Lys Glu Lys
1 5 10 15
Met Arg Gly Met Arg
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-7 D-螺旋肽

<400> 8
Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp
1 5 10 15
Asn Lys Ile Leu
20

人γC-家族细胞因子的D-螺旋域序列的比对

IL-15	I	K	E	F	L	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S	终止 子			
SEQ ID NO: 3																							
IL-2	I	V	E	F	L	N	R	W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L	T	终止 子		
SEQ ID NO: 4																							
IL-21	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S		
SEQ ID NO: 5																							
IL-4	L	E	N	F	L	E	R	L	K	T	I	M	R	E	K	Y	S	K	C	S	S		
SEQ ID NO: 6																							
IL-9	A	L	T	F	L	E	S	L	L	E	L	F	Q	K	E	K	M	R	G	M	R		
SEQ ID NO: 7																							
IL-7	D	L	C	F	L	K	R	L	-	-	L	-	Q	E	I	K	T	C	W	N	K	I	L
SEQ ID NO: 8																							

图1A

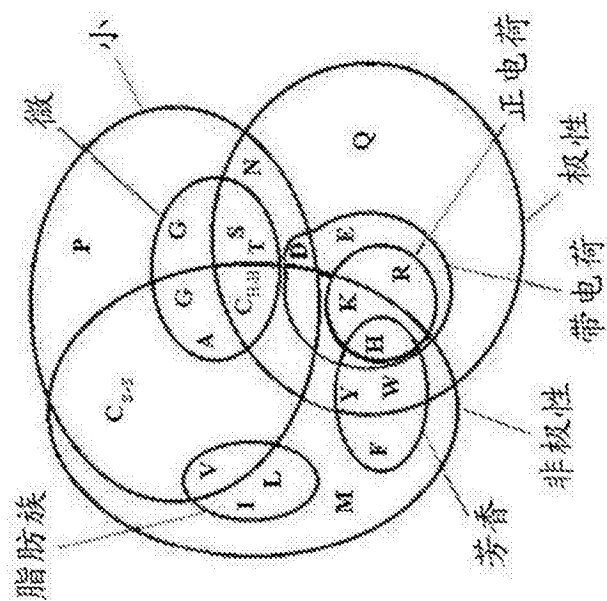


图2

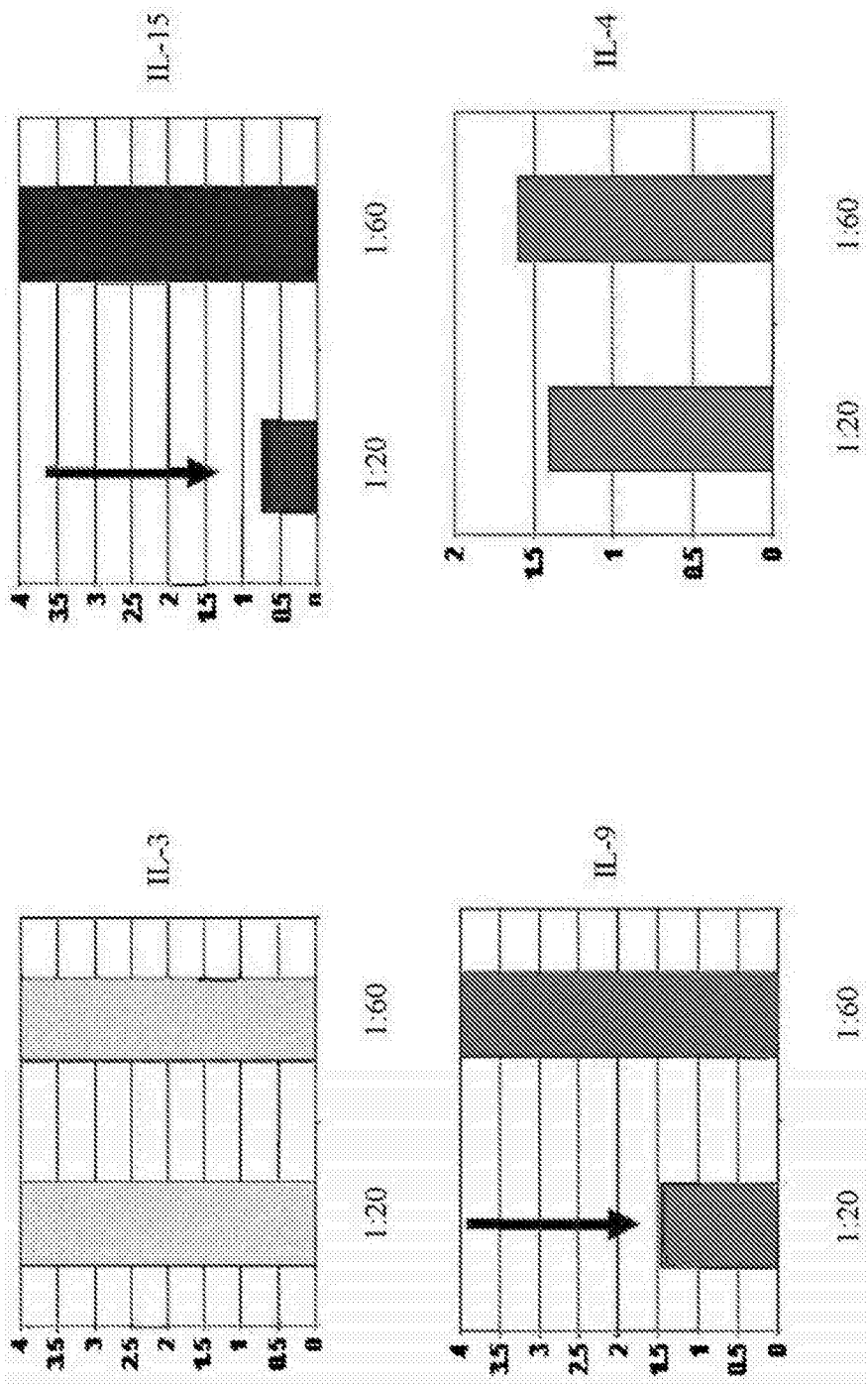


图3A

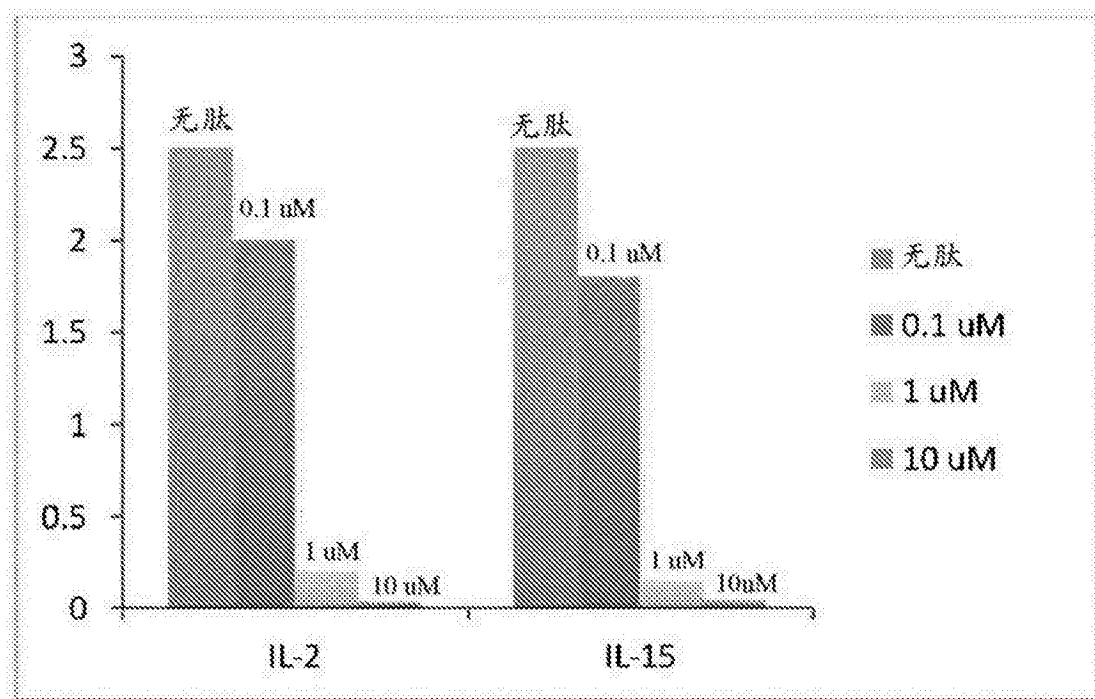


图3B



图3C

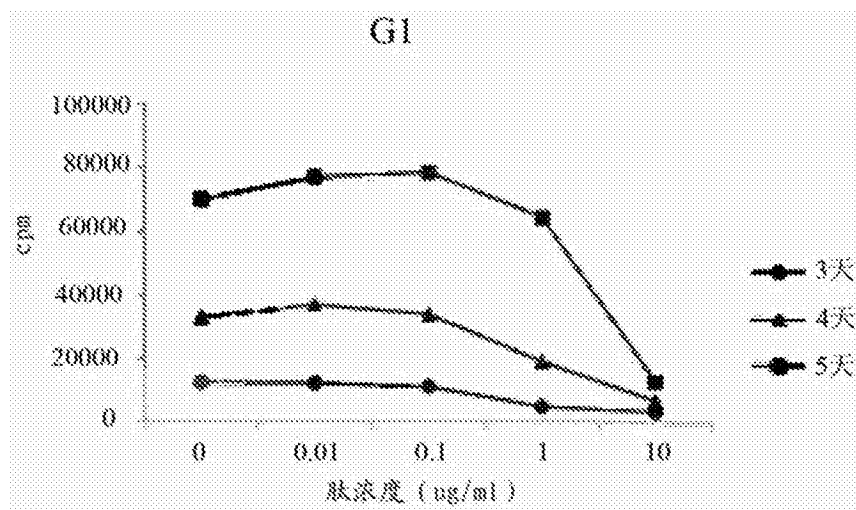


图4A

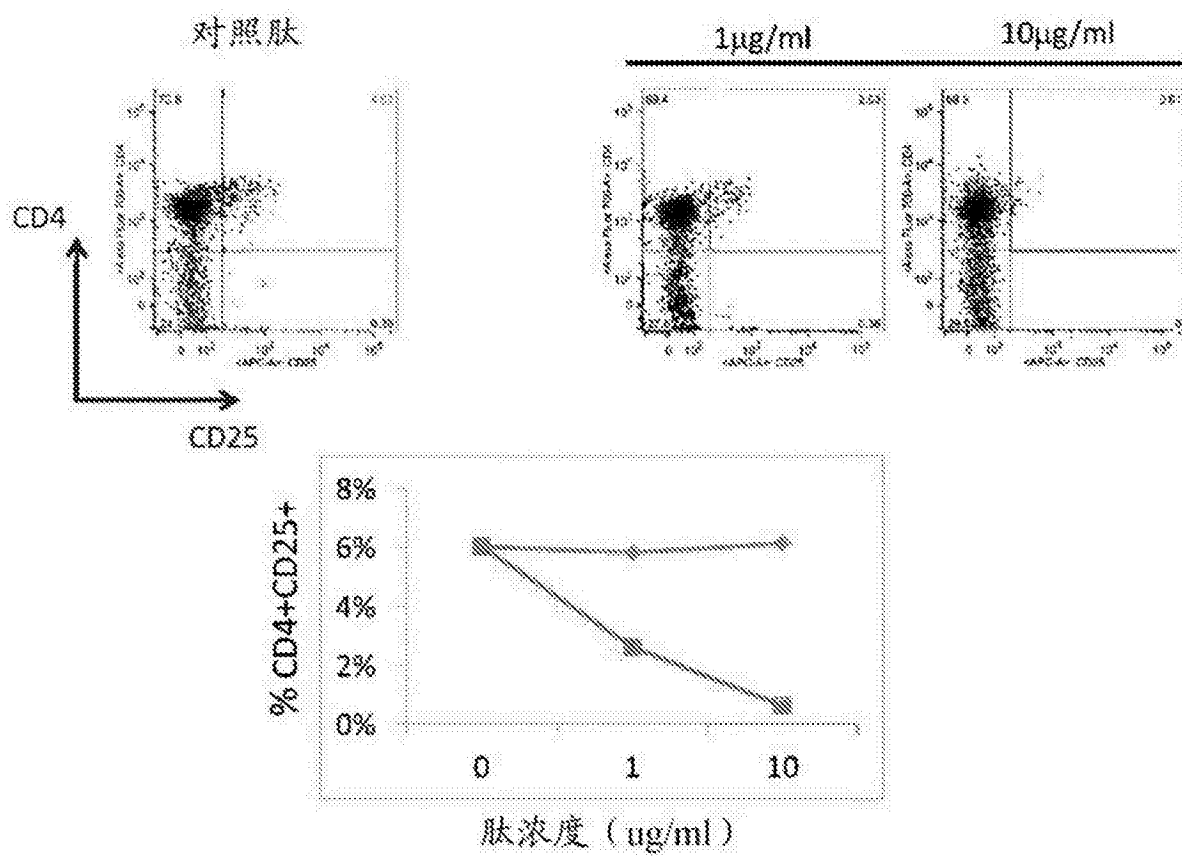


图4B

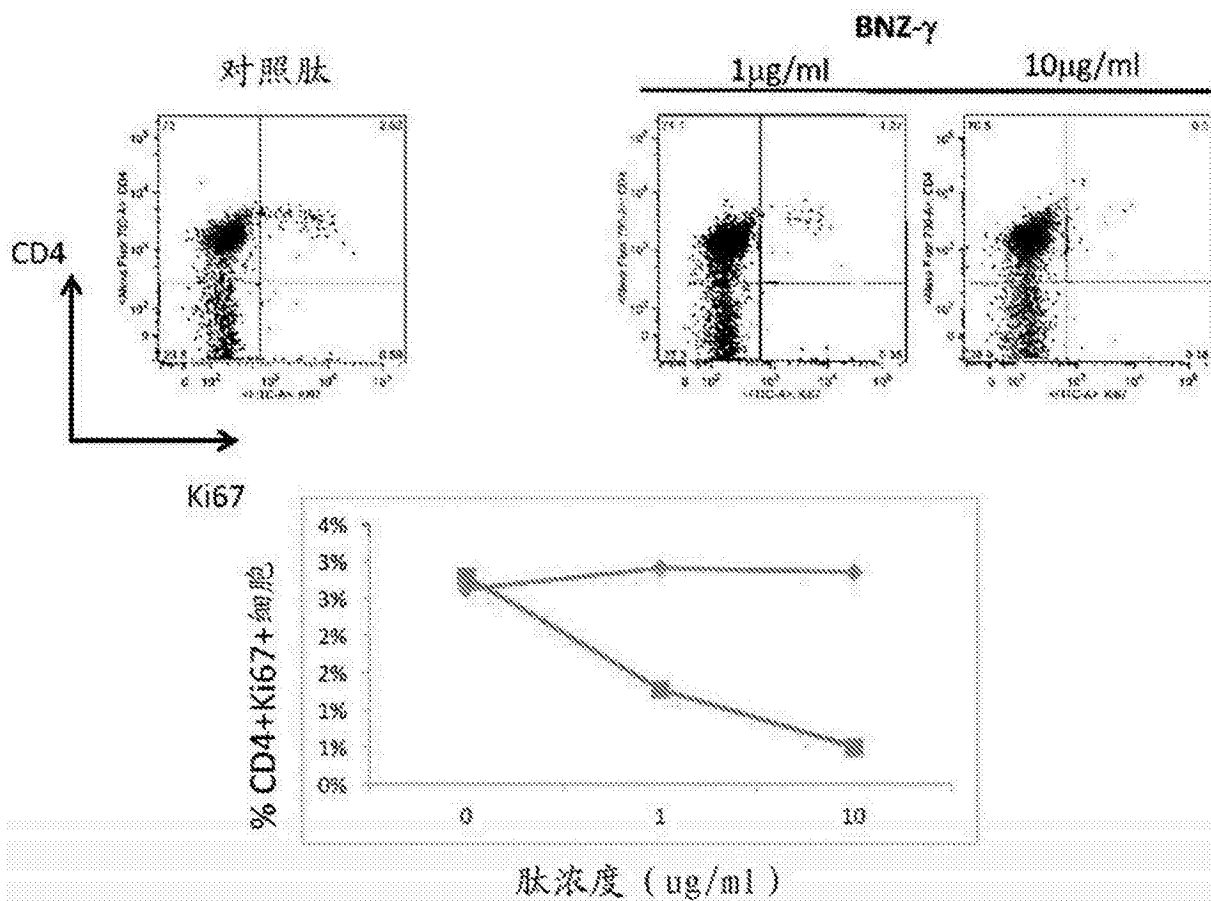


图4C

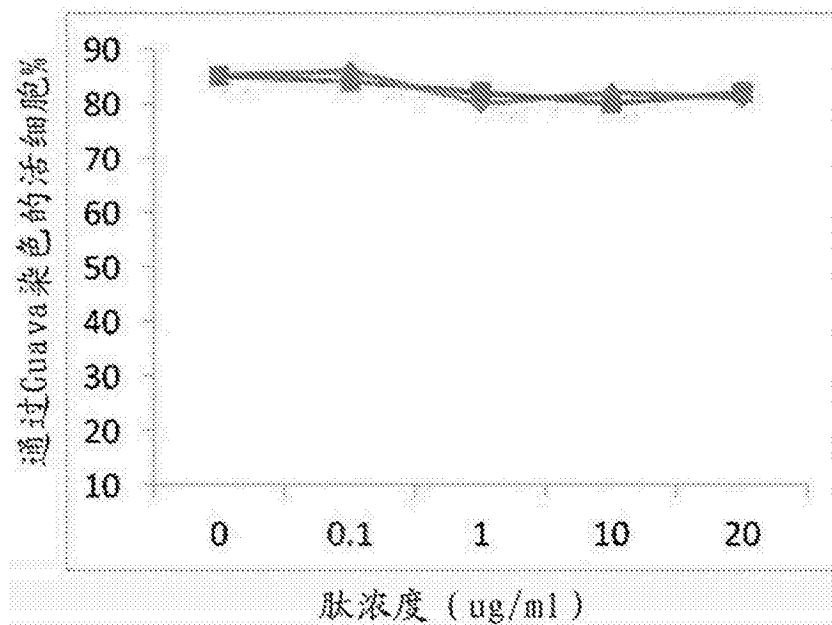


图4D