



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112368293 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 201980043872.7

(22) 申请日 2019.05.15

(30) 优先权数据

2018901672 2018.05.15 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2019/050462 2019.05.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/218015 EN 2019.11.21

(71) 申请人 英特肽治疗有限公司

地址 澳大利亚,新南威尔士

(72) 发明人 M·V·阿格雷

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 郝名悦 闫茂娟

(51) Int.Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

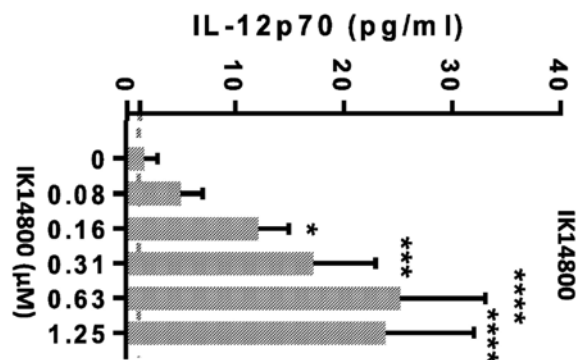
权利要求书5页 说明书88页 附图39页

(54) 发明名称

活化剂

(57) 摘要

本发明涉及用于活化Lck的组合物和方法,包括体内、体外和离体用途。



1. 一种用于活化Lck的肽,其中所述肽包含具有超过6个邻接阳离子氨基酸的Lck活化阳离子氨基酸序列。

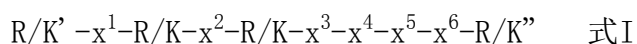
2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述阳离子氨基酸序列包含8至10个邻接阳离子氨基酸。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的肽,其中所述阳离子氨基酸独立地选自精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸组成的组。

4. 根据权利要求1所述的肽,其中所述阳离子氨基酸序列选自RRRRRRRR、rrrrrrrr、RRRRRRRR和rrrrrrrr组成的组。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的肽,其中所述肽由所述阳离子氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的肽,其中所述肽进一步包含式I的Lck活化多肽部分或其反向序列:



其中:

每个R/K独立地为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基;

R/K' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

R/K'' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

x^1 至 x^6 各自独立地为氨基酸;并且

其中氨基酸 x^3 至 x^6 集体地存在或不存在,并且当氨基酸 x^3 至 x^6 不存在时,R/K''不存在。

7. 根据权利要求6所述的肽,其中氨基酸 x^1 至 x^6 中的一者或多者为疏水性氨基酸。

8. 根据权利要求6或权利要求7所述的肽,其中所述Lck活化多肽部分与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的肽,其中所述肽氨基酸序列包含L氨基酸残基。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的肽,其中所述肽氨基酸序列包含D氨基酸残基。

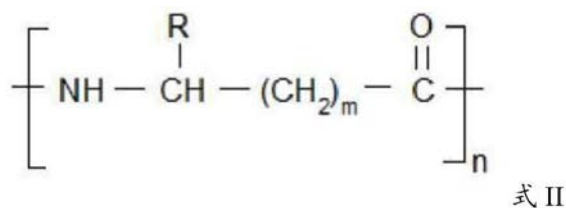
11. 根据权利要求1至8中任一项所述的肽,其中所述肽氨基酸序列选自以下组成的组:RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr、RSKAK-RRRRRRRRR、rrrrrrrrrr-ylpnkaksr、IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG、RRRRRRRRR-SKAKNPLYR、RRRRRRRRR-YLPNKAISR、RSKAKNPLY、RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、支化的<RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR、RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK、RVKVKVVVV-RRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR、RRRRRRRRR-RVKVKVVVV-R、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRH-HH、KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH和KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH。

12. 一种用于活化Lck的肽,其中所述肽包含氨基酸序列RSKAKNPLY-RRRRR或RSKAKNPLY-RRRRR。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列在所述肽的C-末端被酰胺化。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的肽,所述肽进一步包含与所述阳离子氨基酸序

列的N-末端或C-末端偶联的式II的化合物；



其中：

n为所述化合物的单体单元的数目并且是1至5的整数；

每个m独立地为0至18的整数；并且

每个R基团独立地为H或C₁至C₁₈侧链。

15. 根据权利要求14所述的肽，其中每个单体单元的R基团独立地为C₁至C₁₈侧链。

16. 根据权利要求15所述的肽，其中每个R基团的长度独立地为18-m个碳原子，其中m的值为0至17。

17. 根据权利要求1至13中任一项所述的肽，所述肽进一步包含与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联的化合物，其中所述化合物为至少一个脂肪酸。

18. 根据权利要求17所述的肽，其中至少四个脂肪酸与所述阳离子氨基酸序列的C-末端偶联。

19. 根据权利要求18所述的肽，其中最远端的脂肪酸被酰胺化。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的肽，其中多于一个脂肪酸的偶联是线性的。

21. 根据权利要求19所述的肽，其中多于一个脂肪酸的偶联是支化的。

22. 根据权利要求17至21中任一项所述的肽，其中所述脂肪酸是饱和的。

23. 根据权利要求17至22中任一项所述的肽，其中所述脂肪酸选自由羊油酸、羊脂酸、羊蜡酸(癸酸)和月桂酸(十二烷酸)组成的组。

24. 一种包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的肽：RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr。

25. 一种由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成的肽：RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr。

26. 一种药物组合物，所述药物组合物包含作为活性成分的根据权利要求1至25中任一项所述的肽以及药学上可接受的稀释剂或载剂。

27. 一种增加Lck激酶活性的方法，所述方法包括使Lck激酶与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

28. 一种增加Lck激酶的Y394磷酸化的方法，所述方法包括使Lck激酶与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

29. 一种增加细胞或细胞群体的IL-2分泌的方法，所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

20. 一种增加细胞上或细胞群体中的IL-2Ra (CD25) 表达的方法，所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

31. 一种增加细胞上或细胞群体中的IL-2RB (CD122) 表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

32. 一种增加细胞的或细胞群体中的IL-2反应性的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

33. 一种增加细胞上或细胞群体中的CD28表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

34. 一种增加细胞或细胞群体的IL-12分泌的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

35. 一种增加细胞上或细胞群体中的IL-12R表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述IL-12R为IL-12RB1和/或IL-12RB2。

37. 一种增加细胞的或细胞群体中的IL-12反应性的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

38. 一种增加细胞或细胞群体的IL-21分泌的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

39. 一种增加细胞或细胞群体的IL-15分泌的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

40. 一种增加细胞上或细胞群体中的IL-15R表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

41. 一种增加细胞的或细胞群体中的IL-15反应性的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

42. 一种增加细胞上或细胞群体中的IL-18R表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

43. 一种增加细胞的或细胞群体中的IL-18反应性的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

44. 一种增加细胞或细胞群体的细胞因子分泌的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组

合物接触。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述细胞因子为IFN γ 。

46. 一种诱导细胞或细胞群体的增殖的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

47. 一种增加细胞群体的增殖的方法, 所述方法包括使细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

48. 根据权利要求27至47中任一项所述的方法, 其中所述细胞是或者所述细胞群体包含选自自由以下组成的组的细胞: CD4+T细胞、CD8+T细胞、NK细胞或树突细胞。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述细胞是或者所述细胞群体包含原初细胞。

50. 一种增强T细胞功能的方法, 所述方法包括使T细胞或T细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

51. 一种增强细胞毒性细胞功能的方法, 所述方法包括使细胞毒性细胞或细胞毒性细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

52. 一种减少T细胞或T细胞群体的耗竭的方法, 所述方法包括使T细胞或T细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

53. 一种治疗氧化损伤的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

54. 一种降低细胞群体中Treg细胞的比例的方法, 所述方法包括使含Treg的细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述Treg细胞为Foxp3+Treg细胞。

56. 一种在检查点抑制剂存在的情况下增加CD25表达的方法, 所述方法包括使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触。

57. 根据权利要求26至56中任一项所述的方法, 其中所述接触是在体内或体外执行的。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述方法是离体执行的。

59. 一种细胞或细胞群体, 所述细胞或细胞群体源自通过使细胞或细胞群体与包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物接触获得的细胞或细胞群体。

60. 根据权利要求27所述的方法, 其中将所述肽或药物组合物施用于受试者以增加体内Lck的活性。

61. 一种增加受试者的Lck活性的方法, 所述方法包括向所述受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物。

62. 一种诱导受试者中的免疫反应的方法, 所述方法包括向所述受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物。

63. 一种治疗和/或预防与以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状相关的

至少一种症状的方法,所述方法包括向受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26的药物组合物。

64.根据权利要求62所述的方法,其中所述以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状选自自由以下组成的组:病原性感染、病原性感染引起的败血症(例如,慢性败血症)、免疫缺陷病症、免疫反应降低、T细胞计数降低、T细胞异常、T细胞耗竭和T细胞检查点阻断。

65.根据权利要求63或权利要求64所述的方法,其中所述疾病或病状是癌症。

66.一种对有需要的受试者进行疫苗接种的方法,所述方法包括将包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物与疫苗同时或依序施用给受试者。

67.一种治疗和/或预防有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括将包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物与检查点抑制剂同时或依序施用给受试者。

68.一种降低受试者中的免疫抑制的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物。

69.一种治疗和/或预防受试者的年龄相关性免疫功能障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物。

70.一种诱导受试者中的Th1反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽的组合物或根据权利要求26所述的药物组合物。

71.一种用于治疗 and/或预防与以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状相关的至少一种症状的剂量单位形式,所述剂量单位形式包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽。

72.一种用于癌症的防治治疗的剂量单位形式,所述剂量单位形式包含根据权利要求1至25中任一项所述的肽。

活化剂

技术领域

[0001] 本发明涉及Lck (淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶) 活性的刺激并且涉及用于防治或治疗各种疾病或病状的Lck活化剂。

背景技术

[0002] 在分子生物学中,CD4 (分化簇4) 是在免疫细胞 (诸如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞) 的表面发现的一种糖蛋白。CD4+T辅助细胞是白细胞,其是免疫系统的重要部分并且可将信号发送到其它免疫细胞 (诸如CD8杀伤细胞) 以破坏感染性颗粒。当T细胞受体 (TCR) 和共受体结合抗原肽:主要组织相容性复合物 (MHC) 时,T细胞被活化,这会导致TCR复合物聚集并触发细胞内级联反应。在T细胞活化中,共受体CD4和CD8分别与II类或I类MHC分子结合,增加了T细胞对抗原的敏感性。

[0003] Lck是Src家族激酶的成员并且对于T细胞效应子潜能 (即,发育中的胸腺细胞和成熟T细胞的增殖和分化以及有效的细胞因子转录) 的形成至关重要 (Lovatt M等人,Mol&Cell Biology,2006,26 (22):8655-8665)。

[0004] Lck对TCR的磷酸化通过创建结合位点来启动下游信号传导,所述结合位点将细胞溶质激酶ZAP70 (ζ链相关蛋白激酶70) 募集到细胞膜上 (Iwashima M等人,Science,1994,263:1136-1139)。更特别地,Lck受C-末端Src激酶 (Csk) 调节,该C-末端激酶使Tyr 505磷酸化,从而导致Lck失活,通过活性位点重新排列而激活Lck的激酶活性的Lck活化环Tyr 394的反式自体磷酸化,以及通过磷酸酶去磷酸化 (Fulop T等人,Longevity&Healthspan,2012,1:6)。

[0005] 在TCR刺激后,与CD4/CD8相关的Lck与TCR/CD3复合物接近,并且使CD3分子的基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM) 磷酸化。然后ZAP70激酶被募集到磷酸化的ITAM上,随后被Lck活化。这导致多个途径的活化,多个途径的活化最终导致T细胞活化和IL-2产生 (Wang G等人,BioMed Research International,2014,doi.org/10.1155/2014/682010)。

[0006] 另外,树突细胞 (DC) 介导的Lck活化导致“TCR许可”,这一过程极大地提高了TCR对同源肽-MHC II类抗原复合物的反应的敏感性和幅度 (Meraner P等人,2007,J Immunol,178 (4):2262-2271)。此类上皮内DETC细胞 (树突状表皮T细胞) 或γ/δT细胞在体内稳态、组织修复、炎症和防御恶性肿瘤方面起关键作用 (Witherden DA和Havran WL,J Leukoc Biol,2013,94 (1):69-76)。

发明内容

[0007] 在一个实施方案中,本发明提供了用于活化Lck的肽,其中所述肽包含具有超过6个邻接阳离子氨基酸的Lck活化阳离子氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述阳离子氨基酸序列包含8至10个邻接阳离子氨基酸。

[0008] 在另一个实施方案中,所述阳离子氨基酸独立地选自精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸组成的组。在另一个实施方案中,所述阳离子氨基酸序列选自RRRRRRRR、rrrrrrrr、

RRRRRRRR和rrrrrrrr组成的组。

[0009] 在另一个实施方案中,所述肽由所述阳离子氨基酸序列组成。

[0010] 在另一个实施方案中,所述肽进一步包含式I的Lck活化多肽部分或其反向序列:

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

[0012] 其中:

[0013] 每个R/K独立地为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基;

[0014] R/K' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

[0015] R/K'' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

[0016] x^1 至 x^6 各自独立地为氨基酸;并且

[0017] 其中氨基酸 x^3 至 x^6 集体地存在或不存在,并且当氨基酸 x^3 至 x^6 不存在时,R/K'' 不存在。

[0018] 在另一个实施方案中,氨基酸 x^1 至 x^6 中的一者或多者为疏水性氨基酸。

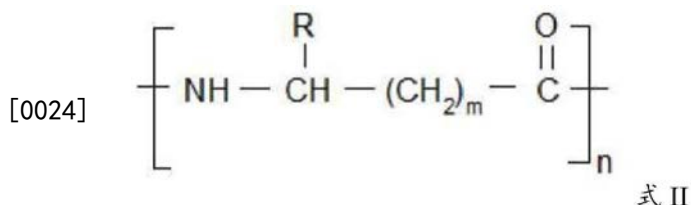
[0019] 在另一个实施方案中,所述Lck活化多肽部分与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联。

[0020] 在另一个实施方案中,所述肽氨基酸序列包含L氨基酸残基。在另一个实施方案中,所述肽氨基酸序列包含D氨基酸残基。

[0021] 在另一个实施方案中,所述肽氨基酸序列选自由以下组成的组: RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr、RSKAK-RRRRRRRRR、r r r r r r r rr-ylpnkaksr、IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG、RRRRRRRRR-SKAKNPLYR、RRRRRRRRR-YLPNKA KS R、RSKAKNPLY、RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、支化的<RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR、RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK、RVKVKVVVV-RRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR、RRRRRRRRR-RVKVKVVVV-R、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH、KEKLNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH和KEKLNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH。在另一个实施方案中,所述肽包含氨基酸序列RSKAKNPLY-RRRRR或RSKAKNPLY-RRRRR。

[0022] 在另一个实施方案中,所述氨基酸序列在所述肽的C-末端被酰胺化。

[0023] 在另一个实施方案中,用于活化Lck的肽进一步包含与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联的式II的化合物;



[0025] 其中:

[0026] n为所述化合物的单体单元的数目并且是1至5的整数;

[0027] 每个m独立地为0至18的整数;并且

- [0028] 每个R基团独立地为H或C₁至C₁₈侧链。
- [0029] 在另一个实施方案中,每个单体单元的R基团独立地为C₁至C₁₈侧链。在另一个实施方案中,每个R基团的长度独立地为18-m个碳原子,其中m的值为0至17。
- [0030] 在另一个实施方案中,用于活化Lck的肽进一步包含与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联的化合物,其中所述化合物为至少一个脂肪酸。在另一个实施方案中,至少四个脂肪酸与所述阳离子氨基酸序列的C-末端偶联。
- [0031] 在另一个实施方案中,最远端的脂肪酸被酰胺化。
- [0032] 在另一个实施方案中,多于一个脂肪酸的偶联是线性的。在另一个实施方案中,多于一个脂肪酸的偶联是支化的。
- [0033] 在另一个实施方案中,所述脂肪酸是饱和的。
- [0034] 在另一个实施方案中,所述脂肪酸选自由羊油酸(caproic acid)、羊脂酸(caprylic acid)、羊蜡酸(capric acid)(癸酸)和月桂酸(十二烷酸)组成的组。
- [0035] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的肽:RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr。
- [0036] 在另一个实施方案中,本发明提供了由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成的肽:RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrr、RVKVKVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvrrrrrrrrr。
- [0037] 在另一个实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分的如本文所述的用于活化Lck的肽以及药学上可接受的稀释剂或载剂。
- [0038] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加Lck激酶活性的方法,所述方法包括使Lck激酶与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0039] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加Lck激酶的Y394磷酸化的方法,所述方法包括使Lck激酶与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0040] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-2分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0041] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-2Ra (CD25) 表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0042] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-2RB (CD122) 表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0043] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的或细胞群体中的IL-2反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。
- [0044] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的CD28表达的方

法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0045] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-12分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-12R表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0047] 在另一个实施方案中,IL-12R为IL-12RB1和/或IL-12RB2。

[0048] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的或细胞群体中的IL-12反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0049] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-21分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0050] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-15分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0051] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-15R表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0052] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的或细胞群体中的IL-15反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0053] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-18R表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0054] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的或细胞群体中的IL-18反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0055] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的细胞因子分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0056] 在另一个实施方案中,所述细胞因子为IFN γ 。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明提供了诱导细胞或细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0058] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化

Lck的肽的药物组合物接触。

[0059] 在另一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的方法,其中所述细胞是或者所述细胞群体包含选自以下组成的组的细胞:CD4+T细胞、CD8+T细胞、NK细胞或树突细胞。

[0060] 在另一个实施方案中,所述细胞是或者所述细胞群体包含原初细胞。

[0061] 在另一个实施方案中,本发明提供了增强T细胞功能的方法,所述方法包括使T细胞或T细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明提供了增强细胞毒性细胞功能的方法,所述方法包括使细胞毒性细胞或细胞毒性细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0063] 在另一个实施方案中,本发明提供了减少T细胞或T细胞群体的耗竭的方法,所述方法包括使T细胞或T细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0064] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗氧化损伤的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0065] 在另一个实施方案中,本发明提供了降低细胞群体中Treg细胞的比例的方法,所述方法包括使含Treg的细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0066] 在另一个实施例中,所述Treg细胞为Foxp3+Treg细胞。

[0067] 在另一个实施方案中,本发明提供了在检查点抑制剂存在的情况下增加CD25表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触。

[0068] 在另一个实施方案中,所述接触是在体内或体外执行的。

[0069] 在另一个实施方案中,所述方法是离体执行的。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明提供了细胞或细胞群体,所述细胞或细胞群体源自通过使细胞或细胞群体与包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物接触而获得的细胞或细胞群体。

[0071] 在另一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的方法,其中将所述肽或药物组合物施用于受试者以增加体内Lck的活性。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加受试者的Lck活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0073] 在另一个实施方案中,本发明提供了诱导受试者中的免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0074] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防与以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状相关的至少一种症状的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合

物。

[0075] 在另一个实施方案中,本发明提供了本文所述的方法,其中以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病症选自以下组成的组:病原性感染、病原性感染引起的败血症(例如,慢性败血症)、免疫缺陷病症、免疫反应降低、T细胞计数降低、T细胞异常、T细胞耗竭和T细胞检查点阻断。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的方法,其中所述疾病或病状为癌症。

[0077] 在另一个实施方案中,本发明提供了对有需要的受试者进行疫苗接种的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0079] 在另一个实施方案中,本发明提供了降低受试者中的免疫抑制的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0080] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防受试者的年龄相关性免疫功能障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明提供了诱导受试者中的Th1反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的用于活化Lck的肽的组合物或如本文所述的包含用于活化Lck的肽的药物组合物。

[0082] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗和/或预防与以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状相关的至少一种症状的剂量单位形式,所述剂量单位形式包含如本文所述的肽。

[0083] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于癌症的防治治疗的剂量单位形式,所述剂量单位形式包含如本文所述的肽。

[0084] 在整个说明书中,词语“包含(comprise)”或诸如“包括(comprises)”或“含有(comprising)”的变型将被理解为暗示包括所陈述的要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组,但不排除任何其它要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组。

附图说明

[0085] 图1示出了体外多肽对Lck的活化。

[0086] 图2示出了相较于其它SFK而言的Lck的选择性活化。

[0087] 图3显示Lck活化聚精氨酸多肽增加Lck磷酸化并且Lck活化聚精氨酸多肽增加Lck在Y394处的磷酸化。A:显影的蛋白质印迹(Western blot)照片,其显示了用抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行探测的结果。随着肽活性物RRRRRRRR(“8Arg”;泳道8(10 μ M)与泳道7(1 μ M)相比)和RRRRRRRRRR(“10Arg”;泳道6(10 μ M)与泳道5(1 μ M)相比)的浓度增加,Lck酶的磷酸化水平升高。B:显影的蛋白质印迹照片,其显示了在用抗pY394抗体探测后,8Arg和10Arg肽诱

导的Lck在酪氨酸Y394处的自体磷酸化。自体磷酸化增加与8Arg (泳道7-8) 和10Arg (泳道5-6) 多肽的浓度增加相关。

[0088] 图4示出了多肽在体外对Lck的活化。

[0089] 图5示出了多肽在体外对Lck的活化。

[0090] 图6示出了当Lck与多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (“IK14804”) 接触时Lck活性的剂量依赖性活化。

[0091] 图7显示Lck活化多肽RRRRRRRRR (IK00900”) 相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导IL-2分泌。A:通过将野生型Jurkat细胞(永生化人T淋巴细胞系) 在抗CD28抗体和抗生物素蛋白(avidin) 的存在下暴露于生物素化抗CD3抗体中来对该野生型Jurkat细胞刺激。在培养期(48小时或72小时) 内,将细胞暴露于试验多肽中。在48小时或72小时结束时,如上所述地使用标准的可商购ELISA试剂盒测定细胞上清液中的IL-2。B:暴露72小时后,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导IL-2分泌。

[0092] 图8显示Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 相对于对照在分离的人CD4⁺和CD8⁺T细胞中诱导IL-2分泌。抗CD3和抗CD28刺激48小时后,Lck活化肽对分离的CD4⁺和CD8⁺T细胞(从健康的人PBMC中免疫磁化分离) 的IL-2产量的影响。数据呈现为来自3个供体的平均值 $\pm$ SEM,每一者均针对媒介物对照作归一化。使用双因素方差分析(two-way ANOVA) 和Dunnett事后检验进行统计比较,将试验肽的每种浓度与0.08 μ M进行比较(* p <0.05,*** p <0.001,**** p <0.0001)。虚线表示归一化数据的媒介物对照值。

[0093] 图9显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (“IK15800”) 和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (即rvkvvvvv-rrrrrrrrrr; “IKD15800”) 相对于对照在分离的人T细胞中诱导IL-2分泌。简言之,将分离的T细胞(CD3⁺) 用抗CD3抗CD28 DynabeadsTM刺激,并且与5个浓度的范围内的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (“IK15800”) 和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (“IKD15800”) 加上媒介物对照(0-1.25 μ M) 一起培养72小时,之后收集上清液并通过ELISA评估上清液中的IL-2。呈现的数据示出了平均IL-2pg/ml和倍数变化(针对媒介物归一化) $\pm$ SEM,n=4。通过RM双因素方差分析与Dunnett事后检验来分析数据,将每种肽浓度与媒介物进行比较或者将经归一化的试验浓度与最低试验浓度进行比较,* p <0.05,** p <0.01,*** p <0.001,**** p <0.0001。虚线表示归一化数据的媒介物对照值(右)。

[0094] 图10显示当将受刺激细胞暴露于肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14900”)、HHHHH-RSKSKNPLY-RRRRRRRRR (“IK11480”)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (“IK14820”) 以及尤其是肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 中时IL-2R α (CD25) 的表达增加。将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积) 并用PMA (50ng/mL) 和罗奴霉素(1 μ g/mL) 刺激。然后用所指示的肽处理细胞,然后将其在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。然后分析上清液(100 μ L,n=3) 的IL-12R α 含量。

[0095] 图11显示,相对于IK14000 (对照),在用Lck活化融合多肽IK14800 (RSKAKNPLY-RRRRRRRRR) 和IKD14800 (rskaknply-rrrrrrrrrr) 再刺激后耗竭的CD4⁺T细胞中CD25的表达增加。培养72小时后对细胞染色进行流式细胞术检查以评估CD25 (MFI,顶部,表示表达水平和频率,底部)。从能存活群体中,对细胞进行设门以聚焦于CD4⁺细胞,然后对CD4⁺细胞进行

设门以聚焦于CD25+群体。数据呈现为来自4个生物学重复样品的平均值 $\pm$ sem,左侧为绝对值,右侧为针对媒介物归一化的值。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。使用双因素方差分析和Dunnett事后检验将每种试验浓度下的每种肽与对照肽(IK14000)进行比较。

[0096] 图12显示RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH₂ (IK14800)的添加挽救了由PD-1/PD-L1相互作用诱导的IL-2R α 的抑制。简言之,通过将Jurkat细胞暴露于培养皿粘附的抗CD3抗体中对该Jurkat细胞进行活化,以诱导程序性细胞死亡受体1 (PD-1) 的细胞表面表达,并且将该Jurkat细胞在不存在添加剂的情况下或者与单独的肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH₂ (2.5 μ M的IK14800)、单独的5 μ g/ml重组PD-L1 (PD-1的配体) 一起培养48小时以诱导细胞中的检查点阻断,或者与IK14800肽加上重组PD-L1一起培养。借助于如上所述的标准可商购ELISA试剂盒测量细胞裂解物中的IL-2R α (CD25)。

[0097] 图13显示当用抗CD3刺激时,CD4+和CD8+T细胞中的IL2R α (CD25) 的表达增加。来自受刺激PBMC的CD4+ (左) 和CD8+ (右) 细胞中的CD25表达。将新分离的PBMC在所指示浓度 (μ M) 的试验肽IK14800的存在下用或不用 (-aCD3) 抗CD3 (1 μ g/mL) 刺激24小时。数据呈现为来自4个供体的平均值 $\pm$ SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$,使用双因素方差分析和Dunnett事后检验来将多种浓度的每种肽 (或未受刺激的细胞) 与媒介物 (0) 进行比较。

[0098] 图14显示Lck活化多肽增加人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系中的IL-12分泌。A. 将细胞按每孔100万个细胞接种 (12孔板,2mL体积) 并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白 (5:5:1.25 μ g) 刺激。然后用肽IK14800处理细胞,然后将其在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。然后分析上清液 (100 μ l,n=3) 的IL12含量。图14B显示,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 相对于对照在Jurkat细胞中诱导IL-12分泌的能力依赖于Lck。该数据证明由Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 引起的人T细胞系中的IL-12分泌依赖于Lck。将细胞按每孔100万个细胞接种 (12孔板,2mL体积) 并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白 (5:5:1.25 μ g) 刺激。然后用肽IK14800处理细胞,然后将其在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。然后分析上清液 (100 μ l,n=3) 的IL-12含量。

[0099] 图15显示相对于在存在抑制IL-12产生的抗CD40L封闭抗体的情况下的经抗CD3刺激的PBMC,Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR和仅包含D氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (rskaknply-rrrrrrrrrr) 诱导经抗CD3刺激的PBMC中的IL-12分泌。相对于在抗CD40L封闭抗体存在的情况下的经抗CD3刺激的PBMC,Lck活化聚精氨酸多肽RRRRRRRRR也诱导经抗CD3刺激的PBMC中的IL-12分泌。在抗CD40L封闭抗体存在或不存在的条件下,将经抗CD3刺激的PBMC与IK14800、IKD14800、IK15800和IKD15800一起培养24小时。通过ELISA评估上清液的IL-12p70水平。所示数据表示平均IL-12p70 pg/mL值 $\pm$ SEM,n=4。通过双因素方差分析与Sidak事后检验分析数据,比较单独的肽处理与肽+抗CD40L, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。虚线表示平均媒介物对照。

[0100] 图16显示在24小时,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 相对于对照诱导IL-12p70分泌。将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围 (0-1.25 μ M) 内的肽一起培养24小时,之后收集上清液并通过ELISA分析上清液中的IL-12p70。呈现的数据表示响应于肽处理的平均细胞因子产量 (pg/mL), $\pm$ SEM,n=4。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据, $*P<0.05$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的PBMC的平均表

达。

[0101] 图17显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导NK细胞 ($CD3^{neg} CD56^{+}$ 细胞) 群体中的IL-12R β 2表达。将经抗CD3刺激的PBMC与0.16 μ M的IK14800加上媒介物对照(0)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估 $CD3^{neg} CD56^{+}$ NK细胞的IL-12R β 2表达。呈现的数据表示响应于肽处理的平均的相应的IL-12R β 2表达 ($CD3^{neg} CD56^{+}$ NK细胞的百分比)。

[0102] 图18显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 相对于未受刺激的CD4+T细胞诱导IFN- γ 分泌。将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与5个浓度的范围内的IK14800加上媒介物对照(0-1.25 μ M)一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。呈现的数据表示响应于肽处理的平均的相应IFN- γ (如针对媒介物归一化的pg/ml值), +/-SEM, n=4。通过RM双因素方差分析与Dunnett事后检验分析数据,将IK14800浓度与媒介物进行比较或者在归一化的情况下与最低肽浓度进行比较, **p<0.01, ***p<0.001。

[0103] 图19显示仅包含D氨基酸的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IKD14800) 相对于未受刺激的CD8+T细胞诱导受刺激的人CD8+T细胞的IFN- γ 分泌。将分离的CD8+T细胞与抗CD3抗CD28包被的戴诺磁珠(dynabead) (细胞:珠粒比为4:1) 刺激物一起在5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内的IKD14800存在下培养。24小时后,对上清液取样并通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。呈现的数据表示CD8+T细胞群体中的平均IFN- γ 产量(pg/ml), +/-SEM, n=4。数据也针对媒介物对照作归一化并且表示为平均倍数变化, n=3。通过RM单因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。显著差异指示在相应肽浓度与媒介物对照之间作出的比较,或者在数据归一化的情况下与最低肽浓度(0.08 μ M)的比较。

[0104] 图20显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR增加人CD8+T细胞的增殖群体。将分离的CD8+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与5个浓度的范围内的IK14800加上媒介物对照(0-1.25 μ M)一起培养24小时,之后通过流式细胞术评估CD8+T细胞的Ki67表达。呈现的数据表示响应于肽处理的平均的相应Ki67 (MFI), +/-SEM, n=4。通过RM双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据,将肽浓度与媒介物进行比较, ****p<0.0001。虚线表示未受刺激的对照平均值。

[0105] 图21显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 增加人CD8+T细胞的增殖群体。在受刺激PBMC测定中CD8+T细胞中的响应于IK15800的Ki67(增殖)表达。将抗CD3刺激的PBMC与5个浓度的范围内的IKD15800加上媒介物对照(0-1.25 μ M)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD8+T细胞的Ki67表达。呈现的数据表示响应于肽处理的平均的相应表达(MFI), +/-SEM, n=3。通过RM双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据,将每种肽浓度与媒介物进行比较, **P<0.01。虚线表示未受刺激的对照平均值。

[0106] 图22显示,Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 相对于无肽对照诱导CD4+和CD8+T细胞中的CD28表达。A. 将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内测试的IK14800一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD28表达。数据指示响应于肽处理的CD8+T细胞群体中的平均相应表达, +/-SEM, n=4。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据。*p<0.05, ***P<0.001。虚线指示未受刺激的细胞。B. 将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围

(0-1.25 μ M)内测试的试验肽一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD28表达。呈现的数据表示响应于肽处理的CD4+T细胞群体中的平均相应表达, $\pm$ SEM, $n=4$ 。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****p<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的细胞。

[0107] 图23A显示Lck活化多肽增加受刺激的人CD8+T细胞上的IL-15R表达及所述受刺激的人CD8+T细胞的IL-15分泌。A. 将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD215 (IL-15R) 表达。呈现的数据表示响应于无肽处理的CD8+T细胞群体中的平均相应表达, $\pm$ SEM, $n=4$ 。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。虚线表示未受刺激的PBMC的表达。B. 将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)一起培养。收集上清液并通过ELISA评估上清液中的IL-15, $n=3$ $\pm$ SEM。虚线表示未受刺激的PBMC的表达。 $*p<0.05$, 通过T检验将1.25 μ M与0肽进行比较。C. 将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD215 (IL-15R) 表达。呈现的数据表示响应于无肽处理的CD8+T细胞群体中的平均相应表达, $\pm$ SEM, $n=4$ 。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的PBMC的表达。

[0108] 图24显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK4800) 增加人CD28+/CD8+T细胞的增殖群体。将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 刺激物和5个浓度的范围(0-1.25 μ M)内测试的肽IK15800和IK14800一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的Ki67。呈现的数据表示响应于肽处理的CD8+T细胞的CD28+亚群中的平均Ki67 (增殖指示剂) 表达, $\pm$ SEM, $n=4$ 。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据。 $*p<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的细胞。

[0109] 图25显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 诱导CD4+和CD8+T细胞中的IL-12R β 2表达。将分离的T细胞(CD3+)用抗CD3抗CD28 DynabeadsTM刺激并且与5个浓度的范围内的IK14800加上媒介物对照(0-1.25 μ M)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD4+和CD8+T细胞的IL-12R β 2表达。呈现的数据表示响应于肽处理的平均IL-12R β 2表达(CD4+或CD8+T细胞的%), $\pm$ SEM, $n=4$ 。通过RM双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据,将每种肽浓度与媒介物进行比较, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的对照平均值。

[0110] 图26显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导CD3^{neg}CD56⁺/dim NK细胞中的IL-2R β 表达。将来自健康供体的PBMC用抗CD3 (1 μ g/mL) 在试验肽(0.08-1.25 μ M)或媒介物对照的存在下刺激72小时。在培养期结束时,收集细胞并通过流式细胞术对该细胞进行CD3^{neg}CD56⁺/dim NK细胞内的IL-2R β (CD122) 表达评估。数据显示为平均IL-2R β (CD122) 表达(%阳性细胞或MFI) $\pm$ SEM, $n=4$ 。使用重复测量双因素方差分析和Holm-Sidak多重比较事后检验分析数据,将试验物质与媒介物对照进行比较, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。蓝色虚线表示未受刺激的样品中的平均表达。

[0111] 图27显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 诱导PBMC内的CD8+细胞群体的扩增。将来自健康供体的PBMC在IK15800 (0.08-1.25 μ M)或媒介物对照的存在下经由

TCR+IL-2刺激10天。在培养期结束时,收集细胞并通过流式细胞术评估该细胞中的CD8+细胞比例。数据显示为平均百分比表达 $\pm$ SEM, $n=4$ 。使用重复测量双因素方差分析和Holm-Sidak多重比较事后检验分析数据,将试验物质与媒介物对照进行比较, $*p<0.05$, $***p<0.0001$ 。虚线表示未受刺激的样品中的平均表达。

[0112] 图28显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导CD4+T细胞产生IL-21。分离CD4+T细胞并且将其在抗CD3抗CD28刺激物和IK14800的存在下培养48小时。在培养结束时,通过ELISA评估上清液中的IL-21。所示数据表示培养48小时后的IL-21产量 (pg/mL) (左) $\pm$ SEM, $n=1$ 。仅在来自一个供体的上清液中检测到细胞因子(因此无统计计算)。对照(右)显示IL-6增进IL-21分泌。

[0113] 图29显示当在抗原刺激之前施用Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 在随后的抗原刺激后增加人T细胞系的IL-2产量。将500万个细胞接种在T25烧瓶中并且用如上表所指示的不同浓度的14800处理1小时,之后将细胞悬浮液离心并用新鲜培养基洗涤两次。将生物素-抗CD3和抗生物素蛋白 (5:1.25ug) 在500uL培养基中的混合物添加到12孔板的孔中。10分钟后,按每孔100万个接种细胞并且用培养基使细胞悬浮液达到2mL的体积。随后进一步用抗CD28 (5ug/mL) 刺激样品,将其在37℃下孵育48小时,然后分析上清液 (100uL, $n=3$) 的IL2含量。

[0114] 图30显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中表达CD28的CD4+T细胞的百分比,以及CD4+T细胞上的CD28相对表达。数据显示与对照样品(媒介物)相比,如通过流式细胞术测量的被确定为呈CD28阳性的CD4+T细胞的比例(左)和CD4+T细胞上CD28的几何平均值(右)。如通过双尾t检验所确定的, $***p<0.001$, $****p<0.0001$

[0115] 图31显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中表达CD28和CD215的CD8+T细胞的百分比。如通过双尾t检验所确定的, $**p<0.01$, $***p<0.001$

[0116] 图32显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中NK细胞上的pSTAT4表达。数据显示如通过双尾t检验所确定的 ($**p<0.01$), 如通过流式细胞术测量的NK细胞上的pSTAT4的几何平均值。

[0117] 图33显示多肽DDDDDDDD没有增加Lck的活性。

[0118] 图34显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR相对于对照在Jurkat细胞中诱导IL-2分泌的能力依赖于Lck。该数据证明由Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR引起的人T细胞系中的IL-2分泌依赖于Lck。将Jurkat细胞(野生型和Lck缺陷型)用在PBS中制备的200uL的CD3/CD28 (各5ug/ml) 在37℃下刺激1小时。将细胞按每孔100万个接种并用IK14800处理。

[0119] 图35显示由用Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 处理而引起的IL-2产量增加在不存在抗原刺激的情况下没有发生。简言之,用在PBS (200uL) 中制成的抗CD3 (5ug/mL) 溶液包被12孔板并且将其在37℃下孵育过夜。然后抽吸抗CD3溶液并且将孔用培养基 (1mL, 10分钟) 轻轻洗涤两次。将Jurkat细胞按每孔100万个接种,进一步用抗CD28 (5ug/mL) 刺激,然后在零时用RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) (2.5uM) 处理。将细胞孵育72小时,然后通过ELISA分析上清液中的IL-2。

[0120] 图36显示RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)的腹膜内施用减小Lewis肺癌(LCC)模型中的肿瘤面积。在雌性C57黑小鼠中,在接种(1×10^6 个细胞)后第10天开始经腹膜内施用RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (200 μ g),每周两次,持续两周,每个组群 $n=8$,之后对H&E切片进行肿瘤浸润证据的评估并且将肿瘤质量按占健康肺组织的百分比来计算。数据点显示每个样品中肿块的平均面积。 $**p<0.005$,未配对t检验。

[0121] 图37显示与脂肪酸偶联的Lck活化多肽增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-2分泌。将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积)并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白(5:5:1.25 μ g)刺激。然后将细胞用RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK14804)处理,然后在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。然后分析上清液(100 μ L, $n=3$)的IL-2含量。

[0122] 图38显示与脂肪酸偶联的Lck活化多肽增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌。将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积)并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白(5:5:1.25 μ g)刺激。然后用RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK14804)和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK15804)处理细胞。然后在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞48小时。然后分析上清液(100 μ L, $n=3$)的IL-12含量。

[0123] 图39显示Lck活化多肽抑制细胞膜中的脂质过氧化。[#=硫醇氧化还原态]。单因素方差分析和Tukey多重比较检验, $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。与较低的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)剂量相比,在不存在治疗剂的情况下虚假照射与紫外线照射之间的TRS显著差异未存在最高浓度(5 μ M)的125D或RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)的情况下观察到。

[0124] 图40显示RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)相对于无肽对照增加通过抗pY394抗体检测到的Lck在Y394处的磷酸化,而总的Lck水平保持不变。

[0125] 图41A显示多肽RSKAKNPLYR (“IK14000”)和RSKAKNPLY (“IK94000”)增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-2分泌。图41B显示rskaknply (“IKD94000”,而RSKAKNPLYR (“IK14000”未能)增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌。

具体实施方式

[0126] 在哺乳动物中非受体Src激酶家族(SKF)的成员包括以下八种激酶:Src、Fyn、Yes、Fgr、Lyn、Hck、Lck和Blk,而尚未鉴定出选择性Lck活化剂(Bae 0-N等人,Journal of Neuroscience,2012,32(21):7278-7286)。

[0127] 本发明部分涉及以下发现:如本文所述的包含超过6个或更多个邻接阳离子氨基酸的聚阳离子肽可刺激Lck的活性。在至少一些实施方案中,根据本发明的Lck活化剂仅可以刺激SKF成员当中的Lck的活化。对Lck活化剂,尤其是特定的Lck活化剂的需求与宽范围的可能与年龄相关或与年龄无关的病状有关。

[0128] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于活化Lck的肽,其中所述肽包含具有超过6个邻接阳离子氨基酸的Lck活化阳离子氨基酸序列。

[0129] 如本文所用,术语“活化”一般是指增加至少一种靶蛋白的活性。在激酶的特定背景下,这种活化导致至少一种靶底物或位点的磷酸化增加。这种活化可以通过任何方式引起,所述方式包括(但不限于)增加蛋白激酶与蛋白激酶结合伴侣之间形成复合物的可能性,或增加一旦结合至其靶标时的激酶活性。此类活化可以在体内或体外发生。

[0130] 如本文所用,“用于活化Lck的肽”与“Lck活化多肽”或“Lck活化剂”可互换使用。

[0131] Lck也称为:LCK原癌基因、白细胞C-末端Src激酶;淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶;蛋白质YT16;原癌基因Lck;T细胞特异性蛋白酪氨酸激酶;和p56-LCK。

[0132] 人类中Lck的基因和蛋白质序列可从HUGO基因命名委员会(HGNC) (<http://www.genenames.org/>) 获得。下表1列出了人类中Src(和剪接变体)的HGNC参考编号,以及GenBank登录号和GeneID。

[0133] 表1

[0134]

HGNC 基因编号	GenBank 登录号 (氨基酸)	GenBank 登录号(核苷酸)	UniProt 参考	基因标识符
HGNC: 6524	NP_001036236.1	NM_001042771.2	P06239	HGNC:6524
	(同种型 a/变体 1)	(同种型 a/变体 1)		
	NP_005347.3	NM_005356.5		
	(同种型 a/变体 2)	(同种型 a/变体 2)		
	NP_001317397.1	NM_001330468.1		
	(同种型 b)	(同种型 b)		

[0135] Lck具有许多活性。Lck在其正调节位点Tyr 394处自体磷酸化,并且使包括CD3受体、CEACAM1、ZAP-70、SLP-76、IL-2受体、蛋白激酶C、ITK、PLC、SHC、RasGAP、Cbl、Vav1和PI3K在内的许多蛋白质磷酸化。已证实Lck与ADAM15、CD2、CD44、CD4、COUP-TFII、DLG1、NOTCH1、PIK3CA、PTPN6、PTPRC、UNC119、SYK、UBE3A和ZAP70相互作用。

[0136] 本发明人已经证明本文所述的活化剂可以增加Lck的活性,所述Lck的活性包括Lck在Y394处的磷酸化,以及增加的IL-2的产生。

[0137] 因此,如本文所用,术语“Lck的活性”包括Lck在Y394处的磷酸化,IL-2的产生,CD3受体、CEACAM1、ZAP-70、SLP-76、IL-2受体、蛋白激酶C、ITK、PLC、SHC、RasGAP、Cbl、Vav1和/或PI3K的磷酸化;与ADAM15、CD2、CD44、CD4、COUP-TFII、DLG1、NOTCH1、PIK3CA、PTPN6、PTPRC、UNC119、SYK、UBE3A和/或ZAP70的相互作用,和/或TCR的磷酸化。

[0138] 通常,聚阳离子肽的长度为7至约35个氨基酸。因此,聚阳离子肽的长度可以是,例如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或35个氨基酸。通常,聚阳离子肽的长度长达约25个氨基酸,并且更通常地,长度长达

约24、23、22、21、20、19、18、17或16个氨基酸。

[0139] 通常,聚阳离子肽的所有氨基酸均为阳离子氨基酸残基。然而,本发明还明确提供了包含如上所述彼此邻接的阳离子氨基酸和一个或多个非阳离子氨基酸残基的聚阳离子肽。通常在此类实施方案中,构成聚阳离子肽的氨基酸中的至少50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多或95%或更多是阳离子肽。此类聚阳离子肽的实例可包括穿插着一个或多个非阳离子氨基酸的阳离子氨基酸,并且/或者例如包括相应的N-末端和/或C-末端非阳离子氨基酸或氨基酸序列,并且所有此类聚阳离子肽都明确地涵盖在本文中。

[0140] 如本文所述的聚阳离子肽(PP)通常包含至少7个邻接阳离子氨基酸,更通常地,至少8、9或10个邻接阳离子氨基酸。

[0141] 在特别优选的实施方案中,聚阳离子肽通常包含8至16个邻接阳离子氨基酸,更通常地8至12个邻接阳离子氨基酸,最通常地8至10个邻接阳离子氨基酸。

[0142] 构成聚阳离子肽的阳离子氨基酸可独立地选自精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)和鸟氨酸氨基酸残基组成的组。

[0143] 可以采用阳离子氨基酸残基的各种序列组合。例如,聚阳离子肽可以包含从聚阳离子肽的N-末端开始的精氨酸氨基酸(例如7、8、9、10、11、12个或更多个精氨酸残基)的线性氨基序列,该线性氨基序列的后面是非精氨酸阳离子氨基酸(例如组氨酸或赖氨酸残基)的序列,或者反之亦然。在此类实施方案中,非精氨酸氨基酸的序列的长度通常长达约16个氨基酸(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸),并且所有此类聚阳离子肽的用途都明确涵盖在本文中。

[0144] 在其它实施方案中,阳离子氨基酸可以以交替的一系列阳离子肽的“偶联体(couplet)”或“三联体(triplet)”诸如精氨酸和非精氨酸氨基酸的偶联体或三联体(例如,RH偶联体),或可替代地,其中偶联体中的氨基酸位置颠倒的偶联体或三联体(例如,HR偶联体)排列。同样地,聚阳离子肽可包含一系列不同的阳离子氨基酸的偶联体或三联体(例如,RH偶联体或HR偶联体)的组合,所述偶联体或三联体的后面和/或前面是相应的此外的阳离子氨基酸或阳离子氨基酸序列(例如,组氨酸或聚组氨酸序列),其通常为最多约16个氨基酸(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸)。如可以理解的,术语“偶联体”意指两个连续的氨基酸。同样,术语“三联体”意指三个连续的氨基酸。在具有重复的阳离子氨基酸偶联体(例如RH或HR)的至少一些聚阳离子肽中,聚阳离子肽可以以一个或多个此外的相应阳离子氨基酸残基的至少一个偶联体或三联体(例如,HH、RR、KK、HHH、RRR、KKK、HHHH、RRRR、KKKK等)开始和/或终止。

[0145] 根据本发明的Lck活化剂的聚阳离子肽可以例如选自以下非限制性实例:RRRRRRR(7Arg)、RRRRRRRR(8Arg)、RRRRRRRRR(9Arg)、RRRRRRRRRR(10Arg)、RRRRRRRRRRR(11Arg)、RRRRRRRRRRRR(12Arg)、RRRRRRRRRRRRR(13Arg)、RRRRRRRRRRRRRR(15Arg)、RRRRRRRRRRRRRRRR(16Arg),KKKKKK(6Lys)、RKKKKKKKKHHHHHHHHHH(R8K10His)、RHHHHHHHHHHH(R10His)、RRRRRRRRHHHHHHHHHH(8Arg10His)和RRRRRRRRRRHHHHHHHHHH(9Arg10His) RRRRRRRRRHHHHHHHHHHHH(9Arg14His)、RHRHRHRHRHRHRHRHRHH(9R/H-His)、HRHRHRHRHRHRHRHRHH(8H/R-2H)。

[0146] 在又进一步的实施方案中,上面举例说明的聚阳离子肽中的一个或多个精氨酸残

基可以用相应的赖氨酸残基代替。

[0147] 本文还明确涵盖前述聚阳离子肽的反向氨基酸序列的用途。也可以采用各种其它氨基酸序列模式,并且本文明确涵盖所有此类序列模式。虽然在优选的实施方案中,在根据本发明的方法中使用的Lck活化剂的聚阳离子肽是线性肽,但是也可以提供其中聚阳离子肽是支化肽的实施方案。可以例如通过使氨基酸或氨基酸序列偶联至聚阳离子肽主链中的赖氨酸残基来提供支化聚阳离子肽。此类支化聚阳离子肽的实例是RK[8Arg]HHHHHHHHHH,其中8Arg序列(RRRRRRRR)是与赖氨酸残基K偶联的侧链。如本文所述的支化聚阳离子肽的侧链的长度可以长达16个氨基酸或更多个氨基酸,例如长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸。通常,聚阳离子肽的侧链的长度将长达10个氨基酸,更通常地长度长达约9个氨基酸,最通常地长度长达约8个氨基酸。

[0148] 通常,肽活性物(active)的阳离子氨基酸选自由以下组成的组:精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)和鸟氨酸,以及最通常地,精氨酸(R)、赖氨酸(K)和组氨酸(H)。在这些残基中,已经发现邻接的精氨酸残基比相应的赖氨酸或组氨酸残基序列能更好地刺激Lck活性。当聚阳离子肽包含精氨酸和非精氨酸(例如,组氨酸)氨基酸残基时,聚阳离子肽的非精氨酸氨基酸残基与精氨酸残基的比率通常为约1.2或更小,或约1.1或更小,或约1.0或更小,或约0.9或更小,或约0.8或更小,或者甚至约0.7或更小。

[0149] 在至少一些实施方案中,聚阳离子肽包含两个或更多个单一阳离子氨基酸残基(例如精氨酸)的偶联体或三联体。该偶联体或三联体可以彼此并排(从而形成阳离子氨基酸的4或6个邻接残基的序列),或者被构成聚阳离子肽的其它邻接阳离子氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10(等等)个邻接阳离子氨基酸)中的一个或多个彼此隔开。

[0150] 通常,聚阳离子肽的阳离子氨基酸中的至少一大部分是精氨酸氨基酸。最通常地,邻接阳离子氨基酸全部是精氨酸氨基酸。

[0151] 在优选的实施方案中,阳离子氨基酸序列选自由RRRRRRRR、rrrrrrrr、RRRRRRRR和rrrrrrrr组成的组,其中小写字母表示右旋性(“右旋”)氨基酸。

[0152] 由本发明实施的Lck活化剂可以由聚阳离子肽组成,或者在其它实施方案中,包含偶联至此外的肽部分的聚阳离子肽。所述此外的肽部分可以例如增强聚阳离子肽的Lck刺激活性。在其它实施方案中,单独的聚阳离子肽可能不会刺激Lck活性,并且只有当聚阳离子肽偶联至所述此外的肽部分时才刺激Lck的活性。

[0153] 为了方便起见,在如上所述的本发明的至少一些实施方案中与聚阳离子肽(PP)偶联的增强肽部分或其它肽部分在以下描述中称为(AP/P)。

[0154] 在至少一些实施方案中,增强肽或其它肽(AP/P)包含式I的氨基酸序列或其反向序列:

[0155] $R/K' - x^1 - R/K - x^2 - R/K - x^3 - x^4 - x^5 - x^6 - R/K''$ 式I

[0156] 其中:

[0157] 每个R/K独立地为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基;

[0158] R/K' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

[0159] R/K'' 为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基并且存在或不存在;

[0160] x^1 至 x^6 各自独立地为氨基酸;并且

[0161] 其中氨基酸 x^3 至 x^6 集体地存在或不存在,并且当氨基酸 x^3 至 x^6 存在时,R/K'' 不存

在。

[0162] 通常,在式I的增强肽或其它肽(AP/P)中:

[0163] x^1 、 x^3 和 x^6 是独立选择的氨基酸;并且

[0164] x^2 、 x^4 和 x^5 各自独立地是疏水性氨基酸。

[0165] 在至少一些实施方案中, x^1 、 x^3 和 x^6 是亲水性氨基酸,并且 x^2 、 x^4 和 x^5 是疏水性氨基酸。

[0166] 在其它实施方案中, x^3 和 x^6 是亲水性氨基酸,并且 x^1 、 x^2 、 x^4 和 x^5 是疏水性氨基酸。

[0167] 在其它实施方案中, x^1 和 x^3 是亲水性氨基酸,并且

[0168] x^2 、 x^4 、 x^5 和 x^6 是疏水性氨基酸。

[0169] 在另一些其它实施方案中,氨基酸 x^1 至 x^6 全部是疏水性氨基酸或者氨基酸 x^1 至 x^6 中的至少一大部分是疏水性氨基酸。

[0170] 如本文所述的Lck活化剂的聚阳离子肽的亲水性和疏水性氨基酸可以由遗传密码编码并且/或者包含合成氨基酸。通常,该氨基酸由遗传密码编码。聚阳离子肽的亲水性氨基酸可独立地选自极性氨基酸、碱性氨基酸和酸性氨基酸。

[0171] 极性氨基酸可以例如选自由以下组成的组:丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)、天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)氨基酸残基。

[0172] 碱性氨基酸可以例如选自由以下组成的组:赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)和鸟氨酸。

[0173] 酸性氨基酸可以例如选自谷氨酸(E)和天冬氨酸(D)。

[0174] 非极性疏水性氨基酸可以例如选自由以下组成的组:丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和甘氨酸(G)。通常,一种或多种疏水性氨基酸将选自丙氨酸(A)、缬氨酸(V)和苯丙氨酸(F)。

[0175] 通常,在式I的肽中,存在R/K'和R/K"中的至少一者。

[0176] 最通常地,存在式I的氨基酸残基R/K'。

[0177] 通常,式I的增强肽或其它肽(AP/P)包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0178] (a) $R-x^1-K-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K''$;

[0179] (b) $R-x^1-R-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K''$;和

[0180] (c) $K-x^1-K-x^2-K-x^3-x^4-x^5-x^6-R/K''$ 。

[0181] 通常,在式Ia的增强肽或其它肽(AP/P)中:

[0182] x^1 、 x^3 和 x^6 为亲水性氨基酸;并且

[0183] x^2 、 x^4 和 x^5 为疏水性氨基酸。

[0184] 在式Ia的增强肽或其它肽(AP/P)的至少一些实施方案中:

[0185] x^1 、 x^3 和 x^6 为极性氨基酸;并且

[0186] x^2 、 x^4 和 x^5 为非极性氨基酸。

[0187] 通常,在式Ia的实施方案中:

[0188] x^1 为丝氨酸;

[0189] x^2 为丙氨酸、亮氨酸或缬氨酸;

[0190] x^3 为天冬酰胺;

[0191] x^4 为脯氨酸、缬氨酸或丙氨酸;

- [0192] x^5 为亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸;并且
- [0193] x^6 为酪氨酸。
- [0194] 最通常地,在式Ia的实施方案中, x^2 为丙氨酸, x^4 为脯氨酸,并且 x^5 为亮氨酸。
- [0195] 通常,在式Ib的增强肽或其它肽(AP/P)中:
- [0196] x^3 和 x^6 为亲水性氨基酸;并且
- [0197] x^1 、 x^2 、 x^4 和 x^5 为疏水性氨基酸。
- [0198] 在式Ib的增强肽或其它肽(AP/P)的至少一些实施方案中:
- [0199] x^3 和 x^6 为极性氨基酸;并且
- [0200] x^1 、 x^2 、 x^4 和 x^5 为非极性氨基酸。
- [0201] 通常,在式Ib的实施方案中:
- [0202] x^1 为丙氨酸或谷氨酸;
- [0203] x^2 为丙氨酸、亮氨酸或缬氨酸;
- [0204] x^3 为天冬酰胺;
- [0205] x^4 为脯氨酸、缬氨酸或丙氨酸;
- [0206] x^5 为亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸;并且
- [0207] x^6 为酪氨酸。
- [0208] 最通常地,在式Ib的实施方案中, x^2 为丙氨酸, x^4 为脯氨酸,并且 x^5 为亮氨酸。
- [0209] 可替代地,在式Ib的增强肽或其它肽(AP/P)的至少一些实施方案中:
- [0210] x^1 、 x^3 和 x^6 为亲水性氨基酸;并且
- [0211] x^2 、 x^4 和 x^5 为疏水性氨基酸。
- [0212] 通常,在式Ib的此类实施方案中:
- [0213] x^1 为丝氨酸;
- [0214] x^2 为丙氨酸、亮氨酸或缬氨酸;
- [0215] x^3 为天冬酰胺;
- [0216] x^4 为脯氨酸、缬氨酸或丙氨酸;
- [0217] x^5 为亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸;并且
- [0218] x^6 为酪氨酸。
- [0219] 最通常地,在式Ib的此类实施方案中, x^2 为丙氨酸, x^4 为脯氨酸,并且 x^5 为亮氨酸。
- [0220] 在式Ic的增强肽或其它肽(AP/P)的至少一些实施方案中:
- [0221] x^1 和 x^3 为亲水性氨基酸;并且
- [0222] x^2 、 x^4 、 x^5 和 x^6 是疏水性氨基酸。
- [0223] 通常,在式Ic的实施方案中:
- [0224] x^1 为谷氨酸、缬氨酸或丙氨酸;
- [0225] x^2 为丙氨酸、亮氨酸或缬氨酸;
- [0226] x^3 为天冬酰胺;
- [0227] x^4 为脯氨酸、缬氨酸或丙氨酸;
- [0228] x^5 为亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸;并且
- [0229] x^6 为酪氨酸。
- [0230] 在进一步的实施方案中,式I的增强肽或其它肽(AP/P)可包含以下:

- [0231] x^1 独立地选自缬氨酸、丙氨酸、谷氨酸和丝氨酸；
- [0232] x^2 独立地选自缬氨酸、丙氨酸和亮氨酸；
- [0233] x^3 独立地选自缬氨酸、丙氨酸和天冬酰胺；
- [0234] x^4 独立地选自缬氨酸、丙氨酸和脯氨酸；
- [0235] x^5 独立地选自缬氨酸、丙氨酸和亮氨酸；
- [0236] x^6 独立地选自缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。
- [0237] 在一个实施方案中，式I的肽(Lck活化多肽部分)与所述阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联。
- [0238] 在至少一些实施方案中，式I的增强肽或其它肽(AP/P)包含氨基酸序列R/K'-S-R/K-A-R/K-N-P-L-Y-R/K" (例如，R/K-SKAKNPLY-R/K") 或其反向序列。
- [0239] 在其它实施方案中，增强肽或其它肽(AP/P)包含以下或由以下组成：R/K'- x^1 -R/K- x^2 -R/K- x^3 - x^4 - x^5 - x^6 -R/K"的修饰序列或变体序列，其中氨基酸 x^1 至 x^6 与肽R/K'-S-R/K-A-R/K-N-P-L-Y-R/K"的相应氨基酸的总体氨基酸序列同一性高于30%，更通常为50%或更高，更通常地高于65%并且最通常地高于80%；或所述修饰序列或变体序列的反向序列。此类肽的实例包括KEKLNPLFK和RAKAKNPLF。
- [0240] 在进一步的实施方案中，式R/K'- x^1 -R/K- x^2 -R/K- x^3 - x^4 - x^5 - x^6 -R/K"的增强肽或其它肽(AP/P)的氨基酸 x^1 至 x^6 可独立地选自自由以下组成的组：丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和甘氨酸(G)残基。在至少一些此类实施方案中，所述肽在位置 x^1 处不具有丝氨酸(S)或苏氨酸(T) (这两者均为极性氨基酸)。通常，氨基酸 x^1 至 x^6 中的每一者均独立地为非极性氨基酸并且最通常地，选自丙氨酸、缬氨酸和丝氨酸。通常，在该实施方案中，氨基酸 x^1 至 x^6 中的每一者均独立地选自丙氨酸(A)和缬氨酸(V)。此类肽的实例包括R/K'-AKAKAAAA-R/K"和R/K'-VKVKVVVV-R/K"。
- [0241] 通常，式I的增强肽或其它肽的氨基酸R/K"不存在。此类肽的实例包括RSKAKNPLY。
- [0242] 在至少一些实施方案中，氨基酸 x^3 至 x^6 和R/K"不存在。
- [0243] 在至少一些实施方案中，氨基酸 x^3 至 x^6 存在而R/K"不存在。
- [0244] 通常，R/K'存在。最通常地，R/K'为精氨酸。
- [0245] 通常，每个R/K均为相应的赖氨酸氨基酸。
- [0246] 在至少一些实施方案中，氨基酸 x^1 至 x^6 为疏水性氨基酸。
- [0247] 在特别优选的实施方案中，氨基酸 x^1 至 x^6 相同。
- [0248] 在再一个实施方案中，如本文所述的Lck活化剂的增强肽或其它肽部分包含如下所示的式I的肽或其反向序列：
- [0249] R/K'- x^1 -R/K- x^2 -R/K式I'
- [0250] 其中：
- [0251] R/K'为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基；
- [0252] 每个R/K均独立地为精氨酸或赖氨酸氨基酸残基；并且
- [0253] x^1 和 x^2 各自独立地是如上所述的式I及其实施方案的氨基酸。
- [0254] 在至少一些实施方案中，式I或式I'的肽包含R- x^1 -K- x^2 -K。
- [0255] 在特别优选的实施方案中，式I或Ia的肽的氨基酸 x^1 和 x^2 各自独立地为疏水性氨基酸(例如，缬氨酸(V)或丙氨酸(A))并且通常是相同的。

[0256] 因此,从上所述,增强肽或其它肽(AP/P)可包含式I或式I'的肽或者由式I或式I'的肽组成。因此,将理解的是,包含式I或式I'的肽的肽还可包含与式I或式I'的肽邻接的一个或多个另外的氨基酸。例如,该肽可包含分别与该肽的一个或两个末端(例如,N-末端和/或C-末端)偶联的一个或多个独立选择的氨基酸。作为实例,在另一些进一步实施方案中,包含式I或式I'的氨基酸序列的增强肽或其它肽(AP/P)可进一步包含与氨基酸R/K' (当存在时)偶联或者在氨基酸R/K' 不存在的实施方案中与氨基酸 x^1 偶联的氨基酸部分(AA),如下所示的式I"中所例示的:

[0257] AA-R/K'- x^1 -R/K- x^2 -R/K- x^3 - x^4 - x^5 - x^6 -R/K"式I"

[0258] 其中AA为氨基酸或氨基酸序列,并且每个R/K、R/K'、R/K"和氨基酸残基 x^1 至 x^6 与上式I相同。

[0259] 同样,可以提供其中AA部分替代地与式I"的增强肽或其它肽(AP/P)的另一末端偶联的实施方案。

[0260] 通常,当存在时,氨基酸部分AA由一个或多个独立选择的阳离子氨基酸组成。通常,该氨基酸将独立地选自精氨酸(R)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)和鸟氨酸氨基酸残基,并且最通常地,将全部为精氨酸(R)残基。在至少一些实施方案中,AA部分(当存在时)由多达30个阳离子氨基酸(例如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或30个阳离子氨基酸残基)的阳离子氨基酸序列组成。

[0261] 在特别优选的此类实施方案中,AA部分(当存在时)将包含至少2个阳离子氨基酸。此类AA部分的实例包括聚精氨酸、聚组氨酸和聚赖氨酸序列(例如,HH(2His)、HHH(3His)、HHHH(4His)、HHHHH(5His);RRRRRRRR(8Arg)和RRRRRRRRR(9Arg))。在其它实施方案中,AA部分可包含这样的肽,其以与式I'的增强肽的R/K'氨基酸(当存在时)偶联或者在R/K'氨基酸残基不存在时与氨基酸残基 x^1 偶联的9、8、7、6、5、4、3、2或1个阳离子氨基酸终止。

[0262] 当存在于根据本发明的Lck活化剂中时,增强肽或其它肽(AP/P)通常具有多达约40个氨基酸的长度。在至少一些实施方案中,增强肽或其它肽(AP/P)的长度为至少5个氨基酸(例如,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或40个氨基酸)。在至少一些实施方案中,增强肽将具有约25个氨基酸或更少氨基酸,或约20、15、14、13、12、11或10个氨基酸或更少氨基酸的长度。在特别优选的实施方案中,增强肽或其它肽(AP/P)将具有至少9个氨基酸的长度。还应理解,本文还明确提供了5至例如40个氨基酸的所有范围。

[0263] 在一个实施方案中,Lck活化多肽部分与阳离子氨基酸序列的N-末端或C-末端偶联。

[0264] 如本文所用,术语“反向序列”意指倒转的氨基酸序列。例如,RSKAKNPLY的反向序列为YLPNKA KSR。因此,反向序列的氨基酸序列处于逆序,由此原始序列的N-末端成为反向序列的C-末端,而原始序列的C-末端成为反向序列的N-末端。通常,将根据本发明的实施方案使用的肽至少在其羧基末端酰胺化或进行类似处理,以防御蛋白水解降解。然而,也可以采用任何合适的用于防御蛋白水解降解的N-末端或C-末端修饰(例如,甲基化)。

[0265] 如下文进一步所述,增强肽或其它肽(A/P)的氨基酸可以是L-氨基酸和/或D-氨基酸。因此,反向序列的氨基酸可以全部是L-氨基酸或者全部是D-氨基酸,并且术语“反向序列”延伸至逆反肽(retro-inverso peptides),其中所有氨基酸都是D-氨基酸,但是不限于

此。

[0266] 在一个实施方案中,用于活化Lck的肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列: RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrrr、RVKVKVVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvvrrrrrrrrrr、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-YLPNKAISR、RSKAKNPLY、RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、支化的<RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR、RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR、HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH、RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK、RVKVKVVVV-RRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR、RRRRRRRRR-RVKVKVVVV-R、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH、KEKLNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH、RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH和KEKLNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH。

[0267] 在另一个实施方案中,用于活化Lck的肽包含氨基酸序列RSKAKNPLY-RRRRR或RSKAKNPLY-RRRRR。

[0268] 在一方面,本发明提供了包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的肽: RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrrr、RVKVKVVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvvrrrrrrrrrr。

[0269] 在另一方面,本发明提供了由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成的肽: RSKAKNPLYRRRRRRRRR、rskaknplyrrrrrrrrrr、RVKVKVVVVRRRRRRRRR和rvkvkvvvvrrrrrrrrrr。

[0270] 表2:序列表

[0271]

序列识别号码	氨基酸序列*
SEQ ID NO: 1	RRRR (IK00400)
SEQ ID NO: 2	RRRRR (IK00500)
SEQ ID NO: 3	RRRRRR (IK00600)
SEQ ID NO: 4	RRRRRRRR (IK00800)
SEQ ID NO: 5	rrrrrrrr (IKD00800)
SEQ ID NO: 6	RRRRRRRRR (IK00900)
SEQ ID NO: 7	RRRRRRRRRR (IK00100)
SEQ ID NO: 8	RRRRRRRRRRR (IK01200)
SEQ ID NO: 9	RRRRRRRRRRRRR (IK01400)
SEQ ID NO: 10	rrrrrrrrrrrrrr (IKD01400)
SEQ ID NO: 11	RRRRRRRRRRRRR-OH (IK014OH)
SEQ ID NO: 12	RRRRRRRRRRRRRRRRRRR (IK00200)
SEQ ID NO: 13	KKKKKKKKKK (10Lys)
SEQ ID NO: 14	HHHHHHHHHH (10His)
SEQ ID NO: 15	OrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrn (10 Orn)
SEQ ID NO: 16	HHH-RRRRRRRRR-HHH (IK03930)
SEQ ID NO: 17	HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH (IK05950)
SEQ ID NO: 18	KKKKKKKK-HHHHHHHHHH (IK00K10)
SEQ ID NO: 19	RRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK00810)
SEQ ID NO: 20	RRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK00910)
SEQ ID NO: 21	DDDDDDDDDD (IKD9)
SEQ ID NO: 22	RRRRRRRRR (IK00900)
SEQ ID NO: 23	DSEAENPLY-DDDDDDDDDD (IKDE800)
SEQ ID NO: 24	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH ₂ (IK14800)
SEQ ID NO: 25	RSKAK (IK5000)
SEQ ID NO: 26	RSKAK-R (IK50100)
SEQ ID NO: 27	RSKAK-RR (IK50200)
SEQ ID NO: 28	RSKAK-RRR (IK50300)

[0272]

SEQ ID NO: 29	RSKAK-RRRR (IK50400)
SEQ ID NO: 30	RSKAKNPLY (IK94000)
SEQ ID NO: 31	RSKAKNPLYR (IK14000)
SEQ ID NO: 32	RSKAKNPLY-RRRR (IK14300)
SEQ ID NO: 33	RSKAKNPLY-RRRRR (IK14400)
SEQ ID NO: 34	RSKAKNPLY-RRRRRR (IK14500)
SEQ ID NO: 35	r s k a k n p l y - r r r r r r (ID94600)
SEQ ID NO: 36	C-RSKAKNPLY-RRRRRR-C (Cyclised) (IK14500C)
SEQ ID NO: 37	RSKAK-RRRRRRRRR (IK50900)
SEQ ID NO: 38	r s k a k n p l y - r r r r r r r r r r (IKD14800)
SEQ ID NO: 39	r r r r r r r r r - y l p n k a k s r (IKR81400)
SEQ ID NO: 40	IAGQ-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IKM14800)
SEQ ID NO: 41	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-GPLG (IK148MP9)
SEQ ID NO: 42	RRRRRRRRR-SKAKNPLYR (IK9R94S)
SEQ ID NO: 43	RRRRRRRRR-YLPNKA KSR (IK9R94Y)
SEQ ID NO: 44	RSKAKNPLY-KKKKKKKKK (IK94K90)
SEQ ID NO: 45	RSKAKNPLY-RHHHHHHHHHH (IK14010)
SEQ ID NO: 46	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK14510)
SEQ ID NO: 47	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK14810)
SEQ ID NO: 48	Branched < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (Br IK14810)
SEQ ID NO: 49	RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHHH (IK14820)
SEQ ID NO: 50	HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK11480)
SEQ ID NO: 51	HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR (IK59514)
SEQ ID NO: 52	RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR (IK81140)
SEQ ID NO: 53	HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK51455)
SEQ ID NO: 54	RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK (IK94RK0)
SEQ ID NO: 55	RVKVKVVVV (IK95000)
SEQ ID NO: 56	RVKVKVVVV-RRRRR (IK15400)
SEQ ID NO: 57	RVKVKVVVV-RRRRRRRR (IK15700)
SEQ ID NO: 58	RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)
SEQ ID NO: 59	RRRRRRRR-RVKVKVVVV-R (IK80150)
SEQ ID NO: 60	RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK50810)
SEQ ID NO: 61	RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRH-HH (IK52820)
SEQ ID NO: 62	KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK50810)
SEQ ID NO: 63	RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH (IK52820)
SEQ ID NO: 64	KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH IKB2810
SEQ ID NO: 65	RSKAKNPLYR-RRRRRRRR-(2Adod)4-NH2 (IK14804)
SEQ ID NO: 66	RVKVKVVVV-RRRRRRRR-(2Adod)4-NH2 (IK15804)

[0273] *:小写字母表示右旋性(“右旋”)氨基酸;2Adod表示2-氨基十二烷酸(例如(S)-2-氨基十二烷酸);12Adod表示12-氨基-十二烷酸(例如(S)-12-氨基十二烷酸);-OH表示未酰胺化。

[0274] 如本说明书中使用的术语“氨基酸序列”是指由通常通过酰胺键连接的氨基酸单

体组成的分子。该术语包括在本公开的方法和使用中保留功能活性的该序列的“前药”，该序列的带电和非带电形式，该序列的药理学上可接受的盐，以及该序列的任何其它变化形式、衍生物或对该序列的修饰（包括对该序列的主链和/末端的修饰）。

[0275] 如本文所用，术语“序列”不应解释为隐含地指定可以形成分子的氨基酸数目的最大长度。在一些实施方案中，最大长度为10个氨基酸。在一些实施方案中，最大长度为9个氨基酸。

[0276] 在一些实施方案中，所述序列是分离的或纯化的序列。

[0277] 通过天然或重组技术产生的序列的“分离”和“纯化”方法在本领域，例如在C-H Lee, A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification, Endocrinology and Metabolism; 2017年3月; 32(1):18中是已知的。进一步地，术语“分离的”或“纯化的”包括合成的和其它人工产生的序列。合成序列的方法是本领域已知的。一般来说，通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基的缩合反应来化学地合成序列。序列的化学合成可以使用液相技术或固相技术进行。合成技术可允许掺有非天然氨基酸序列的序列的产生、主链修饰和D-异构体的合成。

[0278] 在一些实施方案中，本发明的序列是经修饰的。在一些实施方案中，所述修饰是改变该序列的药理学性质的修饰。在一些实施方案中，所述修饰增加本发明的组合物或序列的半衰期。在一些实施方案中，所述修饰可以增加该序列（和/或本发明的组合物）的生物活性。在一些实施方案中，所述修饰可以是增加本发明的序列或组合物的选择性的修饰。

[0279] 在一个实施方案中，所述修饰是添加保护基。该保护基可以是N-末端保护基、C-末端保护基或侧链保护基。本发明的序列可以具有这些保护基中的一种或多种。本领域的技术人员知道使氨基酸与这些保护基反应的合适技术。这些基团可以通过本领域已知的制备方法添加。所述基团可以保留在序列上，或者可以在使用或施用之前去除。保护基可以在合成期间添加。

[0280] 本发明人已经证明，使本文所述的Lck活化肽酰胺化令人惊讶地增加了Lck活性的水平。因此，在一个实施方案中，本发明提供了如本文所述的肽，其中氨基酸序列在Lck活化多肽部分或阳离子氨基酸序列的C-末端被酰胺化。

[0281] 在另一个实施方案中，本发明提供了如本文所述的肽，其中最远端的脂肪酸被酰胺化。

[0282] 如本文在多肽序列的上下文中所用，“NH₂”表示该多肽被酰胺化，例如在其C-末端被酰胺化。例如，C-末端氨基酸或最远端的脂肪酸可以被酰胺化。

[0283] 除非另外指示（例如用-OH指示），否则本文使用的所有肽均在多肽部分的C-末端被酰胺化。

[0284] 在另一个实施方案中，本发明提供了如本文所述的肽，其中氨基酸序列在Lck活化多肽部分的C-末端被酰胺化。

[0285] 在一些实施方案中，所述序列在其C-末端被酰胺化。酰胺化是指通过依序的内切蛋白酶解和外切蛋白酶解对甘氨酸延伸底物进行N-氧化裂解的过程。本领域已知用于在体外产生酰胺化序列的方法，例如：酶促酰胺化；对重组产生的序列和蛋白质的C-末端进行化学修饰；在固相序列合成中使用酰胺树脂；在氨存在下使用羧肽酶；以及使序列的C-末端转化为甲酯并在低温下添加氨。合适技术的公开的实例包括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年6月;16(6):450-6以及VČerovský和M-R Kula C-Terminal sequences Amidation Catalyzed by Orange Flavedo sequences Amidase;Angewandte Chemie,1998年8月;37(13-14):1885。

[0286] C-末端的酰胺化导致C-末端不带电荷,因此经修饰的序列更严密地模拟天然蛋白质。这可能具有一系列优势,其包括序列进入细胞的能力增强;该序列在体内的代谢稳定性得到改善;由氨基肽酶、外肽酶和合成酶所导致的该序列的体内酶促降解减少;以及该序列的储存期限得到改善。

[0287] 如本文所述,本发明人已经确定本文所述的Lck活化多肽可包含L氨基酸或D氨基酸并且具有生物活性。因此,在一个实施方案中,本发明描述了如本文所述的Lck活化剂,其中氨基酸序列包含L-精氨酸残基。在另一个实施方案中,本发明描述了如本文所述的Lck活化剂,其中氨基酸序列包含D-精氨酸残基。

[0288] 如本领域中已知的, α 氨基酸在 α 位置处包括手性碳。因此,除甘氨酸之外的所有 α 氨基酸可以以两种对映异构体中的任一种,即L-异构体或D-异构体存在。一般来说,在哺乳动物细胞中只有L-氨基酸被制造出来并且被掺入到蛋白质中。D-氨基酸可以人工合成或者可以在细菌蛋白质中发现。L和D约定不是用来直接指氨基酸的立体化学,而是针对氨基酸构型使用的,并不是指氨基酸本身的旋光性,而是指可以用来合成氨基酸的甘油醛异构体的旋光性(D-甘油醛是右旋性的;L-甘油醛是左旋性的)。

[0289] 在至少一些实施方案中,如本文所述的Lck活化剂的增强肽或其它肽(AP/P)可包含选自以下组成的组的肽活性物或者由选自以下组成的组的肽活性物组成:RSKAKNPLY、RSKAKNPLYR、RSRARNPLY、RARAKNPLY、KEKLKNPLF、KEKLKNPLFK、RVKVKVVVV、RAKAKAAAA、RAKAKNPLF、RSKAK、RAKAK和RVKVK。

[0290] 在其他实施方案中,增强肽或其它肽(AP/P)可以选自以下组成的组:反向序列YLPNKA KS R、RYLPNKA KS R、YLPNRARS R、YLPNKA RS R、FLPNKLKEK、KFLPNKLKEK、VVVVKVKVR、AAAAKAKAR、FLPNKAKAR、KAKSR、KAKAR和KVKVR。

[0291] 最通常地,增强肽或其它肽(AP/P)包含RSKAKNPLY、YLPNKA KS R、RSKAK或KAKSR,或者由RSKAKNPLY、YLPNKA KS R、RSKAK或KAKSR组成。

[0292] 本发明人已经证明,如本文所述的至少一个脂肪酸与肽的偶联可以令人惊奇地赋予肽增加的活化Lck的能力。

[0293] 因此,在一些实施方案中,用于活化Lck的肽包含一个或多个连接的脂肪酸部分。在一些实施方案中,Lck活化剂包含四个连接的脂肪酸部分。这个结果令人惊讶,因为就其本身而言,包含1-4个连接的脂肪酸的脂肪酸部分不会活化Lck。在一些实施方案中,所述一个或多个连接的脂肪酸部分包括至少一个氨基-十二烷酸部分。在一些实施方案中,所有脂肪酸部分都是氨基-十二烷酸。

[0294] 在另一个优选的实施方案中,多于一个脂肪酸偶联在式I的多肽部分的C-末端处。例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个脂肪酸与式I的多肽部分偶联。

[0295] 所述至少一个脂肪酸可以通过如下方式提供:通过在一个脂肪酸链的氨基取代基与下一个脂肪酸的末端羧基之间连续地形成相应的酰胺键来将脂肪酸偶联在一起,从而提

供偶联的脂肪酸。

[0296] 因此,在脂肪酸的 α 碳或 β 碳上具有氨基(NH_2)取代基的脂肪酸特别适合用于偶联。

[0297] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中至少四个脂肪酸与该活化剂的C-末端偶联。

[0298] 在另一个优选的实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中最远端的脂肪酸被酰胺化。

[0299] 脂肪酸的偶联可以是线性和/或支化的。在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中所述至少四个脂肪酸的偶联是线性的。在另一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中所述至少四个脂肪酸的偶联是支化的。

[0300] 如上所讨论的,一个或多个脂肪酸部分可以在任何位置处与用于活化Lck的肽偶联以形成脂肽。然而,在优选的实施方案中,一个或多个脂肪酸部分在用于活化Lck的肽的C-末端处偶联。与氨基酸序列偶联的一个或多个脂肪酸部分可以是支化脂肪酸或线性脂肪酸。

[0301] 在一些实施方案中,至少一个、两个、三个或四个脂肪酸部分是线性的。例如,当所述至少一个脂肪酸的偶联是线性偶联时,在一个实施方案中,至少一个脂肪酸经由酰胺键与用于活化Lck的肽的C-末端偶联。

[0302] 如本文所用,术语“线性”是指脂肪酸的烃链掺入到用于活化Lck的肽的主链中。例如,该脂肪酸可以在 ω 碳上包含氨基取代基。在一个实施方案中,使用了12-氨基月桂酸脂肪酸酰胺(例如12-氨基十二烷酸;‘Adod’),因此可以在碳12处的氨基取代基与另一个基团(例如羧基)之间形成酰胺键。

[0303] 因此,在另一个实施方案中,当所述至少一个脂肪酸的偶联是线性偶联时,使第一脂肪酸经由酰胺键与用于活化Lck的肽的C-末端偶联,并且通过在所述脂肪酸的末端羧基与进一步的脂肪酸(例如氨基十二烷酸)的氨基取代基之间形成酰胺键来使进一步的脂肪酸与所述脂肪酸偶联。在另一个实施方案中,通过在所述进一步的脂肪酸的末端羧基与第三脂肪酸的氨基取代基之间形成酰胺键来使所述第三脂肪酸与所述进一步酸偶联。在另一个实施方案中,通过在所述第三脂肪酸的末端羧基与第四脂肪酸的氨基取代基之间形成酰胺键来使所述第四脂肪酸与所述第三酸偶联。

[0304] 通过在一个脂肪酸的末端羧基与待偶联至用于活化Lck的肽的另一个脂肪酸的氨基取代基之间形成酰胺键来由脂肪酸单体形成线性多聚脂肪酸链,如此可以使许多脂肪酸与用于活化Lck的肽的C-末端偶联。

[0305] 在其它实施方案中,脂肪酸的烃链不是“线性的”,例如,脂肪酸的整个或部分烃链不是用于活化Lck的肽的主链的一部分(例如与用于活化Lck的肽的主链‘垂直’)。例如,该脂肪酸可以在该脂肪酸的 α 碳或 β 碳上包含氨基取代基。例如,在一个实施方案中,使用了2-氨基月桂酸脂肪酸酰胺(例如2-氨基十二烷酸;‘Adod’),因此可以在碳2处的氨基取代基与另一个基团(例如式I的肽或聚阳离子肽的羧基)之间形成酰胺键。

[0306] 如本文所用,术语Adod是指氨基十二烷酸,并且“2Adod”是指2-氨基十二烷酸;“12Adod”是指12-氨基十二烷酸等。在多于一个脂肪酸偶联的情况下,偶联的脂肪酸数目用下标表示。例如,“(2Adod)₂”表示两个2-氨基十二烷酸。因此,如本文所述的聚酰胺部分的

单个单元对应于一个2-氨基十二烷酸残基(本文也称为“(2Adod)₁”)。如本文所述的聚酰胺部分的两个单元对应于两个2-氨基十二烷酸残基(在本文中也称为“(2Adod)₂”)。如本文所述的聚酰胺部分的三个单元对应于三个2-氨基十二烷酸残基“(2Adod)₃”。如本文所述的聚酰胺部分的四个单元对应于四个2-氨基十二烷酸残基“(2Adod)₄”。

[0307] 在其它实施方案中,所述脂肪酸可以在所述脂肪酸的另一个碳上包含氨基取代基。

[0308] 在其它实施方案中,其中氨基脂肪酸是手性的,具有一个手性中心,将存在两种可能的对映异构体(例如R和S)。因此,在一个实施方案中,本发明的用于活化Lck的肽可以包含氨基脂肪酸的一种对映异构体或另一种对映异构体,或者一种或多种氨基脂肪酸的一种或多种对映异构体。

[0309] 因此,本发明提供了用于活化Lck的肽,该肽包含以线性和/或非线性方式(例如以支化方式)偶联的脂肪酸。

[0310] 如本文所用,术语“支化的”包括多于一个脂肪酸与氨基酸残基或与第一脂肪酸偶联,以便不与用于活化Lck的肽的主链呈“线性的”或者与用于活化Lck的肽的主链“垂直”。

[0311] 在一个实施方案中,所述至少一个脂肪酸是含有13-21个碳原子的长链脂肪酸、含有6至12个碳原子的中链脂肪酸或具有少于6个碳原子的短链脂肪酸。在优选的实施方案中,所述脂肪酸包含约6至16个碳原子的长度。例如,所述脂肪酸包含6至16个碳、8至14个碳或10至12个碳。

[0312] 在一个实施方案中,所述脂肪酸包含6个碳,并且是羊油酸或己酸。例如,在一个实施方案中,所述脂肪酸是氨基己酸。

[0313] 在另一个实施方案中,所述脂肪酸包含8个碳,并且是羊脂酸或辛酸。例如,在一个实施方案中,所述脂肪酸是氨基辛酸。

[0314] 在另一个实施方案中,所述脂肪酸包含10个碳,并且是羊蜡酸或癸酸。例如,在一个实施方案中,所述脂肪酸是氨基癸酸。

[0315] 在另一个实施方案中,所述脂肪酸包含12个碳,并且是月桂酸或十二烷酸。例如,在一个实施方案中,所述脂肪酸是氨基十二烷酸(例如(S)-2-氨基十二烷酸)。所述脂肪酸可以是饱和的,或者是不饱和的并具有一个或多个双键。优选地,所述脂肪酸是饱和的。

[0316] 在一个实施方案中,本发明提供了用于活化Lck的肽,其中该肽进一步包含与Lck活化多肽的N-末端或C-末端偶联的化合物,其中该化合物为至少一个脂肪酸。

[0317] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中至少四个脂肪酸与Lck活化多肽部分的C-末端偶联。

[0318] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中多于一个脂肪酸的偶联是线性的。

[0319] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中多于一个脂肪酸的偶联是支化的。

[0320] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中脂肪酸是饱和的。

[0321] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中所述脂肪酸选自自由羊油酸、羊脂酸、羊蜡酸(癸酸)和月桂酸(十二烷酸)组成的组。

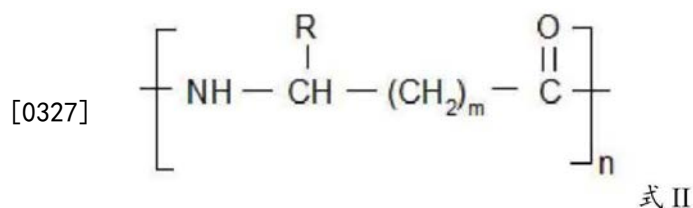
[0322] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中最远端的脂肪酸被酰胺化。

[0323] 在一个实施方案中,本发明提供了如本文所述的用于活化Lck的肽,其中氨基酸序列在Lck活化多肽部分的C-末端被酰胺化。

[0324] 在特别优选的实施方案中,细胞化合物可以包含长度长达20个原子或更多原子的饱和或不饱和的脂族、脂肪酸、聚酰胺或其它主链,其可以具有一条或多条侧链。通常,该主链将具有在约6至20个原子的范围内(即,6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个原子)的长度,并且可以包括一个或多个杂原子(例如,独立地选自N、O、S和P)。当支化时,该主链一般将具有1至5条侧链(例如,1、2、3、4或5条侧链),每条侧链的长度独立地长达18个原子(即,长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个原子)。通常,每条侧链独立地为饱和或不饱和的脂族碳链(例如,C₁至C₁₈链)。最通常地,促进剂部分具有脂族或聚酰胺主链。

[0325] 在至少一些实施方案中,所述化合物是具有3至5个重复单元的聚酰胺,每个重复单元独立地具有3至9个原子的长度(即,具有3、4、5、6、7、8或9个原子的长度)并且不具有侧链或者只具有单一侧链。通常,每个重复单元具有3至6个原子的长度,更通常3至6、3至5,或3至4个原子的长度,且最通常3个原子的长度。每个重复单元的侧链的长度通常独立地为4至18个碳原子的长度(即C₄-C₁₈),例如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个碳原子,且更通常为8至18、8至16、8至14、8至12或8至10个碳原子的长度。每个重复单元的侧链通常将独立地从重复单元的α或β碳原子延伸。

[0326] 通常,根据本发明的实施方案的待偶联的化合物包含如下所示的式II的化合物:



[0328] 其中:

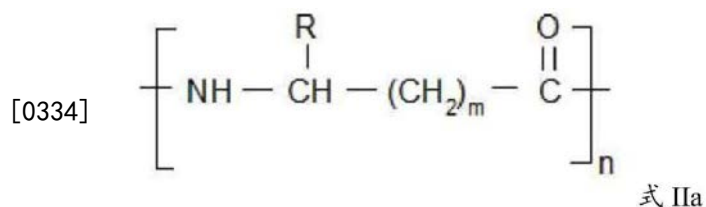
[0329] n为所述化合物的单体单元的数目并且是1至5的整数;

[0330] 每个m独立地为0至18的整数;并且

[0331] 每个R基团独立地为H或C₁至C₁₈侧链。通常,单体单元的R侧链的长度基本上与该单体单元的m的值成反比。一般来说,每个R的长度将为18-m个碳原子,其中m的值为0至17。例如,如果m为0,则R将为C₁₈侧链,如果m为2,则R将为C₁₆侧链,如果m为4,则R将为C₁₄侧链,依此类推。

[0332] 通常,在式II的化合物中,n为2至5;每个m独立地为0、1、2或3;并且每个R独立地为碳链。

[0333] 通常,每个R独立地是长度为4至18个碳原子的碳链。因此,在至少一些实施方案中,根据本发明的Lck活化剂的化合物是如下所示的式IIa的聚酰胺部分(PM):



[0335] 其中：

[0336] n为所述化合物的单体单元的数目并且是3至5的整数；

[0337] 每个m独立地为0、1、2或3；并且

[0338] 每个R基团独立地是长度为4至18个碳原子的碳链。

[0339] 通常，在式II或式IIa的化合物中，每个m独立地为0、1或2。更通常地，m为0或1。最通常地，m为0。

[0340] 正如将会理解的，如本文所述的式II的化合物的单体单元可不同于该化合物的其它单体单元中的一个或多个。

[0341] 式II或式IIa的化合物/聚酰胺部分可以例如通过使式R-CHNH₂-(CH₂)_m-COOH的脂肪酸(其具有如所示的氨基取代基，并且R和m如上所述)偶联在一起来提供，所述偶联是通过在一条脂肪酸链的氨基取代基与下一个脂肪酸的末端羧基之间连续地形成相应的酰胺键从而提供每个脂肪酸的R基团作为侧链从其延伸的聚酰胺主链来进行的。即，所得聚酰胺部分的每个单体单元的R基团侧链是形成聚酰胺部分的主链的相应脂肪酸的剩余部分。

[0342] 在脂肪酸的α或β碳上具有氨基(NH₂)取代基的脂肪酸特别适合用于合成聚酰胺部分(PM)，由此所得聚酰胺部分具有α或β聚酰胺主链。最通常地，在式II的化合物中，每个单体单元的m均为0。因此，该聚酰胺部分可由其中每个脂肪酸的α碳原子均被氨基取代的脂肪酸形成。

[0343] 在本发明的实施方案中，每个脂肪酸部分包含6至16个碳、8至14个碳，或10至12个碳。在一些实施方案中，至少一个脂肪酸部分是饱和的、不饱和的或多不饱和的。在优选的实施方案中，所述脂肪酸中的一个、两个、三个或四个是饱和的。在一些实施方案中，所述脂肪酸选自自由以下组成的组：羊油酸(己酸)、羊脂酸(辛酸)、羊蜡酸(癩酸)和月桂酸(十二烷酸)。在优选的实施方案中，所述脂肪酸是十二烷酸(氨基十二烷酸/adod)。

[0344] 在根据本发明的方法中使用的Lck活化剂的实施方案中，式II化合物的每个R基团的碳链可以独立地为线性的或支化的，并且可以是饱和的，或者不饱和的并具有一个或多个双键。通常，每个R基团均为饱和碳链。

[0345] 通常，式II化合物的每个R基团独立地是长度为8至18个、8至16个，更优选8至14个并且最优选8至12个碳原子的碳链。最通常地，每个R基团独立地是长度为8至10个碳原子的碳链。

[0346] 因此，例如，2-氨基-羊蜡酸和月桂酸脂肪酸(长度分别为10和12个碳原子)特别适合用于提供如本文所述的式II的化合物。正如将理解的，在羊蜡酸脂肪酸的情况下，如果羊蜡酸脂肪酸链的碳1和2(α碳)掺入到所得式II化合物的主链中，则所述化合物的单体单元的R基团的长度为8个碳原子。同样，在月桂酸脂肪酸的情况下，所得化合物的单体单元(n=1)的R基团的长度为10个碳原子。

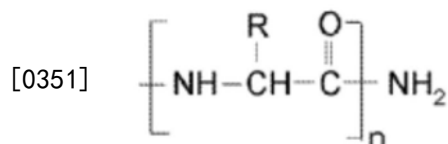
[0347] 式II化合物的R基团的碳链长度可以独立地在该化合物的一个单体单元与另一个

单体单元之间变化。通常,式II化合物的R基团的碳链的长度彼此相同。特别优选使用2-氨基月桂酸脂肪酰胺来提供式II化合物。因此,所述化合物的每个单体单元的R基团的长度在这个例子中为10个碳原子。

[0348] 通常,在式II的化合物中,n为3、4或5,更通常地n为3或4,且最通常地,n为4。

[0349] 然而,明确涵盖如本文所述的Lck活化剂的式II化合物的所有变型。

[0350] 通常,如本文所述的Lck活化剂的式IIa的化合物以氨基(NH₂)终止,如下面方案1所例示。



[0352] 方案1:式II化合物

[0353] 在其它实施方案中,也可以采用以氢原子或除NH₂之外的末端基团终止的式II化合物(如方案1中所示),并且本发明明确地扩展到包含所有合适的、生理上可接受的此类化合物(包括其生理上可接受的盐)的治疗剂的使用。

[0354] 根据本发明使用的式II化合物可以例如具有选自以下的末端基团:例如NH₂、H、COOH、OH、卤基(例如F、Cl、Br、I)、SH、烷基、低级烷基、烯基、低级烯基、OR、NHR'和NR'R",其中低级烷基、低级烯基、OR、NHR'和NR'R"是任选取代的,并且R、R'和R"各自独立地是任选取代的低级烷基或低级烯基。

[0355] 低级烷基、低级烯基、OR、NHR'和NR'R"基团的一个或多个任选取代基可以选自,例如,OH、卤基(例如F、Cl、Br、I)、C₁-C₃烷基(例如,甲基)、COOH等。

[0356] “低级烷基”意指C₁-C₆烷基(例如甲基、乙基或丙基等,其可以是直链或支化的)。

[0357] 同样,“低级烯基”意指在其最长的链中包含一个或多个双键的C₂-C₆烯基。

[0358] 然而,通常,式II的化合物将以NH₂或COOH基团终止。

[0359] 通常,本身是根据本发明的Lck活化剂的如本文所述的聚阳离子肽(PP)将包含至少6个邻接阳离子氨基酸。同样,包含小于6个邻接阳离子氨基酸的长度的如本文所述的聚阳离子肽通常将与式I的增强肽或其它肽(AP/P)或化合物(C)或式II偶联。

[0360] 增强肽或其它肽(AP/P)的经修饰形式或变体形式与野生型或亲本肽(例如,RSKAKNPLY)之间的氨基酸差异通常是保守的氨基酸变化。保守性氨基酸取代意指将氨基酸残基用具有相似立体化学特性(例如,结构、电荷、酸性或碱性特征)并且基本上不影响构象或特征生物学功能的一个或多个期望方面的另一氨基酸置换。例如,酸性氨基酸诸如天冬氨酸(D)可以被谷氨酸残基(E)置换,极性氨基酸诸如丝氨酸(S)可以被另一种极性氨基酸诸如苏氨酸(T)或天冬酰胺(N)置换,如此类推。

[0361] 当为了比较目的而对序列进行最佳比对时,可以通过比较序列中每个位置处的氨基酸来确定如本文所述的氨基酸序列之间的序列同一性。序列比对可以使用任何合适的程序或算法,例如通过Needleman和Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970)来执行。可使用标准软件程序,诸如作为Wisconsin Package 10.1版的一部分的GAP(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, United States),使用默认评分矩阵(空位产生罚分为50且空位延伸罚分为3),方便地执行计算机辅助的序列比对。用于比较的氨基酸序列的其它比对方法也是众所周知的,诸如但不限于Smith和Waterman(1981)以及Pearson和Lipman(1988)

的算法,此类算法的计算机化实现(例如BESTFIT、FASTA和BLAST),以及通过手动比对和检查序列。

[0362] 在如本文所述的实施方案中,Lck活化剂可包含如上所述的式I的增强肽或其它肽(AP/P),其与聚阳离子肽(PP)的N-末端或C-末端偶联,如下面式III和式IV所例示的。

[0363] 在其它实施方案中,化合物诸如式II的化合物可以与聚阳离子肽(PP)的N-末端或C-末端偶联,如以下式V和式VI中所举例说明的。

[0364] 在其中式I的增强肽或其它肽或如上所述的其它肽部分与聚阳离子肽(PP)的N-末端或C-末端偶联的另一些其它实施方案中,式II的化合物(C)可以与该聚阳离子肽(PP)的N-末端或C-末端中的另一者偶联,如以下式VII和式VIII中所举例说明的。

[0365] AP/P-PP 式III

[0366] PP-AP/P 式IV

[0367] C-PP 式V

[0368] PP-C 式VI

[0369] AP/P-PP-C 式VII

[0370] C-PP-AP/P 式VIII

[0371] 如本文所述的Lck活化剂的组分,例如聚阳离子肽(PP)、化合物(C)和/或增强肽或其它肽(AP/P)通常根据具体情况,通过相应的肽键或其它合适的(例如,共价或离子)键直接彼此偶联。在其它实施方案中,聚阳离子肽(PP)可以经由相应的接头基团(LG)与增强肽或其它肽(AP/P)和/或化合物(C)偶联。接头基团可以彼此相同或不同。接头基团可以例如包含1至10个原子或更多原子(即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个原子)的长度或者由1至10个原子或更多原子(即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个原子)的长度组成,其中所述连接原子或所述原子中的一个或多个可以是例如独立地选自N、S和O的非碳原子。然而,可以采用任何合适的连接系统。

[0372] 根据上文,如本文所述的Lck活化剂的至少一些实施方案是脂肽或者包含脂肽。

[0373] 还应理解,式III至式VIII的任一者中的增强肽或其它肽(AP/P)可以是式I的增强肽的反向序列。

[0374] 在另一些进一步实施方案中,根据本发明的Lck活化剂可以与接头部分(LM)偶联,该接头部分用于将Lck活化剂偶联至靶向部分以将Lck活化剂靶向递送至靶细胞并且/或者偶联至如本文所述的一种或多种其它Lck活化剂。所述接头基团可以例如与式III至VIII中任一者的Lck活化剂的聚阳离子肽(PP)或增强肽或其它肽(AP/P)偶联,如以下式IX至XI中所例示的。

[0375] LM-AP/P-PP 式IX

[0376] PP-AP/PA-LM 式X

[0377] C-PP-LM 式XI

[0378] LM-PP-C 式XII

[0379] LM-AP/P-PP-C 式XIII

[0380] C-PP-AP/P-LM 式XIV

[0381] AP/P-PP-LM 式XV

[0382] AP/P-PP-C-LM 式XVI

[0383] 在一些实施方案中,接头部分可以将Lck活化剂直接偶联至靶向部分。

[0384] 在其它实施方案中,接头部分可包含用于将一对Lck活化剂偶联在一起的桥接部分,其中所述Lck活化剂彼此相同或不同。

[0385] 接头部分(LM)可以任选地包括编码一个或多个酶裂解位点的氨基酸序列或者由编码一个或多个酶裂解位点的氨基酸序列组成,如下所举例说明的,以便在靶细胞表面或靶细胞内细胞内地发生酶裂解以释放一种或多种Lck活化剂。

[0386] 通常,接头部分包含用于将接头部分偶联至靶向部分的偶联部分。

[0387] 偶联部分可包含用于与靶向部分连接的任何合适的氨基酸或氨基酸序列,诸如半胱氨酸(C)氨基酸残基(用于与由靶向部分提供的末端半胱氨酸残基形成二硫桥)、赖氨酸残基(K),或选自例如KAA、CAA组成的组的用于使赖氨酸(K)或半胱氨酸(C)残基与接头部分的酶裂解位点(当存在时)间隔开的间隔区氨基酸序列,其中A是丙氨酸氨基酸残基。间隔区氨基酸序列可以进一步充当用于确定与所选靶向部分的附接的标记。在特别优选的实施方案中,偶联部分将包含一个或多个β氨基酸(例如,在KAA和CAA的情况下,丙氨酸残基可为β氨基酸)。

[0388] 在一个实施方案中,偶联部分是叠氮化物部分。

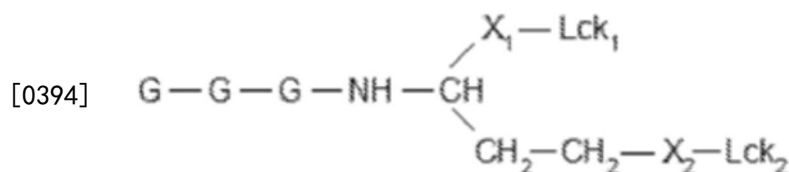
[0389] 在另一个实施方案中,偶联部分(例如叠氮化物部分)与二苯并环辛炔(DBCO)偶联。

[0390] 接头部分(LM)的所述一个或多个酶裂解位点可以选自由以下组成的组:组织蛋白酶裂解位点,例如GFLGFK(例如,参见Orban等人,Amino Acids,2011,41(2):469-483);基质金属蛋白酶(MMP)裂解位点,其实例包括MMP-9和MMP-2的裂解位点,诸如GPLGIAGQ、PAGLLGC和GPLGLWAQ(例如,参见Kratz F.等人,Bioorg Med Chem Letters,2001,11:2001-2006);前列腺特异性抗原(PSA)裂解位点,诸如KGISSQY和SSKYQL(Kumar SK等人,Bioorg Med Chem,2008,16(6):2764-2768;Niemela P等人,Clin Chem,2002,48(8):1257-1264);以及可被细胞内酶诸如谷胱甘肽-s-转移酶裂解的二硫桥(-S-S-),它们全部的用途均明确涵盖于本文。

[0391] 因此,接头部分(LM)可以例如包含如本文所述的偶联部分和/或酶裂解位点的各种组合或者由如本文所述的偶联部分和/或酶裂解位点的各种组合组成,如可以选自由以下组成的组:GFLGFK、KAAGFLGFK、CAAGFLGFK、GPLGIAGQ、KAAGPLGIAGQ、CAAGPLGGIAGQ、PAGLLGC、KAAPAGLLGC、CAAPAGLLGC、GPLGLWAQ、KAAGPLGLWAQ和CAAGPLGLWAQ等。在至少一些实施方案中,如本文所述的接头部分(LM)可包含多于一个酶裂解位点。

[0392] 重要的是,本发明人已经证明本文所述的肽未被MMP9裂解(数据未示出)。

[0393] 以下方案II中例示了根据如本文所述的实施方案的通过接头部分(LM)偶联在一起的一对Lck活化剂的实例。



[0395] 方案II:二聚体Lck活化剂的实例

[0396] 方案II中所示的二聚体Lck活化剂包含通过桥接部分偶联在一起的Lck活化剂

Lck1和Lck2。在这种情况下,桥接部分包含酶裂解位点X₁和X₂(例如,PSA和/或MMP氨基酸裂解序列),所述酶裂解位点经由谷氨酸(Glu)部分连接至具有三个甘氨酸(G)氨基酸残基(Gly³)的序列,从而形成用于通过如下文进一步描述的分选酶A介导的扎结将Lck活化剂偶联至靶向部分的偶联部分。酶裂解位点X₁和X₂可以彼此相同或不同。Lck1和Lck2可以例如各自独立地是选自以上式III至VIII中任一者的Lck活化剂,其中桥接部分例如与相应的聚阳离子肽(PP)、增强部分或其它肽(AP/P)的末端偶联,或者与二聚体的相应Lck活化剂的化合物(C)偶联。

[0397] 在本发明的实施方案中,还可以采用除Gly³以外的偶联部分。例如,偶联部分可包含具有3至5个甘氨酸氨基酸残基的序列、另一个氨基酸序列(例如3至5个氨基酸长),或其它合适的接头链。

[0398] 在另一些其它实施方案中,如本文所述的Lck活化剂、Lck活化剂的二聚体或其它多聚体可以通过树状大分子或其它合适的生理上可接受的支架/构架与一个或多个其它单独的Lck活化剂或Lck活化剂多聚体偶联。

[0399] 如本文所述的Lck活化剂进入细胞中可以经由许多机制进行,所述机制包括经由跨细胞外膜的扩散或通过例如受体介导的转运或内化,包括经由富含组织蛋白酶的溶酶体。

[0400] 如本文所述的用于使一种或多种Lck活化剂靶向的靶向部分可以通过使用与在细胞表面上或在靶细胞的组织环境中表达的受体或其它分子结合的靶向部分诸如配体、结合肽、抗体或其结合片段(诸如Fab和F(ab)₂片段)或单链可变片段(scFv)而获得。抗体靶向部分的实例包括抗CD3和抗CD4抗体(例如TRX1,Ng CH等人,Pharmaceutical Research,2006,doi:10.1007/s11095-005-8814-3)和BT-061(Humblet-Baron S和Baron F,Immunology&Cell Biology,2015,doi:10.1038/icb.2014.120)。可以利用的靶向部分还包括转铁蛋白、生物素、叶酸和透明质酸等,参见例如Ojima I.等人,Future Med Chem,2012,4(1):33-50,其全部内容通过交叉引用并入本文。

[0401] HIV(例如,HIV-1)例如经由包膜蛋白gp120与T淋巴细胞上表达的CD4结合,从而进入T细胞中。与CD4结合后,gp120蛋白产生的构象变化使病毒能够与淋巴细胞的共受体CCR5和/或CXCR4结合,从而使病毒能够与细胞融合。CD4、CCR5和CXCR4是可以根据本发明的实施方案进行靶向以将根据本发明的一种或多种治疗剂递送至淋巴细胞的细胞表面受体的实例。可以根据本发明进行靶向的靶细胞上的细胞表面受体或表面表达的分子的其它实例包括CD2、CD3、CD8、CD28和CD45(例如,CD45RA、CD45RB和CD45RO同种型)。

[0402] 可以根据本发明的实施方案进行靶向以将一种或多种治疗剂递送至靶细胞的进一步分子的实例包括整联蛋白家族成员及其亚基、细胞间粘附分子(ICAM)激素受体、神经递质受体、受体酪氨酸激酶受体、G蛋白连接受体、生长因子受体、跨膜蛋白酶受体、细胞表面蛋白聚糖、CD44、CD55、Fcγ受体、癌胚抗原(CEA)、透明质酸受体、转铁蛋白受体、叶酸盐受体、前列腺特异性膜抗原、血管细胞粘附分子、基质蛋白(诸如纤连蛋白、胶原玻连蛋白和层粘连蛋白)。

[0403] 化学治疗剂伊巴珠单抗(Ibalizumab)(原名TNX-355)(Bruno CJ和Jacobson JM,J Antimicrobial Chemotherapy,2010,doi:10.1093/jac/dkq261)靶向CD4并且可以用作靶向部分,用于根据本发明将一种或多种Lck活化剂递送至靶细胞,用于治疗根据本发明的癌

症或其它疾病或病状的其它药物也一样。同样,也可以利用与CD4(例如,OKT4)或CXCR4结合的抗体或其抗体结合片段。

[0404] 在一些实施方案中,Lck活化剂可以与治疗性靶向抗体一起单独施用或与靶向抗体缀合作为抗体-药物缀合物(ADC)施用。例如,针对程序性死亡配体-1(PD-1)受体或在肿瘤特异性T细胞上表达的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)受体的抗体(其抑制这些受体对T细胞活化和IL-2产生的抑制作用),诸如分别为曲美木单抗(tremelimumab)/伊匹单抗(ipilimumab)(Yervoy)或MSB0010718C,可以与本文所述的Lck活化剂缀合以形成ADC,用于治疗此类抗体靶向的癌症,诸如黑素瘤、肾癌和肺癌(Ott PA,OncLive,2014年2月21日线上发布)。先前也已经使用通过Lck活化剂介导其作用的双特异性串联scFv配体,描述了CTLA-4受体从T细胞的抑制剂向活化剂的转化(Madrenas J等人,J Immunol,2004,172:5948-5956和Tefft WA等人,BMC Immunology,2009;doi:10.1186/1471-2172-10-23,Tefft WA等人,BMC Immunology,2009;doi:10.1186/1471-2172-10-23)。因此,根据本发明的实施方案,scFv与如本文所述的Lck活化剂的缀合可以进一步促进T细胞活化。作为进一步实例,本领域技术人员已知的双特异性抗体可用于将例如本文所述的PEG-缀合的Lck活化剂与针对细胞表面受体例如CD28的抗体连接。

[0405] 在本发明的实施方案中用作靶向部分的抗体或其结合片段(诸如Fab、F(ab)₂和Fv片段)将理想地对所选靶分子具有特异性,因此一般将包含单克隆抗体或其结合片段。单克隆抗体及其结合片段的产生是众所周知的。嵌合和人源化单克隆抗体以及所述嵌合和人源化单克隆抗体的结合片段是特别优选的。嵌合抗体可以例如通过用人抗体的Fc区取代对靶标分子有特异性的非人抗体的Fc区来提供。可以通过使用如本领域中也已知的重组DNA技术将非人(例如小鼠、大鼠、绵羊或山羊)单克隆抗体的Fab片段的可变区中的互补决定区(CDR)剪接到人抗体支架中来提供人源化抗体如。

[0406] 如上所述,单链可变片段(scFv)及其多聚体形式,例如二价scFv(例如串联scFv和双抗体)、三价scFv(三抗体)和四价scFv(四抗体)也可以在本发明的实施方案中用作靶向部分,其中特别优选使用双抗体。可用于本发明的实施方案中的scFv可包含通过氨基酸接头序列(AAL)以两种可能的取向V_L-AAL-V_H或V_H-AAL-V_L中的任一种取向接合在一起的人源化或天然抗体重链(V_H)和轻链(V_L)。接头序列的长度可以根据是要形成单体scFv、双抗体、三抗体还是要形成四抗体而变化。scFv的接头序列(AAL)的长度通常将在约5至约30个氨基酸的范围内,并且更一般地在5至25个氨基酸的范围内。对于双抗体的形成,接头序列的长度一般将为约5个氨基酸,由此使scFvs二聚化。对于三抗体,接头序列的长度可以仅为1或2个氨基酸。用于体内成像和疗法的scFv(包括双抗体)的设计例如在Todorovska A.等人,J Immunol Methods,2001,Feb 1;248(1-2):47-66,Wörn A.和Plückthun A.,J.Mol.Biol.,2001,305,989-1010,以及Ahmed Z.A.等人,Clinical and Developmental Immunology,2012卷,文章编号980250,Hindawi Pub.Corp.中有描述,这些文献的全部内容都通过交叉引用并入本文。

[0407] 当将scFv用作靶向部分时,如本文所述的各个Lck活化剂可以与它的V_H和/或V_L链的游离末端经由包含一个或多个如本文所述的酶裂解位点的接头部分偶联。即,两个如本文所述的Lck活化剂可以与scFv偶联,其中一个Lck活化剂与V_H链的游离末端偶联,而另一个与V_L链的游离末端偶联,其中Lck活化剂可以相同或不同。

[0408] 同样,如本文所述的Lck活化剂可以经由通常包含一个或多个如上所述的酶裂解位点的接头部分,以任何合适的方式与抗体、其一个或多个结合片段,或其它靶向部分偶联。

[0409] 在另一些其它实施方案中,可以利用重组DNA技术将如本文所述的Lck活化剂掺入到靶向部分本身(例如,抗体、抗体结合片段或scFv)中。在此类实施方案中,Lck活化剂可以在Lck活化剂的每个末端处通过包含一个或多个酶裂解位点(例如组织蛋白酶裂解位点)的相应偶联部分与靶向部分偶联,所述偶联部分将Lck活化剂在每个末端处接合至靶向部分。在此类实施方案中,可以将Lck活化剂掺入在靶向部分中任何合适的位置处,该位置不损害靶向部分的结合或靶向功能,并且允许酶裂解位点在使用中裂解。例如,如本文所述的各个Lck活化剂可以上述方式插入到scFv的V_H和V_L链之一或二者中,同时保留scFv的结合或靶向功能,其中例如,Lck活化剂侧接选自MMP和PSA裂解序列的酶裂解序列。例如,已将特异性靶向 β 6整联蛋白亚基而不靶向其它 α V相关 β 整联蛋白亚基的17聚体肽(即,VPNLRGDLQVLAQKVA)插入到MFE-23的CDR H3环中,MFE-23是一种与癌胚抗原(CEA)具有反应性的鼠scFv。

[0410] 本发明明确涵盖采用多于一个靶向部分来靶向靶组织或靶细胞表面的不同位点,或作为将免疫效应细胞募集到靶细胞的手段的双特异性靶向方案(例如,Weidle UH.等人,Cancer Genomics&Proteomics,2013,10:1-18最近综述的双特异性抗体靶向)。即,如本文所述的单个Lck活化剂可以掺有两个不同的靶向部分,以使不同的靶分子彼此靶向。例如,可以提供用于靶向两个不同的靶分子诸如HER2和CD4的双特异性串联双scFv,例如,在相应的V_H和V_L链对之间具有一个或多个酶(例如,MMP和/或PSA)裂解序列。

[0411] 明确涵盖包含如本文所述的聚阳离子肽和任选增强肽或其它肽(AP/P),并且有或无本文所述的靶向部分和/或偶联部分的呈嵌合蛋白(即融合蛋白)形式的Lck活化剂,它们在本发明方法中的用途也一样。

[0412] 例如,公认的是,细胞免疫反应随着衰老而降低。具体而言,已经证实来自老年患者的T淋巴细胞中淋巴细胞增殖显著降低,并且这与Lck活性的显著降低相关(Fulop T Jr等人,Experimental Gerontology,1999,34(2):197-216)。因此,特异性Lck活化剂的防治性施用在预防或降低老年人中使人衰弱的感染的发生率或严重程度方面可能特别有益。而且,失去适当的T细胞免疫反应是癌症化学疗法的副作用,这突出表明需要组合使用Lck活化剂来克服与靶向多种酪氨酸激酶的癌症疗法相关的免疫抑制。除了Lck活化在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤中克服对抗癌药物的抗药性以及细胞周期进展抑制中的潜在作用以外,Lck活化在多种病原性感染(病毒性、细菌、真菌、原生动物和寄生虫)以及与Lck缺乏相关的各种疾病的管理中也有关。

[0413] 免疫系统的T淋巴细胞是由胸腺产生的,并且可以在特定组织(诸如皮肤、淋巴结)和粘膜组织(诸如口腔、肺气道、肠和阴道的粘膜组织)中循环并驻留。上皮内T细胞在体内平衡和防御恶性肿瘤方面起关键作用。诸如皮肤、肠、肺等上皮组织处于持续的环境暴露下,并且形成抵御入侵微生物的第一道防线。小鼠体内缺乏上皮内T细胞(已知其会表达Lck)导致肿瘤排斥的缺陷。具体而言,上皮内此类T细胞的存在是下调包括黑素瘤在内的上皮恶性肿瘤所需的(Girardi M等人,Science,2001,294(5542):605-9;Schon MP等人,J Invest Dermatology,2003,121:951-962)。胸腺内此类组织特异性T细胞的成熟具有Lck依

赖性,并且这些细胞有助于防御病原性感染及其病理影响(例如,疟疾的病原性感染及其病理影响)(Inoue S-I等人,PNAS USA,2012,109:12129-12134)。而且, γ - δ (γ/δ)T细胞在针对原动物寄生虫、细菌和病毒感染的免疫反应中起重要作用。此类T细胞的组织特异性定位是皮肤中免疫监督的必要条件(Jamieson JM等人,Frontiers in Bioscience,2004,9:2640-2651;Schon MP等人,J Invest Dermatology,2003,121:951-962。

[0414] 在几个T细胞系中,已经证实活化的Lck蛋白会在缺乏抗原刺激的情况下刺激作为T细胞活化标志的白细胞介素2(IL-2)产生(Luo K和Sefton BM,Mol Cell Biol,1992,12(10):4724-4732。

[0415] 调节性T细胞(Treg)是不同于 γ/δ T细胞的T细胞子集,在阻抑对癌症的免疫反应中起关键作用。Treg占外周CD4⁺T细胞库的5-10%,其通过IL-2R α 和转录因子FOXP3的组成型表达来识别。

[0416] 已知肿瘤浸润淋巴细胞内FoxP3 Treg的存在与各种类型的人类癌症预后不良相关,并且IL-21由于其能够促进T细胞反应和抵消Treg介导的对免疫系统的阻抑作用而促进抗肿瘤免疫力(Kannappan V等人,Cancer Immunol Immunother,2017,66(5):637-645)。

[0417] 本发明人已经证明,本发明的Lck活化多肽会增加细胞的IL-21分泌(例如图28)。因此,本文所述的Lck活化多肽具有减少离体或体内的Treg数量的潜力。实际上,本发明人已经证明本文所述的Lck活化多肽会减少体外Treg。

[0418] 重要的是,本发明人已惊人地证明本文所述的用于活化Lck的肽选择性地活化Lck,而不会活化其它Src家族激酶。例如,图2证明Blk、cSrc、Fgr、Fyn、Hck、Lyn和Yes未被本文所述的用于活化Lck的肽活化。

[0419] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了增加Lck激酶活性的方法,所述方法包括使Lck激酶与包含如本文所述的肽的组合物接触。

[0420] 在一个实施方案中,将肽或包含该肽的药物组合物施用于受试者以增加体内Lck的活性。

[0421] 如本文所用,术语“增加活性”和“活化”一般是指激酶活性,诸如磷酸转移酶活性的增加(例如,增加Lck激酶的Y394磷酸化)。例如,激酶的酶活性的活化是指与不存在活化剂的情况下的相同活性相比,在存在活化剂的情况下激酶的活性的任何增加。术语活化蛋白激酶还包括自体磷酸化的增加,活化后从一个细胞内位置到另一细胞内位置的移动的增加,与将激酶锚定在给定位置的一种或多种蛋白的结合或从将激酶锚定在给定位置的一种或多种蛋白的释放的增加,蛋白激酶的其它活性或功能的增加。这种增加可以通过任何方式引起,所述方式包括(但不限于)增加蛋白激酶与蛋白激酶结合伴侣之间形成复合物的可能性,或增加一旦结合至其靶标时的激酶活性。此类活化可以在体内或体外发生。

[0422] 激酶的酶活性可以通过本领域技术人员已知的多种方法,例如,以下公开的方法进行监测:Parker, Law等人,(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等人(2001),Journal of Biomolecular Screening 6(4):255-64;Liu,F.,X.H.Ma等人(2001).“Regulation of cyclin-dependent kinase 5and casein kinase 1by 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等人(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。

[0423] 使用此类标准方法,将含有目标激酶的样品在适当条件下暴露于放射性ATP和适当组成的合成肽底物,以提供磷酸化位点。然后测量与该肽新缔合的放射性磷酸盐。化学部分(诸如与底物肽共价连接的生物素)的添加允许链霉亲和素包被的珠粒结合底物肽。可以分离珠粒结合的肽并测量相关的放射性,或者优选地,可以使用适于临近闪烁测定法的珠粒直接测量与底物肽相关的放射性。

[0424] 肽底物的磷酸化也可以经由磷酸特异性抗体的直接结合或通过测量磷酸特异性抗体从竞争磷酸肽中的置换来检测(参见,例如,Parker, Law等人,2000,Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization:nuclear receptor-ligand binding and kinase/phosphatase assays,J.Biomolec.Screening5 (2):77-88)。诸如荧光共振能量转移(FRET)或荧光偏振(FP)的荧光法可用于检测特异性磷酸肽-抗体复合物。这些方法的优势在于,它们采用“均质”检测,该检测不依赖于结合物质的分离,而是依赖于由于溶液中的特异性结合而发生的荧光变化。

[0425] 产生磷酸特异性抗体的方法是本领域众所周知的。在一个实施例中,在1999年10月15日提交的,Bibb等人的标题为“Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signalling”的美国专利申请序列号09/419,379,以及2000年10月13日提交的,Bibb等人的标题为“Methods of Identifying Agents That Regulate Phosphorylation/Dephosphorylation in Dopamine Signalling”的美国专利申请序列号09/687,959(其各自通过引用整体并入本文)中公开的方法用于产生对磷酸化靶标具有特异性的磷酸化状态特异性抗体。

[0426] 针对磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸或磷酸酪氨酸的磷酸化状态特异性抗体是可商购的。这些抗体可用于确定总体上蛋白质是否被磷酸化以及在哪个残基上磷酸化。此类抗体可从商业来源获得(关于商业来源列表,参见例如Smith,The Scientist 15[4]:24,2001年2月19日,包括Santa Cruz Biotechnology Inc.;Sigma RBI,Stratagene;Upstate Biotechnology和Zymed)。

[0427] 荧光共振能量转移或FRET广泛用于能够检测大分子的特异性结合的均质测定中。FRET依赖于激发的“供体”荧光分子(荧光团)将其能量转移到附近的“受体”荧光团而不是发光的能力。因此,当两个荧光团通过与底物靶结合而在空间上聚集在一起时,以正常供体波长发射的荧光减少,并且受体荧光团发射的荧光增加。供体荧光的减少或受体荧光的增加可用于测量结合事件。

[0428] 评估激酶活性的合适方法包括,Bader等人(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)中公开的用于确定例如磷酸二酯酶、激酶或蛋白磷酸酶的活性的方法。Bader等人公开了基于时间分辨的荧光共振能量转移(“FRET”)的用于高通量筛选的cGMP依赖性蛋白激酶测定法,如本领域技术人员将理解的,该cGMP依赖性蛋白激酶测定法可适用于磷

酸二酯酶或蛋白磷酸酶的测定。将含有目标激酶的样品暴露于ATP和具有激酶特异性磷酸化位点和氨基末端生物素部分的合成肽底物。使用别藻蓝蛋白标记的链霉亲和素、磷酸肽特异性抗体和铈螯合物标记的二抗检测磷酸化肽。链霉亲和素和磷酸化特异性抗体与磷酸化底物分子的同时结合使二抗上的铈螯合物“供体”足够接近于别藻蓝蛋白荧光团“受体”以使荧光共振能量转移发生,可作为615nm的铈发射减少和665nm波长的别藻蓝蛋白发射增加测量。为了利用激发的铈的长荧光寿命,通常使用铈-别藻蓝蛋白供体-受体对,因此信号是“时间分辨的”。

[0429] 可以使用其它成对的荧光团,诸如香豆素和异硫氰酸荧光素。可以参与荧光共振能量转移(FRET)的此类分子对称为FRET对。为了使能量转移发生,供体和受体分子通常必须非常接近(高达70至100 Å (Clegg,1992,Methods Enzymol.211:353-388;Selvin,1995,Methods Enzymol.246:300-334)。能量转移的效率随着供体和受体分子之间的距离迅速下降。FRET中常用的分子包括荧光素、5-羧基荧光素(FAM)、2'7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、若丹明、6-羧基若丹明(R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA)、6-羧基-X-若丹明(ROX)、4-(4'-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸(DABCYL)和5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)。荧光团是供体还是受体,由其激发光谱和发射光谱,以及与之配对的荧光团来界定。例如,FAM受波长为488nm的光最有效地激发,并且发射光谱为500至650nm且发射最大值为525nm的光。FAM是用于与JOE、TAMRA和ROX(其全部在514nm处具有激发最大值)一起使用的适合的供体荧光团。

[0430] 荧光偏振测量也可以用于测量磷酸二酯酶、蛋白激酶或磷酸酶的活性(参见,例如,Parker,Law等人,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等人,2001,Anal.Biochem.299:45-53)。

[0431] 大的特异性抗体与荧光小磷酸肽的结合减缓它的翻滚速度并增加荧光偏振信号。因此,荧光偏振与结合的荧光磷酸肽的量成比例。该测定法可以竞争模式使用,其中将固定浓度的荧光肽和抗体添加到生物样品中,并且将非荧光磷蛋白或磷酸肽的存在记录为信号的减少。它也可以直接结合模式使用,在直接结合模式中磷酸盐的添加(例如通过激酶)或磷酸盐的去除(例如通过磷酸酶)调节抗体结合并因此调节偏振信号。在具体的实施方案中,使用其中采用产物特异性抗磷酸化肽特异性(例如,抗磷酸-丝氨酸)抗体的Turek等人(2001,Anal.Biochem.299:45-53)的方法执行荧光偏振测定。

[0432] 其它合适的评估激酶活性的方法包括基于细胞的磷酸化测定法。例如,在体内,例如在单个活细胞中使用荧光指示剂,使用诸如Sato等人(2002,Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells,Nature Biotechnology 20(3):287-94)公开的方法使基于蛋白质磷酸化的信号转导可视化。此类感受器由两个被柔性接头隔开的荧光蛋白分子组成。接头肽含有磷酸化位点和磷蛋白识别元件。接头的磷酸化引起构象变化,使两种荧光蛋白非常接近,从而允许FRET发生并改变系统的荧光输出。

[0433] Lck基因异常与疾病

[0434] 许多人类疾病是由Lck基因座处的异常引起的,并且一个实例是T细胞急性淋巴母

细胞性白血病 (Converse PJ, 2003年9月24日. Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase; Lck. Online Mendelian Inheritance in Man., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=153390.in>)。另外, 大多数与AML有关的DNA变化发生在人的一生中, 而不是在出生前遗传的。这些获得性变化中的一些可能具有外部原因, 如辐射或致癌的化学药品, 但在大多数情况下, 它们发生的原因是未知的 (<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-what-causes>)。

[0435] 免疫反应中的IL-2/IL-2R α (CD25) 轴

[0436] 在慢性感染和癌症中, T细胞暴露于持久性抗原和/或炎症信号。这种情形往往与T细胞功能的恶化: 一种称为“耗竭”的状态 (Wherry EJ和Kurachi M, Nature Reviews Immunology, 2015, 15:486-499) 相关。耗竭T细胞失去稳健的效应子功能, 在信号检查点表达多种抑制性受体 (诸如PD-1、LAG3、CD160或2B4), 并通过改变的转录程序进行界定。然而, 耗竭T细胞的复苏可以重新激发免疫力, 从而为持久性感染 (诸如HIV-1、丙型肝炎病毒) 以及为癌症提供新的治疗靶标 (Wherry和Kurachi, 见上文)。

[0437] 最初活化后, CD8+T细胞产生大量IL-2, 但随后进入短暂的不应期, 在此期间它们保持一些效应子功能, 但丧失了产生IL-2的能力。在这个时段期间, CD8+T细胞依赖于CD4+T细胞提供的外部IL-2来持续增殖并恢复其全部功能 (在Cox MA等人, Trends Immunol, 2001, 32 (4):180-186中有综述)。IL-2通过由CD24 (IL-2R α)、CD122 (IL-2R β) 和 γ 亚基组成的三聚体受体进行信号传导。CD25不是组成性表达的, 但是在暴露于炎性细胞因子 (诸如IL-12和IL-2) 后上调, 这些炎性细胞因子本身会调节CD25表达的量 and 持续时间, 进而控制反应细胞接收IL-2依赖性信号的能力, 从而影响T细胞效应子和记忆库的形成 (Cox等人, 见上文)。

[0438] CD4+T细胞是IL-2的主要产生者, 并与CD8+T细胞协同作用以促进反应的初始扩展以及可引发保护性次级反应的持久性记忆细胞的形成。重要的是, CD4+T细胞分泌IL-2不仅上调反应性CD8+T细胞的CD25表达, 而且还提供了IL-2的来源, 从而增加了CD25⁺CD8+T细胞的增殖 (Cox等人, 见上文, Obar JJ等人, PNAS USA, 2010, 107 (1):193-198)。而且, 已经证明在缺乏外源刺激的情况下, IL-2导致CD25阴性T淋巴细胞上IL-2受体的 α 链的剂量依赖性表达 (Sereti I等人, Clin Immunol, 2000, 97 (3):266-76)。因此, CD4⁺T细胞, 或CD8+T细胞上CD25表达的缺乏限制了病原体特异性反应的扩展阶段。因此, 细胞因子受体 (诸如CD25) 的表达的调节可能是效应细胞生成中的限速步骤, CD25的表达越高, 使细胞接收越强的IL-2信号 (Cox等人, 见上文)。

[0439] 除了CD25表达在响应于慢性败血症和癌症调节效应细胞和记忆细胞功能中的重要性外, 还已发现表达CD25的CD8+T细胞是在年老时的有效记忆细胞, 并且在老年人中这些细胞的积聚似乎是在年老时在缺乏原初T细胞的情况下完整免疫反应的先决条件 (Herndler-Brandstetter D等人, J Immunology, 2005, 175:1566-1574)。这一发现提出了新疫苗接种途径的建议, 该新疫苗接种途径旨在支持具有免疫能力的CD8+CD25⁺记忆T细胞在老年群体中长期存活 (Herndler-Brandstetter等人, 见上文)。

[0440] 本发明人已经证明本文所述的肽增加人PBMC和CD4+T细胞 (实施例15, 图17) 和CD8+T细胞 (实施例28, 图25) 上的IL-12RB2表达。因此, 本文所述的Lck活化肽可用于增强本文

所述的IL-12R和IL-12的生理作用。

[0441] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-12分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0442] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的IL-12分泌水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的IL-12分泌水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的IL-12分泌水平增加。

[0443] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-12R表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0444] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体上的IL-12R表达水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的IL-12R水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体上的IL-12R表达水平增加。

[0445] 在一个实施方案中,IL-12R为IL-12RB1和/或IL-12RB2。

[0446] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的IL-12反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0447] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体对IL-12的反应性水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体对IL-12的反应性水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体对IL-12的反应性水平增加。

[0448] 在优选的实施方案中,所述细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或NK细胞。

[0449] 如以上所讨论的,本文所述的方法可以在体内(例如受试者体内)或体外(例如离体)的细胞群体的细胞上执行。

[0450] 在慢性病毒感染或荷瘤状态期间,由于反应性抗原特异性T细胞的效应子功能和增殖能力的逐步损伤,T细胞的记忆形成和功能发生实质性改变,所述逐步损伤最终影响赋予宿主保护作用的能力(Jin H-T等人,BMB Reports,2011,44(4):217-231)。在肿瘤环境中,CD8⁺肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)显示低水平的CD25(IL-2R α)表达,因此对IL-2信号传导不应,表明它们无法增殖、产生效应细胞因子并且无法分化为功能性记忆细胞(Mumprecht S等人,Blood,2009,114:1528-1536)。例如,在逆转录病毒诱导的鼠CML模型中,CML特异性CD8⁺T细胞表现出效应细胞因子(诸如IFN- γ 、TNF α 和IL-2)的产生减少(Mumprecht等人,见上文)。

[0451] CD25表达与NK细胞的细胞毒活性呈正相关。本发明人已经证明Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)也会增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中NK细胞上的CD25相对表达(数据未示出)。

[0452] 因此,在一方面,本发明提供了增强细胞毒性细胞功能的方法,所述方法包括使细胞毒性细胞或细胞毒性细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0453] 在一个实施方案中,本发明提供了减少T细胞耗竭的方法,所述方法包括使T细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0454] 术语“耗竭”是指T细胞耗竭,是由于在许多慢性感染和癌症期间发生的持续TCR信

号传导引起的T细胞功能障碍的状态。它与无能的区别在于,它不是通过不完全或不足的信号传导产生的,而是由持续的信号传导产生的。它由不良的效应子功能、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应细胞或记忆T细胞的转录状态界定。耗竭妨碍对感染和肿瘤的最佳控制。耗竭可由外在的负调节途径(例如免疫调节细胞因子)以及细胞内在的负调节(共刺激)途径(PD-1、B7-H3、B7-H4等)引起。在一个实施例中,耗竭的降低水平为至少10%,可替代地20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。测量耗竭的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0455] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的T细胞或T细胞群体的T细胞功能水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的T细胞或T细胞群体的T细胞功能水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,T细胞或T细胞群体的耗竭水平降低。

[0456] 在清除抗原和/或炎症的急性感染情况下,效应CD8⁺T细胞进一步分化为功能性记忆CD8⁺T细胞,其可以产生多种细胞因子(IFN- γ 、TNF α 和IL-2)并在继发感染后产生强大的回忆反应。相比之下,在慢性感染期间,抗原和炎症在效应阶段后持续存在。随着感染的持续和T细胞刺激的持续,T细胞以分层的方式丧失效应子功能并变得耗竭。通常,诸如IL-2产生和细胞因子多功能性等功能以及高增殖能力在早期丧失。接下来是IFN- γ 和TNF α 产生中的缺陷。T细胞耗竭还伴有上面所指出的抑制性受体的量和多样性的逐渐增加,这些抑制性受体在与它们各自的配体结合后会导致T细胞功能失调。

[0457] 鉴于多种抑制性受体的共表达是T细胞耗竭的主要特征,已证明同时靶向这些受体会导致T细胞耗竭的协同逆转(Wherry和Kurachi,见上文)。例如,在慢性LCMV感染中,同时阻断小鼠的IL-10和程序性死亡受体1(PD-1)途径导致CD8⁺T细胞耗竭的协同逆转并增强病毒控制,如同将IL-2治疗与阻断PD-1途径相结合一样(Wherry和Kurachi,见上文)。另外,在LCMV小鼠模型中,已经证实在LCMV感染后,具有CD25功能的CD8⁺T细胞扩增的数量是CD25缺陷型T细胞的5倍(Bachmann MF等人,Eur J Immunol,2007,37:1502-1512)。而且,这些研究人员证实,与其中CD8⁺T细胞的诱导和维持很大程度上不依赖于CD25信号传导的急性/已消退的感染相反,CD25信号传导对于持续病毒感染期间病毒特异性CD8⁺T细胞的维持至关重要。

[0458] 另一种抑制性受体CTLA-4在慢性HIV感染中在CD4⁺T细胞中选择性上调,但在CD8⁺T细胞中不上调,这与T细胞响应于病毒抗原产生IL-2的能力下降有关,表明可逆性免疫调节途径与CD4⁺T细胞功能异常选择性相关(Kaufmann DE等人,Nature Immunology,2007,8:1246-1254)。T细胞功能的分级丧失与抗原暴露的持续时间、炎症以及抑制性分子(PD-1、CD160、2B4)表达增加相关(Wherry J等人,Nature Immunology,2011)。继而,CD4⁺/CD8⁺T细胞的细胞因子分泌减少(例如,IL-2、TNF α 和IFN- γ)。与此同时,在诸如慢性感染的HIV-1患者的慢性败血症的情况下,HIV特异性CD8⁺T细胞的表型揭示检查点分子(例如PD-1、CD160)的积聚。

[0459] T细胞耗竭很可能是慢性HIV感染期间病原体清除失败的重要因素,并且部分受到负面调节途径的调节(在Porichis F和Kaufmann DE,Curr Opin HIV AIDS,2011,6(3):174-180中有综述)。例如,在感染了HIV的受试者中,CD4⁺T细胞而不是CD8⁺T细胞中的CTLA-4抑制性免疫调节受体以及程序性细胞死亡受体-1(PD-1)上调(Kaufmann DE等人,Nature

Immunol, 2007, 8:1264-1254)。这与CD4⁺T细胞无法响应于病毒抗原产生IL-2有关。来自HIV患者的T细胞产生IL-2的能力受损,对回忆抗原的增殖反应在HIV感染早期受到扰乱并且可以在体外通过IL-2恢复(Fauer AS和Pantaleo G(编辑), Immunopathogenesis of HIV infection, Springer, doi:10.1007/978-3-642-60867-4, 第41-42页)。

[0460] 因此,在高抗原水平的情况下阻抑HIV特异性CD4⁺T细胞的增殖可能是限制病毒特异性CD4⁺T细胞的前体频率的机制(McNeil AC等人, PNAS USA, 2001, 98:13878—3883)。而且,用PD-L1封闭性抗体阻断PD-1途径会增加HIV特异性CD4⁺T细胞的增殖(Porichis和Kaufmann, 见上文)。

[0461] 但是,不仅CD4⁺T细胞在随后的抗原攻击后变得耗竭且无效,而且CD8⁺T细胞也是如此。在HIV感染中,CD4⁺T细胞的损失与递增的CD8⁺T细胞耗竭和疾病进展相关,并且CD4⁺T细胞反应的变化对CD8⁺T细胞耗竭的影响是高度相关的(Wherry EJ和Kurachi M, Nature Reviews, 2015, 15:486-499)。耗竭CD8⁺T细胞也具有高的PD-1表达,而衰老细胞则没有(在Wherry和Kurachi中有综述,见上文)。而且,已证明将IL-2治疗与PD-1介导的抑制途径的阻断相结合对重新激发耗竭CD8⁺T细胞和降低病毒载量具有显著的协同作用(Wherry和Kurachi, 见上文)。HIV-1特异性CD8⁺T细胞的离体增殖关键取决于IL-2(Lichterfield M等人, JEM, 2004, 200:701-712)。总的来说,在慢性感染中,HIV特异性CD8⁺T细胞功能的丧失可以通过增强HIV特异性CD4⁺T细胞辅助功能来恢复。

[0462] T细胞耗竭的另一种表型标志是CD8⁺T细胞上的Tim-3表达,这提示了同时靶向Tim-3和PD-1可能是克服慢性病毒感染中CD8⁺T细胞功能障碍最有效的方式(Jin HT等人, PNAS USA, 2010, 107(33):14733-8)。而且,最近的文献报道强调了Lck相对于Tim-3在CD8⁺T细胞耗竭中的潜在重要性。例如,半乳糖凝集素-9(一种Tim-3的生理配体)与受体磷酸酶CD45结合,磷酸酶CD45,当以高水平存在时,会使Lck上的Y394去磷酸化,从而降低Lck活性(Clayton KL等人, J Immunol, 2014, 192(2):782-791)。

[0463] 此外,半乳糖凝集素-9能够增加CD3信号传导筏内Tim-3以及CD45的水平,并且已提出突触处这种磷酸酶的高浓度是借此对Lck进行负调节,导致TCR信号传导减弱的方式(Clayton KL等人, J Immunol, 2014, 192(2):782-791)。另外,对通过TCR与抗CD3/CD28的扎结而活化的T细胞的细胞裂解物的分析导致Lck募集至Tim-3,并且还提出Tim-3整合Lck会耗尽细胞内Lck库,从而通过禁止TCR链上ITAM基序的磷酸化而导致TCR不完全活化(Tomkowicz B等人, Plos One, 2015, 10(10):e0140694 (doi:10.1371/journal.pone.0140694))。

[0464] 在癌症中,现在很清楚的是,肿瘤会选择某些免疫检查点途径作为免疫抗性的主要机制,尤其是针对对肿瘤抗原具有特异性的T细胞,并且用细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)和程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)的抗体阻断剂进行的临床试验已经证明抗肿瘤免疫力随产生持久临床反应的潜力而增强(Pardoll DM, Nature Reviews Cancer, 2012, 12:252-264)。

[0465] 即使CTLA-4由活化的CD8⁺效应T细胞表达,CTLA-4的主要生理作用似乎也会凭借对CD4⁺T细胞的两个主要子集的不同作用:下调辅助T细胞活性和增强调节性T (Treg) 细胞免疫抑制活性(在Pardoll中有综述,见上文)。然而,在癌症免疫疗法中阻断PD-1途径也可通过减少肿瘤内Treg细胞的数量和/或阻抑活性来增强免疫反应(Pardoll, 见上文)。而且,

PD-1阻断不仅增强组织和肿瘤微环境中效应T细胞的活性,而且还可能通过对PD-1B细胞的直接作用来增强肿瘤中的自然杀伤细胞活性和抗体的产生(Pardoll,见上文)。在癌症中,表达的主要PD-1配体为PD-L1,并且在几乎所有癌症类型中都发现了PD-L1的高表达(Pardoll,见上文)。因此,将单独或组合靶向一个或多个抑制性检查点的治疗视为拥有系统性控制癌症的巨大潜力(Allison JP, JAMA, 2015, 314 (11) :1113-1114; Creelan BC, cancer Control, 2014, 21 (1) :80-9)。

[0466] 本发明人已经证明,本文所述的肽活化Lck,如图1、2、4、5和6所示,并增加Lck在Y394处的磷酸化,如图3和图40所示。

[0467] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的Lck的生理作用。

[0468] 在一个实施方案中,本发明提供了增加Lck活性的方法,所述方法包括使Lck激酶与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。本发明还提供了增加Lck激酶的Y394磷酸化的方法,所述方法包括使Lck激酶与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0469] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触时的Lck活性水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的Lck的活性(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,与如本文所述的Lck活化肽接触的Lck活性增加。类似地,当将与如本文所述的Lck活化肽接触的Lck激酶的Y394磷酸化水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的Lck激酶的Y394磷酸化水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,Lck激酶的Y394磷酸化水平增加。

[0470] 本文描述了Lck的活性,包括Lck活化的下游效应。

[0471] 如本文所用,术语“接触”是指在体外系统或体内系统中将指定部分(例如如本文所述的Lck活化肽和Lck激酶)聚集在一起。例如,使蛋白激酶与如本文所述的活化剂“接触”包括向具有该激酶的个体或患者(诸如人)施用本发明的化合物,以及例如将如本文所述的活化剂引入到含有含该激酶的细胞或纯化制品的样品中。

[0472] 本发明人还证明了本文所述的肽增加人T细胞的IL-2分泌(图7、图8、图9、图29、图33、图34、图35和图37)。重要的是,用本文所述的Lck活化肽预处理细胞会增加在T细胞随后受到刺激时的IL-2分泌(例如参见图29)。

[0473] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的IL-2的生理作用。

[0474] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-2分泌的方法,所述方法包括使细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0475] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的IL-2分泌水平与未与本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的IL-2分泌水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的IL-2分泌水平增加。

[0476] 在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。

[0477] 本发明提供了诱导细胞增殖的方法,所述方法包括使细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0478] 如本文所用,术语增殖包括细胞数量的增加,或细胞或细胞群体的细胞分裂次数的增加,并且与术语扩增可互换使用。在一个实施方案中,当将与如本文所述的Lck活化肽

接触的细胞或细胞群体的增殖水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的细胞增殖水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的细胞增殖水平增加。

[0479] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0480] 在一个实施方案中,所述细胞是或者所述细胞群体包含选自由以下组成的组的细胞:CD4+T细胞、CD8+T细胞、NK细胞或树突细胞。

[0481] 在另一个实施方案中,所述细胞是或者所述细胞群体包含原初细胞。

[0482] 在一个优选的实施方案中,所述方法在体内或体外的细胞或细胞群体上执行。在另一个优选的实施方案中,所述方法在离体的细胞或细胞群体上执行。

[0483] 在另一个实施方案中,本发明提供增加动物中细胞或细胞群体的增殖的方法,所述方法包括向动物施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0484] 通常以有效量施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。如本文所用的术语“有效量”(例如“治疗有效量”或“药物有效量”)是指如本文所述的Lck活化肽的允许Lck激酶活性活化,或增加或降低分子或细胞反应的量。所述“有效量”将因受试者而异,这取决于个体的年龄和总体状况,并且会随着诸如所治疗或所预防的特定病状、治疗的持续时间、先前的治疗以及病状的性质和先前存在的持续时间等因素而变化。

[0485] 在一些实施方案中,如本文所述的Lck活化肽通常以有效量施用于无疾病或病状症状的受试者以活化Lck,例如施用于任何年龄的健康个体。

[0486] 具体地,活化剂的有效量界定了可以施用于受试者而没有过度或不可耐受的毒性、刺激、变态反应或其它问题或并发症的Lck活化肽的量,该量与合理的收益/风险比相称,但是正如通过适当技术(诸如贯穿本说明书公开的那些技术)评估的那样,足以提供所需效果。因此,虽然不可能指定确切的有效量,但是本领域技术人员将能够在任何个案中使用常规实验和背景常识确定适当的“有效”量。在这种背景下,治疗结果包括根除或减轻症状。治疗结果不一定是病状的完全改善(即治愈)。

[0487] 在另一个实施方案中,本发明提供了源自与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的细胞或细胞群体。例如,T细胞、NK细胞或树突细胞或其群体源自本文所述的方法得到的细胞或细胞群体(例如,在体内或体外使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触后)。在另一方面,本发明提供了本文所述的细胞或细胞群体例如用于过继性细胞转移的方法和用途。

[0488] 本发明人还证明了本文所述的Lck活化肽增加T细胞系(图10和图12)、PBMC内的CD4+和CD8+T细胞(图13)和耗竭CD4+T细胞(图11)上的IL-2Ra(CD25)表达。

[0489] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的IL2R的生理作用(例如对IL-2的反应性)。

[0490] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞的或细胞群体中的IL-2反应性的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0491] 在一个实施方案中,当将与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体对IL-2的反应性水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体对IL-2的反应性水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前

后的水平进行比较时,细胞或细胞群体对IL-2的反应性水平增加。

[0492] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-2Ra (CD25) 表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0493] 在一个实施方案中,本发明提供了在检查点抑制剂存在的情况下增加CD25表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0494] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的IL-2RB (CD122) 表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0495] 在一个实施方案中,当将与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的IL-2Ra或IL-2RB表达水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的IL-2Ra或IL-2RB表达水平(例如对照)相比较时,或对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体上的IL-2Ra或IL-2RB表达水平增加。

[0496] 在一个实施方案中,所述细胞是或者所述细胞群体包含原初细胞。

[0497] 在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在优选的实施方案中,T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0498] 如以上所讨论的,本文所述的方法可以在体内(例如受试者体内)或体外(例如离体)的细胞或细胞群体上执行。同样如以上所讨论的,本发明提供了由本文所述的方法得到的细胞和细胞群体,以及本文所述的细胞或细胞群体的方法和用途。

[0499] 本文所述的肽增加CD8+T细胞的增殖(图20、图21和图27)和CD28+CD8+T细胞的增殖(图24)。

[0500] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的CD28+T细胞的生理作用。

[0501] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上或细胞群体中的CD28表达的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0502] 在一个实施方案中,当将与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或群体上的CD28表达水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的CD28表达水平(例如对照)相比较时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体上的CD28表达水平增加。

[0503] 在一个实施方案中,本发明提供了增加T细胞增殖的方法,所述方法包括使T细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在优选的实施方案中,T细胞是CD8+T细胞。

[0504] 人口结构演变对公共卫生构成了挑战。全球人口,尤其是在发达国家,正老年化并且60岁以上人口的比例到2050年将从1950年的8%增加到预期的21%(在Compte N等人, PLOS One, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0065325中有综述)。免疫功能下降是衰老的标志,老年人呈现出细菌和病毒感染、癌症和疫苗反应减少的比率和严重程度递增(Compte等人,见上文)。

[0505] 人免疫系统随年龄逐渐恶化,这种缺陷表现为诱导针对疫苗和感染的免疫记忆的能力降低。对病原体和肿瘤发展的防御取决于多样化TCR库的产生和维持,而年龄较大时,TCR多样性显著降低,从而使得难以抵抗新的病原体并难以对复发性感染产生强烈的回忆反应(在Moro-Garcia MA等人, Front Immunol, 2013, doi.org/10.3389/fimmu.2013.00107中有综述)。

[0506] 在衰老过程中对抗病原体和疫苗反应的能力下降反映在观察到的CD4+和CD8+T

细胞变化,并且已有人提出,通过使CD4+T细胞群体“复壮(rejuvenation)”可以实现防止衰老中适应性免疫反应的恶化(Moro-Garcia MA等人,Front Immunol,2013,doi.org/10.3389/fimmu.2013.00107)。

[0507] CD28表达的丧失是与年龄相关性CD4+T细胞功能下降的标志。CD28在T细胞活化期间起关键作用,诸如诱导细胞因子(IL-2)产生和促进细胞增殖,因此在活化期间缺少这种共刺激信号会导致T细胞仅部分活化或甚至处于无能状态(Godlove J等人,Exp Gerontol,2007,42(5):412-5)。这样,在老年人中CD28阴性T细胞的积聚与对病原体和疫苗的总免疫反应降低相关(Sauerwein-Teissl M等人,J Immunol,2002,168:5893-5899)并且在一些年龄大于65岁的个体中,CD4+/CD28-T细胞可占总CD4+T细胞区室的最多50%(Vallejo An等人,J Immunol,2000,165:6301-6307)。

[0508] 在哺乳动物衰老期间,胸腺完整性和功能逐渐下降,并且胸腺退缩被视为免疫衰老中的重要因素(Li L等人,J Immunol.2004,172(5):2909-2916)。小鼠研究已证实IL-12敲除小鼠的胸腺退缩加速,并且IL-12已被证实会在老年野生型小鼠和IL-12敲除小鼠中提供用于增强IL-2诱导的胸腺细胞增殖的强大协同作用(Li等人,见上文)。

[0509] 本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加CD8+和CD4+T细胞上的CD28表达(实施例21、图22、图30和图31)。

[0510] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防受试者的年龄相关性免疫功能障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0511] 在一个实施方案中,以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状选自以下组成的组:病原性感染、病原性感染引起的败血症(例如,慢性败血症)、免疫缺陷病症、免疫反应降低、T细胞计数降低、T细胞异常、T细胞耗竭和T细胞检查点阻断。

[0512] 在优选的实施例中,所述疾病或病状是癌症。

[0513] 如本文所用,术语“年龄相关性免疫功能障碍”包括以上讨论的年龄相关性免疫变化。

[0514] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防与以Lck或Lck活性的抑制或下调为特征的疾病或病状相关的至少一种症状的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的肽的组合物。

[0515] 如本文所用,术语“治疗”包括治疗性治疗以及防治性治疗(完全预防病症或病症的症状(包括年龄相关性变化)的发作,或延迟病症的症状(包括年龄相关性变化)的发作,或个体中病症的临床前明显阶段)。

[0516] 术语“预防”包括完全预防病症或病症的症状的发作,或者延迟病症或病症的症状的发作,或个体中病症的临床前明显阶段。例如,这包括对处于罹患疾病(诸如癌症)风险的个体的防治性治疗。“防治(Prophylaxis)”是预防(prevention)的另一个术语。

[0517] 另外,老年人中IFN γ 的产生受损会促成免疫风险表型,并且老年人中在受细菌产物或病毒抗原刺激时产生这种细胞因子的能力降低也会随着衰老而促成疾病易感性(Ouyang Q等人,Eur Cytokine Netw,2002,13(4):392-4)。值得注意的是,老年小鼠表现出的CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)对流感病毒的反应减弱,这被认为部分归因于IL-18受体(IL-18R)mRNA表达减少,并且IL-12和IL-18两者均可显著增加老年小鼠中的IFN γ 产生,从而逆转与衰老相关的CD8+CTL缺乏(Zhang Y等人,J Interferon&Cytokine Res,2004,

doi.org/10.1089/107999001753238097)。

[0518] 本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加CD4+T细胞(图18)和CD8+T细胞(图19)的IFN γ 产量。

[0519] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的IFN γ 的生理作用。

[0520] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的细胞因子分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0521] 在优选的实施方案中,所述细胞因子为IFN γ 。

[0522] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的细胞因子(例如IFN γ)分泌水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的细胞因子(例如IFN γ)分泌水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的细胞因子(例如IFN γ)分泌水平增加。

[0523] 自然杀伤(NK)细胞在抵抗感染和癌症的免疫力中也起着重要作用。年龄相关性功能性NK细胞缺乏在人类和小鼠中已有着充分记载,并且已经证实向老年小鼠注射可溶性IL-15/IL-15R α 复合物可完全逆转年龄相关性NK细胞缺乏(Chiu B-C等人,J Immunol, 2013,doi:10.4049/jimmunol.1301625)。而且,IL-15在对早期感染的免疫反应中起着至关重要的作用,并已证实会增加CD4+CD28-T细胞的溶细胞特性并增强它们的抗原特异性反应(Alonso-Arias R等人,Aging Cell,2011,10:844-852)。

[0524] IL-15促进NK和CD8+T细胞的发育、功能和存活,并且通过IL-15进行的信号传导经由CD215(IL-15R)受体进行。本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加CD4+和CD8+T细胞上的IL-15分泌(图23)和CD215表达(图23、实施例22)。因此,本文所述的Lck活化肽可用于增强本文所述的IL-15R和IL-15的生理作用。

[0525] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-15分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0526] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的IL-15分泌水平与未与本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的IL-15分泌水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的IL-15分泌水平增加。

[0527] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞上的IL-15R(CD215)表达的方法,所述方法包括使细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0528] 在一个实施方案中,当来自与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的细胞或细胞群体上的IL-15R表达水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的IL-15R水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体上的IL-15R表达水平增加

[0529] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加NK细胞的IL-15反应性的方法,所述方法包括使NK细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0530] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体对IL-15的反应性水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体对IL-15的反应性水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触

前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体对IL-15的反应性水平增加。

[0531] 在优选的实施方案中,所述细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0532] 不希望受到理论的束缚,预期对IL-15的反应性增加会调节NK和CD8+T细胞的发育、功能和存活。

[0533] 本发明人还证明了本文所述的Lck活化肽增加CD4+和CD8+T细胞(实施例25)和NK细胞(图32)上的pSTAT4表达。

[0534] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增强本文所述的pSTAT4的生理作用。

[0535] 例如,1型T辅助(TH1)细胞发育涉及通过信号转导和转录活化因子1(STAT1)进行的干扰素 γ (IFN- γ)信号传导,以及通过STAT4活化进行的白细胞介素12(IL-12)信号传导。

[0536] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了增加CD4+T细胞、CD8+T细胞或NK细胞中的pSTAT4表达的方法,所述方法包括使CD4+T细胞、CD8+T细胞或NK细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0537] 白细胞介素-2(IL-2)是一种促进生长的细胞因子,其主要由辅助T细胞产生并调节细胞和体液免疫力中所牵涉到的各种细胞的生长和功能。IL-2的表达会随年龄而下降,并且已经证实这种下降与年龄相关性免疫功能下降并行(Pahlavani MA和Richardson A, Mech Ageing Dev,1996,89(3):125-54)。而且,向老年小鼠施用IL-21已经被证实能通过触发从头胸腺形成而使它们的外周T细胞库复壮(Al-Chami E等人,Aging Cell,2016,15(2):349-60)。例如,与源自对照老年小鼠的T细胞相比,刺激源自经rIL-21处理的老年小鼠的T细胞展示出增强的Lck激酶活化,从而最终加强了它们的IL-2产生、CD25表达和增殖能力(Al-Chami等人,见上文)。

[0538] 本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加T细胞系(图10)、CD4+T细胞(图11)、PBMC内的CD4+和CD8+细胞(图13)上的IL-2Ra(CD25)表达,并且增加CD8+T细胞的增殖(图20、图21、图27)和NK细胞的增殖(实施例20)。

[0539] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的IL-2Ra的生理作用。

[0540] 本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的CD8+T细胞的生理作用。

[0541] 本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的CD4+T细胞的生理作用。

[0542] 本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的NK细胞的生理作用。

[0543] 在一个实施方案中,本发明提供了增加T细胞上的IL-2Ra(CD25)表达的方法,所述方法包括使T细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在另一个实施方案中,本发明提供了增加T细胞的IL-2反应性的方法,所述方法包括使T细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在优选的实施方案中,T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0544] 在另一个实施方案中,本发明提供了诱导细胞增殖的方法,所述方法包括使细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在优选的实施方案中,所述细胞是CD8+T细胞或NK细胞。

[0545] 在另一个实施方案中,本发明提供了增加细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在一个优选的实施方案中,所述细胞群体是CD4+T细胞、CD8+T细胞或NK细胞的群体。如上所指出的,所述方法可以在体内或体外的细胞或细胞群体上执行。在另一个优选的实施方案中,所述方法在离体的细胞或细

胞群体上执行。

[0546] 在另一个实施方案中,本发明提供了源自与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的细胞群体。例如,T细胞、NK细胞或树突细胞或其群体源自与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体。

[0547] 在一方面,本发明提供了本文所述的细胞或细胞群体的方法和用途。例如,本文所述的细胞或细胞群体可用于包括CAR T细胞疗法在内的过继细胞疗法。

[0548] 已经证实细胞因子IL-21对于最佳的疫苗诱导的针对狂犬病毒感染的主要反应的发展至关重要,并且与IL-7组合,在全细胞癌疫苗中具有强大的辅助功效(Dorfmeier CL等人,PLoS Negl Trop Di,2013,doi:10.1371/journal.pntd.0002129;Gu Y-Z等人,Scientific Reports,2016,doi:10.1038/srep32351)。

[0549] 本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加T细胞的IL-21产生(图28)。

[0550] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增加本文所述的IL-21的生理作用。

[0551] 在一个实施方案中,本发明提供了增加细胞或细胞群体的IL-21分泌的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0552] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的IL-21分泌水平与未与本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体的IL-21分泌水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的IL-21分泌水平增加。

[0553] 在一个实施方案中,本发明提供了在受试者中诱导免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0554] 在一个实施方案中,本发明提供了对有需要的受试者进行疫苗接种的方法,所述方法包括将包含如本文所述的Lck活化肽的组合物与疫苗同时或依序施用给受试者。本发明还提供了包含与疫苗(例如疫苗抗原)一起配制的如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0555] 本发明人已经证明,本文所述的Lck活化多肽可以在检查点抑制剂PD-L1的存在下挽救CD25表达(实施例11)。

[0556] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括将包含如本文所述的Lck活化肽的组合物与检查点抑制剂依序或同时施用给所述受试者。

[0557] 在本文中提到了示例性癌症。

[0558] 在另一个实施方案中,本发明提供了在受试者中激活免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0559] 本发明人还已证明本文所述的Lck活化多肽降低Treg细胞的比例(实施例26)。

[0560] 因此,本文所述的Lck活化肽可用于增强降低本文所述的Treg细胞比例的生理作用。

[0561] 在一个实施方案中,本发明提供了降低细胞群体中的Treg细胞比例的方法,所述方法包括使含Treg的细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0562] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞群体中的Treg比例与未与本文所述的Lck活化肽接触的细胞群体中的Treg比例(例如对照)比较降

低时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后进行比较时,细胞群体中的Treg比例降低。

[0563] 在一个实施方案中,本发明提供了降低受试者中的Treg细胞比例的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0564] 在一个实施例中,所述Treg细胞为Foxp3+Treg细胞。

[0565] 在另一个实施方案中,本发明提供了降低受试者中的免疫抑制的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0566] PD-1靶向疗法对耗竭CD8+T细胞的挽救是CD28依赖性的。本发明人已经证明本文所述的Lck活化多肽增加CD4+和CD8+T细胞中的CD28表达。

[0567] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了减少受试者中的T细胞耗竭的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。在另一个实施方案中,将包含如本文所述的Lck活化肽的组合物与检查点抑制剂依序或同时施用。

[0568] 癌症

[0569] 细胞免疫力下降与许多癌症以及前列腺素E2 (PGE2) 水平升高相关。已经证实,霍奇金淋巴瘤中的CD4+细胞表现出与在体外被来自健康个体的T细胞中PGE2改变的基因的相似的调节作用,所述调节作用包括使Lck失活以及使ZAP70磷酸化降低。(Chemnitz JM等人, Cancer Research, 2006, 66:1114)。

[0570] 在霍奇金淋巴瘤和其它肿瘤中,由于CD4+T细胞活化受损,细胞免疫力降低,并且有人提出,与霍奇金淋巴瘤相关的PGE2水平升高会通过使Lck失活而抑制CD4+T细胞功能(Chemnitz JM等人, 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>)。Lck在抗药性中也起着关键作用,并且已经证实缺乏Lck的T细胞对抗癌药有抗性(Samraj AK等人, 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>)。

[0571] 阿糖胞苷是用于治疗急性骨髓性白血病的最有效的化学治疗剂之一(Frei E等人, Cancer Res, 1969, 29:1325-1332)。引发细胞分裂需要具有细胞周期蛋白A和B及p34cdc2活性的丝氨酸/苏氨酸激酶p34cdc2激酶复合物。因此, p34cdc2代表监测DNA合成的完成和DNA损伤的存在的有丝分裂检查点(Nurse P, Nature, 1990, 344:503-507)。然而,虽然DNA复制的状态依赖于p34cdc2的丝氨酸/苏氨酸活性,但是这是由体内Tyr15上p34cdc2的磷酸化来调节的(Atherton-Fessler S等人, Mol Cell Biol, 1993, 13:1675-1685),并且已经证实p34cdc2的丝氨酸/苏氨酸活性会受到p34cdc2催化亚基中的Tyr15磷酸化抑制(Gould K和Nurse P, Nature, 1989, 342:39-44)。已经证实Lck激酶使p34cdc2的Tyr15磷酸化(Draetta G等人, Nature, 1988, 336:738-744),揭示了Lck活化剂在白血病和其它实体癌的治疗中的潜在作用。

[0572] 先前已经描述了通过用唑来膦酸盐和IL-2的组合离体或在体内刺激外周血淋巴细胞来靶向 γ/δ T淋巴细胞进行癌症免疫疗法(Gomes AQ等人, Cancer Res, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3236; Dieli F等人, Cancer Res, 2007, 67 (15):7450-7; Wilhelm M等人, Blood, 2003, 102 (1):200-6),并且如本文所述的Lck活化剂可以用作IL-2

的替代用于离体产生 γ/δ T 细胞,并且可以应用于针对患有恶性肿瘤(范围从乳腺癌、前列腺癌到淋巴样恶性肿瘤)的患者的治疗性施用(Dieli F 等人,见上文;Wilhem M 等人,见上文;Capietto AH 等人,J Immunol,2011,187(2):1031-8)。另外,已经证实包括利妥昔单抗(rituximab)和曲妥珠单抗(trastuzumab)的组合方案中 γ/δ T 细胞对肿瘤细胞的细胞毒性会增强(Tokuyama H 等人,Int J Cancer,2008,122(11):2526-343;Capietto AH,见上文),并且本发明扩展到如本文所述的 Lck 活化剂与如上所述的抗癌药和/或用于治疗根据本发明的癌症或其它疾病或病状的其它药物在组合治疗中的用途。

[0573] 本发明人已经证明用本发明的肽处理耗竭 CD4⁺ 细胞可诱导 CD25 表达(图 11)。

[0574] 另外,在一个实施方案中,本发明提供了减少 T 细胞耗竭的方法,所述方法包括使 T 细胞与包含如本文所述的 Lck 活化肽的组合物接触。

[0575] 本发明人已经证明本文所述的 Lck 活化多肽增加 PBMC 共培养物中钙黄绿素-AM 染色的 K562 细胞的特异性细胞毒性中的细胞毒性(实施例 44)。

[0576] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了增强细胞毒性细胞功能的方法,所述方法包括使细胞毒性细胞或细胞毒性细胞群体与如本文所述的 Lck 活化肽接触。

[0577] 在一个实施方案中,当与如本文所述的 Lck 活化肽接触的细胞或细胞群体的细胞毒性细胞功能水平与未与如本文所述的 Lck 活化肽接触的细胞或细胞群体的细胞毒性细胞功能水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的 Lck 活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的细胞毒性细胞功能水平增强。

[0578] 在另一个实施方案中,本发明提供了增强 T 细胞功能的方法,所述方法包括使 T 细胞或 T 细胞群体与包含如本文所述的 Lck 活化肽的组合物接触。

[0579] 如本文所用,“增强 T 细胞功能”意指诱导、致使或刺激 T 细胞具有持续或加强的生物学功能,或更新或再活化耗竭或失活的 T 细胞。增强 T 细胞功能的实例包括:CD8⁺ T 细胞的 IFN γ 分泌增加、增殖增加、抗原反应性(例如,病毒、病原体或肿瘤清除率)增加,这些均是相对于干预前的此类水平而言的。在一个实施方案中,增强的水平为至少 50%,可替代地 60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%。测量这种增强的方式是本领域普通技术人员已知的。在一个实施方案中,当与如本文所述的 Lck 活化肽接触的细胞或细胞群体的 T 细胞功能水平与未与如本文所述的 Lck 活化肽接触的细胞或细胞群体的 T 细胞功能水平(例如对照)比较增加时,或者对与包含本文所述的 Lck 活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,细胞或细胞群体的 T 细胞功能水平增强。

[0580] 本文讨论了示例性的细胞毒性细胞功能和 T 细胞功能。

[0581] 如以上所讨论的,本文所述的方法可以在体内(例如受试者体内)或体外(例如离体)的细胞或细胞群体上执行。

[0582] 衰老

[0583] T 细胞在细胞免疫力中起着核心作用,并且年龄相关性疾病的发生率正在递增,其中许多年龄相关性疾病都受到免疫系统失调的影响。有大量证据表明,免疫反应(主要是 T 细胞反应)在衰老时失调(Fulop T 等人,Longevity&Healthspan,2012,1:6)。已经描述了与衰老过程相关的 T 细胞信号传导途径的几种改变,并且已经提出质膜内的磷脂结构(脂质筏)起到组装 TCR 级联反应的组分的作用(在 Fulop 等人,见上文中有综述)。进一步地,已证实来自老年个体的活化 T 细胞中,Lck 及其活化形式向脂质筏的募集减少(Larbi A 等人,J

Leukoc Biol,2004,75 (2) :373-381)。

[0584] 已经在实验动物模型和人类中观察到T细胞活化途径的年龄相关性改变,最重要的变化发生在CD4+T细胞中,导致细胞因子白细胞介素2 (IL-2) 的产生减少和克隆扩增(在 Fulop等人(见上文中)有综述)。

[0585] 在IL-2系统中,细胞内信号转导由IL-2受体的 β 链触发,并且作为Lck催化结构域与IL-2R β 受体的胞质结构域中的特定定位点之间缔合的结果,IL-2R β 受体被磷酸化的Lck磷酸化(Hatakeyama M等人,Science,1991,252:152308)。Lck是唯一被证实在IL-2刺激T细胞后活化的Src家族激酶(Brockdorff J等人,Eur Cytokine Netw,2000,11 (2) :225-31),并且已证实活化的Lck蛋白在不存在抗原刺激的情况下会刺激IL-2产生(Luo K和Sefton BM,Mol Cell Biol,1992,12 (10) :4724-45732)。

[0586] T细胞活化和增殖的受损是衰老期间免疫功能丧失的关键变化(NASA-T-cell activation in aging,Report2016;<http://www.nasa.gov/mission pages/station/research/wexperiments/857.html>),并且通过比较太空飞行和地面对照获得的信息有助于了解和确定在其中起作用的特定因素。已知太空飞行和模拟微重力会导致早期T细胞活化中关键基因表达的显著减少,并且许多太空飞行任务已证明白细胞介素2 (IL-2)、白细胞介素2受体 α (IL-2R α 或CD25)、干扰素 γ (IFN γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 显著减少(在 Martinez EM等人,Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2015,308:R480-R488中有综述)。

[0587] 关于太空飞行期间免疫力受到抑制的担忧在于,有人质疑与太空飞行相关的免疫系统减弱是否会妨碍人类在地球轨道之外存在的扩展(Gueguinou N等人,J Leukocyte Biology,2009,doi:10.1189/jib.0309167)。如本文所述,在至少一些实施方案中,上述细胞因子的表达以及CD4+和CD8+T细胞的增殖在正常和耗竭T细胞中都可以用如本文所述的方法中利用的化合物诱导。因此,本发明的方法明确地扩展到在低重力和微重力环境中使用。

[0588] 免疫抑制

[0589] 许多新型抗癌药物的显著不良副作用是免疫抑制,其导致爆发性败血症。例如,据报道一种用于转移性肾癌的药物索拉非尼(Sorafenib)在超过10 μ M的剂量下即使在停药后也会引起不可恢复的T细胞增殖抑制作用(Zhao W等人,Leukemia,2008,22:1226-1233)。例如,已提出增加Lck上调作为在接受酪氨酸激酶抑制剂治疗的慢性髓系白血病患者中再次刺激免疫反应的可行选择(Wang G等人,BioMed Research International,2014,doi.org/10.1155/2014/682010)。而且,例如,BCR-ABL激酶抑制剂伊马替尼(imatinib) (Gleevec, ST1571)在治疗慢性髓系白血病中非常有效。然而,长期用这种药物治疗会诱导免疫抑制,免疫抑制主要是由于与酪氨酸激酶(诸如Lck和Zap70)的抑制相关的T细胞功能异常引起(Wang G等人,见上文)。另外,糖皮质激素充当阻断TCR活化所需的信号传导事件的有效免疫抑制剂,并且已经证实地塞米松对Lck的抑制会下调肌醇磷酸3受体,从而通过减弱TCR信号的强度来阻抑免疫反应(Harr MW等人,JBC,2009,284:31860-31871)。随着酪氨酸激酶抑制剂的发展和在癌症中的使用的迅速扩展,这些药物的潜在副作用具有重要的临床意义。除伊马替尼外,例如尼洛替尼(nilotinib)和达沙替尼(dasatinib)也被报道会阻抑T细胞功能,这已归因于Lck抑制。

[0590] 因此,癌症疗法可受益于与免疫增强药物(诸如细菌超抗原)的组合治疗。然而,细菌超抗原是一类引起T细胞非特异性活化和大量细胞因子释放,从而导致包括中毒性休克和多器官衰竭在内的严重的威胁生命的症状的抗原。葡萄球菌肠毒素A(SEA)在临床环境中令人担忧,因为它是与抗生素相关的腹泻的常见原因。尽管SEA引起了潜在的发病率,但鉴于Lck受SEA活化(Wang G等人,BioMed Research International,2014,2014:文章编号682010)并且先前缺乏选择性Lck活化剂,有人提出将SEA用于预防慢性髓系白血病中伊马替尼介导的T细胞免疫抑制。

[0591] 这些报道突出了Lck对于T细胞发育和活化以及因此对于适应性免疫反应的重要性(Stirnweiss A等人,2013,Sci Signal,6(263):ra13.Doi:10.1126/scisignal.2003607)。树突细胞(DC)介导的Lck活化导致“TCR许可”,这一过程极大地提高了TCR对同源肽-MHC II类抗原复合物的反应的敏感性和幅度(Meraner P等人,2007,J Immunol,178(4):2262-2271)。然而,例如伊马替尼通过抑制Lck活性来降低TCR诱导的增殖和活化(Seggewiss R等人,2005,Blood,105:2473-2479)。这暗示着会在干细胞移植后诱导机会性感染以及移植物抗宿主或移植物抗白血病反应(Seggewiss R等人,2005,Blood,105:2473-2479)。

[0592] 如以上所讨论的,本发明人已经证明,本文所述的肽增加Lck活性(如图1、2、3、4、5和6所示),并且增加Lck在Y394处的磷酸化(如图3和图40所示),以及增加CD8+T细胞的增殖(例如,图20、图21、图27)。

[0593] 本发明人还已证明本文所述的Lck活化肽:

[0594] • 减少Lewis肺癌(LCC)模型中的肿瘤面积(图36);

[0595] • 增加从经肽治疗的Lewis肺癌小鼠中取出的脾细胞中表达CD28和CD215的CD4+和CD8+T细胞的比例(图30、图31);并且

[0596] • 增加从经肽治疗的Lewis肺癌小鼠中取出的脾细胞中NK细胞上的pSTAT4表达(图32)。

[0597] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的肺癌的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0598] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了预防或延迟受试者中的肺癌进展的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0599] 多发性骨髓瘤/白血病/淋巴瘤

[0600] 使IL-2和IL-12同时靶向霍奇金淋巴瘤会增强静息NK细胞的活化和肿瘤细胞的溶解(Hombach A等人,Int J Cancer,2005,doi.org/10.1002/ijc.20829)。

[0601] 本发明人已经证明本文所述的肽增加NK细胞(实施例17)和CD4+T细胞(实施例15、实施例28)以及CD8+T细胞(实施例28、图25)上的IL-12RB2表达。

[0602] 本发明人还证明本文所述的Lck活化肽增加包括CD4+和CD8+T细胞(图8、图9)在内的T细胞(实施例7),以及T细胞系(实施例44)的IL-2分泌。

[0603] 在急性髓系白血病中,T细胞功能紊乱的多个方面在诊断时起作用,其中耗竭和衰老为主要过程(Knaus HA等人,JCI Insight,2018,doi:10.1172/jci.insight.120974)。实际上,患有急性和慢性白血病的患者中的T细胞表达耗竭标志物,诸如PD-1或TIM-3,并且反应不良,例如,增殖受损以及IL-2和IFN γ 的产生减少(Siska PJ等人,Blood,2014,124:

4121)。

[0604] 本发明人已经证明用本发明的肽处理耗竭CD4⁺细胞诱导CD25表达(图10、图11和图12),并且本文所述的肽诱导PBMc(实施例17)以及CD4⁺和CD8⁺T细胞(实施例18)中的IFN γ 分泌。

[0605] 本发明人还证明本文所述的肽增加人T细胞的IL-2分泌(图7、图8、图9、图37)。

[0606] 多发性骨髓瘤(MM)是一种以恶性浆细胞的克隆增殖为特征的进行性B系赘生物。多发性骨髓瘤中的T细胞在肿瘤部位也显示出耗竭和衰老的特征,MM患者中T细胞亚群的数量和功能异常;例如,CD4:CD8比率倒置,CD4细胞中辅助T细胞1型与2型(Th1:Th2)的比率异常,T细胞活化所需的CD28表达水平在T细胞中下调,并且来自MM患者的循环树突细胞功能异常(在Sharabi A和Haran-Ghera N,Bone Marrow Res,2011,文章编号269519中有综述)。本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽增加CD8⁺和CD4⁺T细胞上的CD28表达(图22、图30和图31)。

[0607] 重要的是,用本文所述的Lck活化肽预处理细胞会增加在随后抗原刺激后的人T细胞的IL-2分泌(例如图29)。

[0608] 如本文所用,抗原刺激包括细胞或细胞群体与抗原或者与抗体(诸如CD3或CD28抗体)的暴露或接触。

[0609] 如本文所用,原初细胞包括尚未暴露于抗原或未与抗原接触的细胞。

[0610] 因此,本发明提供了方法和用途,其中例如在疾病症状发作之前,在抗原刺激之前,在暴露于病原体之前等,防治性地施用如本文所述的Lck活化肽。

[0611] 另外,来自骨髓瘤肿瘤部位的CD8⁺T细胞在CD3/CD28体外刺激后无法产生IFN γ ,并且显示出响应于T细胞刺激脱粒的能力的降低(Zelle-Rieser C等人,J Haematology&Oncology,2016,doi.org/10.1186/s13045-016-0345-30)。MM中免疫反应受损因MM患者的外周血中功能活性免疫抑制性Treg的增加而进一步加重(在Dosani T等人,Blood Cancer Journal,2015,5:e306中有综述)。

[0612] 本发明人还已证明本文所述的Lck活化多肽降低免疫抑制性Treg细胞的比例(实施例26)。

[0613] 肿瘤浸润淋巴细胞中Foxp3⁺Treg细胞的存在与各种类型的人类癌症的不良预后相关。本发明人已证明本文所述的Lck活化多肽减少Foxp3⁺Treg细胞(实施例26)。

[0614] 因此,本发明提供了降低细胞群体中的Foxp3⁺Treg细胞的比例的方法,所述方法包括使细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0615] IL-21抑制免疫抑制性Treg。本发明人已经证明本文所述的Lck活化多肽增加T细胞的IL-21产生(图28)。

[0616] 过继细胞疗法(ACT)

[0617] 针对难治性或晚期癌症的疫苗接种的替代方法是过继T细胞疗法(ACT),即施用离体处理的T细胞(Kaartinen T等人,Cytotherapy,2017,19(6):689-702)。此外,从鼠类研究中也已经清楚,ACT之前的离体扩增期间对T细胞的调节也是影响体内功效的关键参数(Rubinstein MP等人,Cancer Immunol Immunother,2015,64(5):539-549)。T细胞的过继转移可以在患者中介导强效的抗肿瘤和抗病毒免疫力,此类疗法可依赖于包括T细胞受体、嵌合抗原受体(CAR)或其它效应分子在内的遗传信息的转移(在Andrijauskaite K等人,

Cancer Gene Ther, 2015, 22 (7) :360-367中有综述)。

[0618] 白细胞介素, 当在T细胞离体扩增期间掺入到培养基中时, 已经成功地用于增强T细胞的功能性。例如, IL-12调节提高逆转录病毒介导的CD8⁺T细胞的转导效率(Andrijauskaite K等人, 见上文); 已证实添加IL-21会诱导培养物中淋巴细胞的更大扩增并增加CD8⁺T中央记忆细胞的产量(Zoon CK等人, Int J Mol Sci, 2015, 16:8744-8760); 并且已经证实, 用IL-21培养的CAR⁺T细胞的过继转移能改善对小鼠中CD19⁺B细胞恶性肿瘤的控制(Singh H等人, Cancer Res, 2011, 71 (10):3516-3527)。

[0619] 在过继免疫疗法中, 与用单独的IL-12或IL-18产生的T细胞相比, 已证实IL-12和IL-18培养的肿瘤引流淋巴结细胞(TDLN)能更有效地根除肺转移(Li Q等人, Cancer Res, 2005, 65 (3) :1063-70)。这表明IL-12和IL-18可用于通过使抗体活化的TDLN细胞向Th1表型协同极化而产生强效的CD4⁺和CD8⁺抗肿瘤效应细胞(Li等人, 见上文)。本文所述的Lck活化肽可用于产生强效的CD4⁺和CD8⁺抗肿瘤效应细胞。

[0620] 本发明人已经证明, 本文所述的Lck活化肽增加IL-18R的表达。

[0621] 在一个实施方案中, 当来自与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体的细胞或细胞群体上的IL-18R表达水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体上的IL-18R水平(例如对照)比较增加时, 或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时, 细胞或细胞群体上的IL-18R表达水平增加。

[0622] 在另一个实施方案中, 本发明提供了增加NK细胞的IL-18反应性的方法, 所述方法包括使NK细胞与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。

[0623] 在一个实施方案中, 当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体对IL-18的反应性水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体对IL-18的反应性水平(例如对照)比较增加时, 或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时, 细胞或细胞群体对IL-18的反应性水平增加。

[0624] 在优选的实施方案中, T细胞是CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。

[0625] 如上面所讨论的, 本文所述的肽增加CD8⁺T细胞的增殖(图20、图21和图27)和CD28⁺CD8⁺T细胞的增殖(图24)。因此, 本文所述的Lck活化肽可用于在体内和体外诱导细胞和细胞群体的增殖, 例如以进行过继细胞疗法。

[0626] IL-12受体表达与IL-12结合和Th1免疫反应的诱导相关。本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽促进PBMC(图17)和T细胞(图25)上的IL-12R表达。

[0627] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了在受试者中诱导Th1反应的方法, 所述方法包括向所述受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0628] 可以在体外/离体扩增T细胞, 以使用IL-21进行过继细胞疗法。本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽促进IL-21的表达(图28)。

[0629] 氧化应激

[0630] 已知剂阻断脂质过氧化过程的各个步骤, 从而增强免疫反应的能力近40年(Terrell Hoffeld J, Eur J Immunology, 1981, doi.org/10.1002/eji.1830110505)。

[0631] 另外, 在存在病原性感染的情况下, 磷脂氢过氧化物清除剂对于新近活化的T细胞的存活和扩增至关重要(Matsushita M等人, JEM, 2015, doi.10.1084/jem.20140857)。

[0632] 免疫抑制细胞, 例如髓系来源的抑制细胞(MDSC)随着衰老而扩增, MDSC的这种扩

增还促成对T细胞反应的抑制,这在很大程度上是由于产生了包括过氧亚硝酸盐(体内最强的氧化剂之一)在内的氧类物质(Gabrilovich DI和Nagaraj S,Nat Rev Immunol,2009,9(3):162-174;Bueno V等人,Age(Dordr),2014,36(6):9729)。

[0633] 一氧化氮与超氧自由基之间的反应(导致过氧亚硝酸盐的形成)诱导生物膜和脂蛋白中存在的多不饱和脂肪酸的脂质过氧化,并且UVB照射产生高水平的过氧亚硝酸盐,其导致氧化损伤和细胞死亡(Radi R,PNAS,2018,doi.10.1073/pnas.1904932115;Wu S等人,Photochem Photobiol,2010,86(2):389-396;Bartesaghi S和Radi R,Redox Biol,2018,14:618-625)。

[0634] 而且,还已证实香烟烟雾诱导的氧化应激会抑制CD40L成熟化树突细胞(DC)产生的IL-12的产生(Kroening PR等人,J Immunol,2008,181(2):1536),这种细胞因子是主动Th1免疫反应所必需的。

[0635] 本发明人已经证明Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR不仅诱导CD40L介导的DC的IL-12产生,而且抑制细胞膜中的脂质过氧化(例如图39)。

[0636] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了治疗氧化损伤的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的Lck活化肽的组合物接触。在优选的实施方案中,所述细胞是Treg细胞或包含Treg细胞的细胞群体。

[0637] 在一个实施方案中,当与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触的细胞或细胞群体中的氧化损伤水平与未与如本文所述的Lck活化肽接触的细胞或细胞群体中的氧化损伤水平(例如对照)比较降低时,或者对与包含本文所述的Lck活化肽的组合物接触前后的水平进行比较时,氧化损伤水平降低。

[0638] 在一个实施例中,降低的水平为至少10%,可替代地20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。测量此类降低的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0639] Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)增加CD14阴性树突细胞群体(数据未示出)。

[0640] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了诱导树突细胞或树突细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞或细胞群体与包含如本文所述的肽的组合物接触。在另一个实施方案中,本发明提供了增加树突细胞群体的增殖的方法,所述方法包括使细胞群体与包含本文所述的肽的组合物接触。

[0641] 阿尔茨海默氏病(AD)

[0642] 阿尔茨海默氏病是痴呆症的主要原因,其特征在于神经元的变性和损失以及老年斑和神经原纤维缠结的形成。

[0643] 最近有报道称,PD-1/PD-L1途径检查点抑制剂通过触发脑部中单核细胞来源的巨噬细胞群体的IFN γ 依赖性增加,从而引起脑淀粉样蛋白的清除和认知缺陷的改善,从而改善转基因小鼠模型的AD(Baruch K等人,Nature Med,2016,22:135-37)。如本文所述,在至少一些实施方案中,本发明中利用的化合物可以挽救受到PD-1/PD-L1相互作用抑制的免疫反应。

[0644] 进一步地,Lck参与神经突增生的调节,并且临床报告描述了AD患者海马中Lck的水平下调(Hata R等人,BBRC,2001,284:310-316)。实际上,人Lck基因已定位于阿尔茨海默氏病相关的遗传连锁区域1p34-36中(Blacker D等人,Hum Mol Genet,2003,12:23-32)。对

哺乳动物脑部中的Lck的最新体外和体内功能表征进一步表明,Lck是记忆的获得和维持的关键介体,而记忆是AD中受损最明显的过程(Kim E-J等人,Cell Mol Life Sci,2012,doi:10.1007/s00018-102-1168-1)。

[0645] 本发明人已经证明,在检查点抑制剂PD-L1的存在下,本文所述的Lck活化多肽可以挽救T细胞系上的IL-2Ra表达(图12、实施例11)。

[0646] HIV感染

[0647] 尽管Lck与CD4和CD8两者都缔合,但是当Lck与CD4缔合时,它的活性更高(Delves PJ和Roitt IM编辑,1998.Encyclopaedia of Immunology,第二版,San Diego:Academic Press)。HIV的特征在于CD4+细胞耗竭,而缺乏Nef的HIV毒株不会进展为AIDS(Olszewski A等人,2004,PNAS.USA,101(39):<http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/39/14079>)。Lck在HIV感染中的重要作用已得到公认。例如,表达非活性Lck的细胞显示出加速的病毒复制,而表达具有正常或升高的酶活性的Lck的细胞显示出与初始内源性Lck酶活性成比例的病毒复制延迟(Yousefi S等人,2003,Clinical&Experimental Immunology,133(1):78-90)。

[0648] Nef基因是灵长类慢病毒(人类免疫缺陷病毒1型)HIV-1)、HIV-2和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)特有的,并且编码大约25Kd的肉豆蔻酰化膜相关蛋白(Greenway AL等人,1999,J Virol.,73(7):6152-6158)。在细胞水平上,Nef会降低包括CD4、白细胞介素-2受体、I类MHC在内的细胞表面受体的水平,干扰T细胞信号传导,并损害特定细胞因子的产生(在Greenway AL等人,1999(见上文)中有综述)。

[0649] Nef与T细胞限制性Lck酪氨酸激酶(淋巴细胞蛋白酪氨酸激酶)直接相互作用,并降低在体外和完整细胞中的Lck激酶活性,从而导致近端和远端Lck介导的信号传导事件受损(Collette Y等人,1996,JBC,271:6333-6341。Lck与Nef的结合不需要其它病毒体或细胞蛋白,因为已证实Lck催化活性的抑制会因纯化的Lck与HIV-1Nef或SIV蛋白之间的结合而出现,说明了Nef介导的发病机理的复杂性。

[0650] 具体地,Nef与Lck的SH3结构域结合,导致Lck催化活性的抑制(Collette Y等人,1996,JBC,271:6333-6341;Greenway A等人,1996,J Virol,70(10):6701-6708;Greenway AL等人,1999,J Virol,73(7):6152-6158),并且Lck活化剂的开发可以补充抗逆转录病毒治疗剂的开发。

[0651] Lck是T细胞中白细胞介素-2(IL-2)刺激后活化的唯一Src家族激酶(Brockdorff J等人,2000,Eur Cytokine Netw.,11(2):225-231),尽管早期研究表明在HIV感染患者中的IL-2疗法与单独使用抗逆转录病毒疗法相比,没有增加临床益处,但是观察到CD4+细胞计数持续大量增加(The INSIGHT-ESPRIT Study Group and SILCAAT Scientific Committee,N Eng J Med,2009,361:1548-1559)。然而,最近的数据表明,在未来的HIV疫苗研究设计中应考虑将IL-2作为佐剂与HIV DNA或蛋白质疫苗一起施用(Baden LR等人,2011,J Infect Dis,204(10):1541-1549),并且事实上IL-2确实会抑制一些受感染的细胞系中的HIV-1复制(Raphael MO等人,2013,JBC,doi:10.1074/jbc.M113.468975)。

[0652] 这些报道突出了Lck对于T细胞发育和活化以及因此对于适应性免疫反应的重要性(Stirnweiss A等人,2013,Sci Signal,6(263):ra13.Doi:10.1126/scisignal.2003607)。

[0653] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的HIV感染的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0654] 其它病原性感染

[0655] 抵抗由病毒、细菌、原生动物和寄生虫引起的感染的充分的免疫反应可能会因为缺乏特异性激酶活性、促进微生物复制并进入细胞中以及/或者抑制有效的免疫反应而受到损害。

[0656] 例如,许多细菌性病原体与宿主细胞密切相关。虽然一些仍附着在细胞表面,但其它却被内化。肠粘膜内的 γ/δ 上皮内T细胞可以通过与邻近上皮细胞的串扰来检测入侵细菌的存在,并且是通过肠道菌群维持体内平衡的免疫防御体系的重要组成部分(Ismail AS等人,PNAS,2011,108:8743-8748)。

[0657] 细菌入侵后能够在细胞内建立其生命周期的高度保守的进化手段是通过细菌产生的UDP糖水解酶。这些是具有UDP糖水解酶活性和5种主要核苷酸酶活性的双功能酶。例如,大肠杆菌可以产生UDP糖水解酶,其产物显著抑制Lck活性(Berger SA等人,JBC,1996,271:23431-23437)。具体地,在大肠杆菌感染HeLa细胞之后,这种相对非特异性的核苷酸酶导致腺苷积聚,腺苷积聚是造成Lck抑制的直接原因。而且,已经证实,UDP糖水解酶的过表达一旦进入HeLa细胞中便能提高细菌存活率。细胞内ATP的损失并不是Lck抑制的原因,而是ADP、AMP和腺苷的积聚是导致Lck抑制的原因(Berger等人,见上文),并且那些研究人员已经提出,在感染情形下,其它病原体也可能采用这种酶。实际上,白色念珠菌(*Candida Albicans*)培养物含有腺苷,腺苷已被证实是抑制中性粒细胞功能的原因(Smail EH等人,J Immunol,1992,148:3588-3595)。

[0658] 弗氏志贺菌是细菌性痢疾的致病物,已被证实能在体外入侵活化的CD4+T细胞,抑制T细胞向趋化性刺激迁移,并且还能损害体内适应性免疫力引发部位(即淋巴结)内的T细胞动力学,从而防止诱导对细菌的有效免疫反应(在Nothelfer K等人,J Exp Med,2014,211(6):1215;Salgado-Pabon W等人,PNAS,2013,110:4458-4463中有综述)。而且,在志贺氏菌病的小鼠模型中,用Unc119治疗会抑制志贺氏菌感染(Vepachedu R等人,PLOS one,2009,doi:10.1371/journal.pone.0005211)。相反,Unc119敲低被证实能增强细菌的入侵和致死性。同样,据报道,在Unc119敲低后,牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)BCG感染THP-1细胞的感染性增强,表明Unc119的作用对志贺氏菌无特异性(Vepachedu等人,见上文)。Unc119的抑制作用归因于它与Ab1家族激酶的相互作用,而不是尚未进行研究的Src家族激酶的介导。进一步地,发现Unc119敲低使所用细胞系中的志贺氏菌感染加倍。据信,在本发明之前,选择性的Lck活化剂先前尚未被描述。(Bae O-N等人,J.Neuroscience,2012,32(21):7278-7286)。尽管最近报道的数据表明Unc119能活化T细胞中的Lck,但已证实Unc119及其SH3肽基序不仅能活化Lck,而且能活化Src激酶家族内的Hck、Lyn和Fyn激酶成员(Cen O等人,JBC,2003,278:8837-8845;Gorska MM等人,J Exp Med,2004,199(3):369-379)。因此,如本文所述的Lck活化剂可以充当替代性抗生素或充当传统抗生素疗法的补充疗法,并且本发明扩展到所有此类用途。

[0659] 疟疾是由感染肝细胞和红细胞的疟原虫物种引起的非常普遍的疾病。CD4+T细胞防御慢性血液期疟疾(blood-stage malaria),而CD8+T细胞的耗竭则会延迟寄生虫的清除,暗示着这些细胞对慢性疾病具有防御作用(在Wykes MN等人,Cell Reports,2013,5:

1204-1213有综述)。而且,正如通过程序性细胞死亡-1受体(PD-1)进行的信号传导被认为会“耗竭”HIV特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞一样,PD-1已被证实能介导疟原虫特异性CD8⁺T细胞的损失和耗竭并且在较小程度上介导CD4⁺T细胞的功能的损失和耗竭(Wykes等人,见上文)。重要的是,最近在PD-1基因敲除小鼠中已经证明CD8⁺T细胞增强的IFN γ 分泌与对疟疾感染的防御有关,这导致了未来的疟疾疫苗考虑加强CD8⁺T细胞反应性的提议(Wykes MN等人,Scientific Reports,2016,6:26210)。如本文所述,在至少一些实施方案中,根据本发明的方法利用的化合物可以增强例如耗竭的鼠类CD4⁺T细胞、人外周血单核细胞以及例如表达CD8⁺的Jurkat细胞中的IFN γ 分泌,从而进一步表明了疟疾治疗中的作用,并且如本文针对这所描述的化合物的用途明确地被本发明所涵盖。

[0660] 嗜T-淋巴细胞病毒,例如疱疹病毒,是本发明实施的Lck活化剂和方法的特定靶标,这是由于例如,松鼠猴疱疹病毒酪氨酸激酶相互作用蛋白(Tip)与Lck发生物理相互作用并抑制稳定表达的细胞系中的Lck活性(Isakov N和Biesinger B,Eur J Biochem,2000,267(12):3413-21)。

[0661] 进一步地,以埃博拉病毒(Ebolavirus)属和马尔堡病毒(Marburgvirus)属为代表的丝状病毒,在人类和非人灵长类动物中引起致命性出血热。该病毒通过减少B淋巴细胞和T淋巴细胞的数量来攻击免疫系统。B细胞和T细胞(诸如CD4和CD8淋巴细胞)是产生作为免疫调节因子的细胞因子所必需的,并且已经证实,几天内死亡的患者的B细胞和T细胞数量由于凋亡而减少。T细胞需要被活化才能破坏受病毒感染的细胞(Wauquier N等人,Public Library of Science,2010,4(10):837-847),并且已经证实人外周血单核细胞暴露于失活的扎伊尔型埃博拉病毒会导致IL-2的产生减少(Yaddanapudi K等人,The FASEB journal,2006,20:2519-2530)。因此,如本文所述的Lck活化剂的使用可应用于刺激针对这些疾病的T细胞活化和IL-2产生。

[0662] 而且,如本文所述的Lck活化剂的使用还可在其它感染诸如结核中起作用。例如,大多数个体需要CD4⁺和CD8⁺T细胞来控制结核分枝杆菌(MTB),但无法根除MTB。MTB用于逃避CD4⁺T细胞识别的分子机制是通过糖脂ManLAM(其是MTB壁中最丰富的糖脂之一)进行信号传导,糖脂ManLAM通过抑制Lck磷酸化而不是Tyr 505的磷酸化来干扰TCR信号传导(Mahon RN等人,2012,Cell Immunol.275(1-2):98-105;Mahon RN III,PhD Dissertation,2010,http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=case1275668686)。

[0663] 已知IL12RB1对于人类抵抗结核分枝杆菌感染是必不可少的。本发明人已经证明本文所述的Lck活化肽诱导CD4⁺和CD8⁺T细胞中的IL12RB1表达(例如实施例28、图25、实施例15、图17)。

[0664] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的结核分支杆菌的方法,所述方法包括向受试者施用包含如本文所述的Lck活化肽的组合物。

[0665] 可以根据本发明通过上调Lck活性来抑制或治疗的其它感染包括鼠疫和肝炎病毒(例如,乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)。乙型肝炎是导致肝损伤和炎症的最普遍的病毒,并且与丙型肝炎病毒一样,与T细胞耗竭相关(Ye B等人,Cell Death&Disease,2015,6,e1694)。鼠疫耶尔森氏菌病的病因的关键毒力因子是酪氨酸磷酸酶YopH。该细菌将YopH注入到宿主细胞中,并且已证实在含有活性YopH的细胞中,Lck在其正调节位点Tyr 394处去

磷酸化。通过关闭Lck, YopH在其第一步就阻断了T细胞抗原受体的信号传导, 有效地防止了针对这种致死性疾病的保护性免疫反应的发展(Alonso A等人, 2003, JBC, 279:4922-4928)。在丙型肝炎中, 丙型肝炎病毒核心蛋白与T细胞结合并抑制Lck活化, 表明该核心蛋白抑制T细胞活化的极早期事件(Yao SQ等人, 2004, J Virol, 78(12):6409-6419)。

[0666] 自1973年以来, 就对一般感染、术后感染或甚至癌症复发的易感性而言, 输血的危害就已为人所知, 最近的荟萃分析再次证实了红细胞输注后这种与健康相关的感染的风险(Rhode JM等人, JAMA, 2014, 311(13):1317-1326; Blumberg N等人, Transfusion, 2007, 47(4):573-81; Fergusson D等人, Can J Anaesth, 2004, 51(5):417-24)。虽然提出的输血诱导的免疫调节机制仍尚不清楚, 但认为起作用的有文件记载的变化包括CD4/CD8比率降低和IL-2分泌降低(Kirkley SA, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1999, 6(5):652-657)。因此, 与输血联合施用Lck活化剂可以改善这些病状中的一种或多种的风险。

[0667] 而且, 已经证实对同基因脾细胞进行体外IL-2处理以生成淋巴因子活化的杀伤细胞能增强小鼠热损伤模型中IL-2对败血症相关死亡的预防, 并且已经证实活化的Lck能不存在抗原刺激的情况下刺激IL-2产生(Mendez MV等人, J Surg Res, 1993, 54(6):565-70; Luo K和Sefton BM, Mol Cell Biol, 1992, 12(10):4724-4732)。此外, 已知前列腺素E2 (PGE2) 在败血症期间的T细胞抑制中起着重要作用, 并且在败血症期间T细胞抑制的新生Sprague-Dawley大鼠模型中, 已证实前列腺素E2 (PGE2) 伴有IL-2产量的减少。此类抑制用COX-2抑制剂疗法得到改善, 暗示着PGE2参与该过程。鉴于此并且由于T细胞暴露于PGE2导致Lck失活和ZAP70磷酸化降低(Dallal O等人, Biol Neoplasia, 2003, 83(3):201-7; Chemnitz JM等人, Cancer Res, 2006, 66:1114), 所以用根据本发明的Lck活化剂的治疗也可应用于通过刺激T细胞活性和刺激IL-2的产生来刺激败血症期间的免疫反应。

[0668] 因此, 如本文所述的Lck活化剂可广泛应用于许多应用中。可以通过如本文所述的Lck活化剂和/或根据本发明实施的方法治疗的疾病和病状包括但不限于以Lck的表达不太理想或者Lck的抑制或者Lck或Lck活性的下调为特征的疾病和病状, 与上皮内和粘膜内驻留T细胞功能异常和/或对病原性感染(例如, 包括慢性感染)的应答需要T细胞活化有关的病症, 由病原性感染引起的败血症(例如慢性败血症)和与输血相关的败血症, 癌症以及皮肤和上皮恶性肿瘤; 防治或治疗一般癌症(例如乳腺癌、结肠癌、结直肠癌和前列腺癌), 包括淋巴瘤、霍奇金病和白血病; 由抑制T细胞功能的疗法(例如, 针对癌症和非癌症病状的疗法)引起的免疫抑制; 免疫缺陷病症, 包括但不限于严重的联合免疫缺陷综合征(SCID); 需要CD4/CD8 T细胞存活的病状以及导致T细胞计数降低的病状或病症(例如, 感染诸如肺炎、流感、疱疹感染); 由病毒、细菌、真菌和寄生虫引起的病原性感染; T细胞耗竭(例如, 与癌症或非癌症病状(诸如, 由病原性感染引起的败血症(例如, 慢性败血症))和/或与癌症或非癌症病状的治疗相关联), 以及T细胞中的检查点阻断(例如, 与癌症或慢性败血症相关), 以及与年龄相关联的T细胞活化途径中的改变。

[0669] 已知各种配体-受体相互作用有助于检查点信号传导抑制(例如, 参见Pardoll DM, Nature Reviews Cancer, 2012, 12:252-264), 并且在本发明的至少一些实施方案中, T细胞功能可通过抑制这些相互作用中的一种或多种(例如, PD-1/PD-L1相互作用)来恢复。因此, 在至少一些实施方案中, 本发明明确地扩展到施用如本文所述的Lck活化剂, 以克服

耗竭T细胞中的检查点阻断/T细胞信号传导抑制。

[0670] 病原体和病原性感染的进一步实例包括病毒感染,诸如由以下引起的病毒感染:痘病毒、除疱疹病毒之外的其它嗜T淋巴细胞病毒、粘液病毒、呼肠孤病毒、肠病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、口蹄疫病毒、引起肝炎的病毒(例如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)、脑炎和脉络丛脑膜炎、猿猴免疫缺陷病毒、SARS、冠状病毒、登革热病毒、流感病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、腺病毒、水疱性口炎病毒、鼻病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、呼吸道合胞病毒、人巨细胞病毒和水痘带状疱疹病毒(VZV);细菌感染,诸如由以下引起的细菌感染:除结核(例如麻风病)以外的其它分枝杆菌感染,由革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌(诸如革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性球菌,以及革兰氏阴性杆菌和球杆菌)、溶血性链球菌、肠球菌和产生毒素的细菌(诸如破伤风、白喉以及梭菌和肉毒梭菌)感染;原生动物感染,诸如由阿米巴病、疟疾(其致病物为恶性疟原虫(*P.falciparum*))、利什曼病、锥虫病、弓形虫病和贾第虫病引起的原生动物感染;以及蠕虫感染,诸如由肠道线虫、丝虫病、绦虫(cestode)(绦虫(tapeworm))和棘球绦虫感染引起的蠕虫感染。

[0671] 除了如本文所述的Lck活化剂在如上所述的疾病或病状的防治或治疗中的用途以外,在本发明的其它实施方案中,根据本发明的本发明Lck活化剂可进一步应用于干细胞疗法、胚胎干细胞自我更新,以及胚胎干细胞(例如胚胎胚胎的胚胎干细胞)的多能性的维持,并且所有此类用途均明确地被本发明所涵盖。

[0672] 具体而言,诱导多能细胞是通过被迫表达对于维持胚胎干细胞的定义属性重要的基因和因子而被基因重编程为胚胎干细胞样状态的成年细胞。只有将成年细胞编程成为干细胞后,才能诱导它们分化为所需的生殖细胞层。虽然Src家族酪氨酸激酶的成员对于人类胚胎干细胞的分化至关重要,但Lck表达水平却随着胚胎干细胞分化而急剧下降(Zhang X等人,Stem Cell Res,2014,13(3Pt A):379-389)。

[0673] 白血病抑制因子(LIF)是用于小鼠胚胎和诱导多能干细胞的培养和衍生的关键外源性因子之一,并且活化“信号转导和转录活化因子3”(STAT3),其是小鼠胚胎干细胞自我更新的重要调节因子(Dang-Nguyen TQ等人,Molecular Reproduction and Development,2014,81:230)。反过来,已知STAT3通过阻止谱系特异性分化程序的活化而抑制向中胚层和内胚层谱系的分化(Graf U等人,Genes,2011,2(1):280-297)。因此,STAT3对于维持未分化的胚胎干细胞表型至关重要(Raz R等人,PNAS USA,1999,Cell Biology,96:2846-2851)。

[0674] 重要的是,STAT3的活化是诱导多能性的限制因素,并且它的过表达消除了建立多能性对额外因素的需要(Yang J等人,Cell Stem Cell,2010,7(3):319-328)。因此,STAT3信号传导被认为是主要指导原初多潜能的主要重编程因子之一,因为STAT3促进了自我更新因子的表达(Li Y-Q,Cellular Reprogramming,2010,12(1):3-13)。已证实Lck会直接活化STAT3,而外源性Lck对STAT3的活化受Lck特异性抑制剂PP1减弱(Lund TC等人,Cell Signal,1999,11(11):789-796)。因此,根据本发明的Lck活化剂可经由刺激Lck活性而起到上调STAT3活性的作用,因此可应用于促进和维持干细胞自我更新。

[0675] 进一步地,如本文所述的Lck活化剂特别可应用于T细胞,可应用于加强包括细胞介导的免疫力在内的免疫力和免疫反应、挽救细胞免疫力、上调T细胞受体信号传导、上调一种或多种细胞因子(例如,选自IL-2、IFN- γ 和TNF- α)的产生、重新激发T细胞、使一种或多种T细胞免疫反应复苏,以及可用作佐剂(例如,在疫苗组合物中或者单独施用给个体以

刺激对抗原的免疫反应)。

[0676] 因此,本文进一步提供了用于对个体进行接种的疫苗组合物,其包含一种或多种本发明实施的Lck活化剂以及药学上可接受的载剂。疫苗可包含通过施用疫苗会产生针对其的免疫反应的任何一种或多种合适的抗原,以及任选地,用于刺激针对所述一种或多种抗原的免疫反应的任何另外的佐剂。

[0677] 在至少一些实施方案中,可能需要刺激T细胞受体(TCR)才能实现由如本文所述的Lck活化剂治疗引起的T细胞生理结果(例如,IL-2细胞因子产生增加,T细胞信号传导上调等)。即,Lck活化剂可以起增强T细胞受体刺激的生理结果的作用,而不是基础地活化T细胞。因此,在本文所述的方法的至少一些实施方案中,由施用的Lck活化剂处理的T细胞是受到刺激的T细胞。

[0678] 对根据本发明的一个或多个实施方案的Lck活化剂有反应的T细胞群体可以例如选自由以下组成的组:上皮内T细胞、粘膜内T细胞、 γ/δ T细胞、树突状表皮T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞(Treg),以及前述细胞群体的组合。

[0679] 可以通过技术人员众所周知的合成或重组技术提供如本文所述的Lck活化剂或其一种或多种组分(例如,聚阳离子肽(PP)、增强肽(AP/P)和/或式II的化合物)。此外,根据本发明的Lck活化剂的如本文所述的聚阳离子肽和/或增强肽或其它肽(AP/P)可掺有不是由遗传密码编码的一种或多种氨基酸,或一种或多种氨基酸类似物。

[0680] 例如,可以利用一种或多种D-氨基酸、 β -氨基酸和/或同型氨基酸而不是L-氨基酸。实际上,如本文所述的Lck活化剂的聚阳离子肽(PP)和/或增强肽可以部分或完全由D氨基酸组成或者由例如以下中的一者或多者的组合组成:一种或多种D-氨基酸、一种或多种 β -氨基酸、一种或多种同型氨基酸、一种或多种 β -同型氨基酸、一种或多种L-氨基酸,以及L-或D-同型氨基酸。 β 氨基酸的实例包括 β -丙氨酸($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$)、 β -苯丙氨酸、 β -色氨酸、 β -酪氨酸、 β -亮氨酸等,包括阳离子氨基酸的 β 变体形式。氨基酸的同型变体形式的实例包括与标准L-半胱氨酸相比具有附加的 CH_2 基团的同型半胱氨酸。因此,在一些实施方案中,如本文所述的Lck活化剂的聚阳离子肽(PP)和/或增强肽或其它肽可以例如包括L-氨基酸,D-氨基酸或者L-氨基酸、D-氨基酸的混合物和/或如以上所讨论的其它氨基酸类型。使用一种或多种包含D-氨基酸的肽可以例如抑制肽酶活性(例如,内肽酶),从而增强肽的稳定性并增加肽的半衰期,从而增加Lck活化剂在体内的半衰期。

[0681] 如本文所述的肽或融合蛋白可在3维构象中受到约束,以用于如本文所述的方法中。例如,它可以与侧链结构一起合成,或者以其它方式掺入到体内具有已知稳定结构的分子中,或者环化以提供增强的刚性,从而提供在体内的稳定性。使肽、融合蛋白等环化的各种方法是已知的。肽可经由四种不同的途径,即头到尾(C-末端到N-末端)、头到侧链、侧链到尾,或侧链到侧链来环化。例如,可以向融合蛋白的肽提供沿肽或融合蛋白彼此间隔开的两个半胱氨酸残基,并且可通过残基的巯基氧化以在它们之间形成二硫桥来将所述融合蛋白的肽环化。环化还可以通过在肽的N-末端氨基酸和C-末端氨基酸之间形成肽键,或例如通过在赖氨酸残基侧链上带正电荷的氨基与谷氨酰胺残基侧链上带负电荷的羧基之间形成键来实现。在氨基酸之间形成直接化学键或使用任何合适的接头来实现环化也完全在技术人员的范围内。用于实现根据本发明的环化的特别优选的方法包括形成内酰胺基团,并且用于形成如本文所述的肽和/或Lck活化剂的环化形式的内酰胺化的使用明确地被本

发明所涵盖。包括合适的内酰胺化方法在内的实现环化的方法,例如在White CJ和Yudin AK., *Contemporary strategies for peptide macrocyclization*. *Nature Chemistry*, 2011年6月,第509页中有描述,其全部内容通过交叉引用并入本文。

[0682] 构成如本文所述的Lck活化剂的肽或融合蛋白(例如,聚阳离子肽增强肽部分)还可包括翻译后或合成后修饰,诸如碳水化合物部分的附接或导致氨基酸残基烷基化或乙酰化或其它涉及化学键形成的变化的一种或多种化学反应。

[0683] 还考虑了构成根据本发明的Lck活化剂的一种或多种肽的肽模拟物的使用,其被明确地涵盖在本文中。肽模拟物可以例如包含用氨基酸类似物对所述肽的一个或多个氨基酸进行的取代,其中一种或多种氨基酸类似物基本上不降低亲本肽的活性,如可以通过常规活性、细胞毒性和/或其它合适的测定法评估的。

[0684] 如本文所述的Lck活化剂及其组分可以化学合成或使用常规重组技术产生。编码融合蛋白的核酸例如可以通过以下方式提供:采用平末端和寡核苷酸接头来将编码具有一个或多个期望氨基酸序列的肽的单独cDNA片段接合起来,视情况进行消化以提供交错末端,并对粘性末端进行扎结。可替代地,可采用引物对DNA片段进行PCR扩增,这产生具有互补末端的扩增子,随后可将扩增子扎结在一起。可将如本文所述的肽和融合蛋白在体外表达并从细胞培养物中纯化,以施用于哺乳动物受试者或与式II的化合物偶联以提供Lck活化剂,以用于本发明利用任何合适的技术实施的方法。

[0685] 固相肽合成(SPPS)、点击化学和葡萄球菌分选酶A介导的肽-肽融合方案或前述的组合也可用于提供如本文所述的Lck活化剂,例如用于将肽组分偶联在一起和/或用于与靶向部分例如scFv等偶联。此类合成方法的各种方案是众所周知的,并且可以采用任何合适的此类方法。

[0686] 特别优选采用Fmoc或t-Boc或保护基团合成治疗剂的SPPS方法。此类合成方法是众所周知的,并且包括在脱保护步骤之前和之后存在洗涤步骤的重复的偶联和脱保护循环。在本文所述的至少一些实施方案中,可以通过SPSS在固体支持物上合成完整的治疗剂。为了合成例如式II的聚酰胺部分,可以将具有例如Fmoc保护的2-氨基的假脂肪酸构建块(building block)依序偶联在一起,以形成具有3至5个重复单元的部分的聚酰胺骨架,每个重复单元均具有如上所述的R基侧链。同样,然后将Lck活化剂的一个或多个肽组分依序偶联到聚酰胺部分(PM),以使活化剂在C-末端至N-末端的方向上延伸,之后使合成的Lck活化剂从固体支持物上释放出来并收集该合成的Lck活化剂。

[0687] 分选酶A(Srt A)是一种首先在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中描述的细菌酶,它在裂解序列LPXTG中的苏氨酸和甘氨酸之间裂解,生成酰基酶中间体,然后该中间体可以与N-末端甘氨酸残基反应从而使该酶释放出来并且使甘氨酸和LPXTG标记组分通过肽键融合在一起,参见Levary, D.A等人, "Protein-protein fusion catalysed by sortase A". *PLoS ONE*, 2011年4月,第6卷(4):1-6, e18342。还请参见,例如, Witte, M.D., "Production of unnaturally linked chimeric proteins using a combination of sortase-catalysed transpeptidation and click chemistry". *Nat. Protoc.* 2013年9月, 8(9):1808-1819, 以及 Bently ML. 等人, *J. Biol Chem*, 2008, 283:14762-14771, 和 Mazmanian SK. 等人, 1999, *Science*, 285:760-763。例如,已经描述了经由分选酶A介导的蛋白质扎结与荧光标签或毒素连接的重组HER1和HER2靶向抗体,参见,例如 Madej MP 等人,

Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109:1461-1470, 以及 Kornberger P. 和 Skeria A., 2014, mAbs 6 (2):354-366, 前述所有参考文献的内容都通过交叉引用整体并入本文。

[0688] 点击化学是另一种高产率的方法, 其适于在制取如本文所述的 Lck 活化剂的过程中将组分偶联在一起, 所述偶联是例如通过一个组分上的末端叠氮化物基团与另一个组分上的叠氮化物基团之间的金属催化的 (例如, Cu(I)) 叠氮化物-炔烃环加成反应来实现, 凭借所述方法将所述组分通过 1,2,3 三唑键而不是肽键偶联在一起。1,2,3 三唑键充当常规肽键的生物电子等排体, 并具有抵抗水解的优势, 参见例如, Li 等人, Click chemistry in peptide-based drug design, Molecules, 2013, 18, 第 9797-9817 页; doi:10.3390/molecules18089797。环辛炔 (诸如二苯并-双环辛炔 (DBCO)) 同样与叠氮化物具有高反应性, 并为如上所述的叠氮化物-炔烃环加成提供了点击化学反应的替代形式, 或者可以与叠氮化物-炔烃环加成组合使用以提供由本发明实施的 Lck 活化剂。基于环辛炔的点击合成反应的优点在于, 它们可以在没有铜或其它金属催化剂的情况下进行。

[0689] 可以通过如下方式使诸如 scFv、抗体或抗体片段之类的靶向部分与如上所述的 Lck 活化剂的接头部分 (LM) 偶联: 首先制备两种组分的半胱氨酸衍生物, 将该半胱氨酸衍生物裂解并纯化成 HCl 盐, 然后采用马来酰亚胺偶联, 利用溶液相中半胱氨酸的游离巯基使其与相应的点击试剂偶联。随后将该靶向部分用叠氮化物或炔烃 (或例如 DBCO) 试剂衍生化, 点击缀合经由偶联至接头部分 (LM) 的互补试剂进行。

[0690] 在其它实施方案中, 可以用编码如本文所述的融合蛋白 (即嵌合蛋白) Lck 活化剂 (例如, 包含如本文所述的聚阳离子肽 (PP) 和增强肽或其它肽 (AP/P)) 的核酸转染哺乳动物受试者的靶细胞, 以利用一种或多种宿主细胞的转录元件和翻译核糖体复合物在体内表达所述核酸, 以实现根据本发明的治疗性治疗 (例如, 防治或治疗病原性感染)。

[0691] 为了表达编码如本文所述的它们的一种或多种 Lck 活化剂组分 (例如, 肽活性物和增强肽) 的核酸, 通常首先将核酸引入到克隆载体中并在宿主细胞中扩增, 然后将核酸切下并将其掺入到用于转染细胞的一种或多种合适表达载体中。该表达载体可以被设计成独立于宿主细胞的基因组 DNA 表达核酸插入物, 或者被设计成定点、同源或异源重组到宿主细胞的基因组 DNA 中, 以便随后在宿主细胞中表达核酸插入物。

[0692] 典型的克隆载体 (例如粘粒) 掺有容许载体有效复制的复制起点 (ori)、使得能够选择用载体转化的宿主细胞的报告基因或标记基因, 以及促进目标核酸序列的插入和后续切除的限制酶裂解位点。优选地, 克隆载体具有掺有限制性位点阵列的多接头序列。标记基因可以是抗药基因 (例如, 针对氨苄青霉素抗药的 Amp^r), 即一种编码诸如以下的酶的基因: 氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 β -内酰胺酶、腺苷脱氨酶 (ADA)、氨基糖苷磷酸转移酶 (APH)、二氢叶酸盐还原酶 (DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶 (HPH)、胸苷激酶 (TK) 或例如大肠杆菌 lacZ 基因 (LacZ') 编码的 β -半乳糖苷酶。酵母报告基因包括咪唑甘油磷酸脱水酶 (HIS3)、N-(5'-磷酸核糖基)-邻氨基苯甲酸异构酶 (TRP1) 和 β -异丙基苹果酸脱氢酶 (LEU2)。表达载体也可以掺有此类标记基因。可以使用的克隆载体包括哺乳动物、酵母和昆虫细胞的克隆载体。可应用的特定载体包括基于 pBR322 的载体和 pUC 载体, 诸如 pUC118 和 pUC119。

[0693] 合适的表达载体包括能够表达 DNA (例如, 基因组 DNA 或 cDNA) 插入物的质粒。表达载体通常将包括与插入的核酸序列可操作地连接的转录调控序列。“可操作地连接”意指核酸插入物与转录调节控制序列连接, 以容许插入的序列转录而在插入物的阅读框中没有移

位。此类转录调节控制序列包括用于促进RNA聚合酶结合以引发转录的启动子,用于使核糖体能够与转录的mRNA结合的表达控制元件和用于调节启动子活性的增强子。启动子可以是组织特异性启动子,其仅在特定细胞谱系而不在其它细胞类型中或在此类其它细胞类型中仅以相对较低的水平促进核酸插入物的转录。表达载体的设计将取决于待转染的宿主细胞、转染模式以及所需的核酸插入物转录水平。

[0694] 适于转染生物(例如细菌)或真核生物(例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞)的许多表达载体是本领域已知的。适于转染真核细胞的表达载体包括pSV2neo、pEF.PGK.puro、pTk2、pRc/CNV、pcDNA1/neo、掺有聚腺苷酸化位点和延伸因子1- α 启动子的非复制型腺病毒穿梭载体,以及最优选掺有巨细胞病毒(CMV)启动子的基于pAdEasy的表达载体。为了在昆虫细胞中表达,可以利用杆状病毒表达载体,其实例包括基于pVL的载体诸如pVL1392和pVL941,以及基于pAcUW的载体诸如pAcUW1。根据本发明的实施方案的用于在哺乳动物细胞中表达核酸插入物的优选表达载体包括具有CMV或延伸因子1 α 启动子的质粒,诸如pEF.PGK.puro(Huang, David C.S.等人, *Oncogene* (1997) 14:405-414)。pEF.PGK.puro质粒含有SV40起点、EF-1 α 启动子、多克隆位点和聚A区域,并且特别优选用于表达编码如本文所述的肽或嵌合蛋白的核酸插入物。

[0695] 表达载体的各种形式是本领域已知的,并且任何合适的此类表达构建体均可用于预期目的。病毒转移方法还可用于实现将编码如本文所述的Lck活化剂的核酸在体外或体内引入到靶细胞中。可以将表达载体包装到其中以递送至靶细胞的合适病毒包括腺病毒,牛痘病毒,禽、鼠和人起源的逆转录病毒,疱疹病毒(包括单纯疱疹病毒(HSV)和EBV)、乳多空病毒(诸如SV40)和腺相关病毒。可用于本文所述的方法中的特别优选的病毒包括复制缺陷型重组腺病毒或其它病毒。重组病毒可以局部或全身施用以实现将编码肽或融合蛋白的核酸递送到靶细胞中。还可以使用常规的冷或热休克技术或例如本领域已知的磷酸钙共沉淀或电穿孔方案,在体外在细胞内递送编码如本文所述的肽或融合蛋白的核酸。

[0696] 可以筛选转染的细胞以鉴定表现出核酸插入物的稳定、可再现表达以及编码的肽或融合蛋白的伴随产生的培养物或细胞系。核酸在各种宿主细胞内的稳定整合和表达是本领域众所周知的。可用于表达如本文所述的肽或融合蛋白的宿主细胞包括细菌和益生菌,诸如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)、短杆菌属(*Brevibacterium*),尤其是扩展短杆菌(*B. linens*)菌株,酵母诸如酵母属(*Sacchromyces*)和毕赤酵母属(*Pichia*),昆虫细胞、禽类细胞和哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、COS、HeLa、HaRas、WI38、SW480和NIH3T3细胞。大肠杆菌用于重组蛋白生产的用途是众所周知的,并且用于此类表达系统的合适的启动子包括T7、trc和lacUV5(Tegel H等人, *FEBS Journal*, 2011, 278:729-739)。将宿主细胞在合适的培养基中在促进引入的核酸表达的条件下培养,之后根据情况使用标准纯化技术从宿主细胞和/或上清液中纯化表达的产物。而且,表达的产物可包括宿主细胞(例如细菌细胞,诸如大肠杆菌)内的用于通过ELISA进行定量的组氨酸标签,可从所述宿主细胞制备如下所述的靶向小细胞制品(MacDiarmid J等人, *Cancer Cell*, 2007, 11:431-445)。

[0697] 具体而言,可以在小细胞(例如,De Boer PA等人, *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)、脂质体、幽灵细菌细胞、空心球体(caveosphere)、合成高分子剂、经超速离心的纳米颗粒和其它无核纳米颗粒中装载如本文所述的Lck活化剂、核酸或表达载体(例如质粒),以将货物靶向递送至靶细胞。此类穿梭剂可被配制用于注射或口服摄取,以便通过胃的酸性环境以使货物经由小肠释放和吸收。

[0698] 小细胞是纳米大小的细胞,其可以通过控制正常细胞分裂的一个或多个基因的突变产生,并且含有细胞质,并从而含有用于亲本细胞蛋白质表达的细胞质组分,但是是无染色体的,不能自我复制。已经证实通过抑制(或上调)控制细胞分裂的基因来产生小细胞能提供以比静脉内输注通常使用的剂量少得多的剂量将药物递送至肿瘤的解决方案(MacDiarmid,J.A.等人,JC(2007),Cancer Cell;11;431-445)。在本发明的上下文中,小细胞可以由亲本细胞的异常细胞分裂产生的任何无染色体的细胞,如可能是由于细胞分裂过程的扰动或干扰(例如,二分裂),例如由所涉及的细胞组分的一种或多种遗传突变和/或抑制引起的。可以通过诸如在国际专利申请号W0 03/033519、美国专利号7,183,105和MacDiarmid,J.A.等人,2007中描述的任何常规已知的方法来制备在如本文所述的方法中使用的小细胞,所有这些参考文献的内容均通过交叉引用明确地整体并入本文。例如,De Boer,P.A.等人,“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,第641-649页中进一步描述了控制细胞分裂以产生细菌小细胞的细菌基因的失活。US 7,611,885和US 8,003,091中描述了利用密度梯度离心法(例如,OptiPrep™,Axis-Shield PLC,Dundee,Scotland)纯化完整小细胞的方法,这两篇专利的内容也都通过交叉引用明确地整体并入本文。

[0699] 可以衍生出本文可用的小细胞的细菌细胞的实例包括细菌,诸如大肠杆菌(*E.coli*) (例如,具有在MinA、MinB、cya、crp、MukA1或MukeE内的突变,或者其过表达minB、minE、flsZ、sdi)、枯草芽孢杆菌某些种(例如,具有在minC、minD、ripX内的突变,或具有smc突变或OriC缺失)、乳杆菌属某些种和假单胞菌属种。细菌可为革兰氏阳性的(例如单核细胞增生李斯特菌(*L.monocytogenes*))或革兰氏阴性的(例如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*))。从外膜中具有孔蛋白的细菌(即,通常为革兰氏阴性细菌,但是一些革兰氏阳性细菌也具有孔蛋白)中分离出来的小细胞是特别优选的,以利于将待递送至靶细胞的如本文所述的核酸、表达载体或Lck活化剂装载到小细胞中。小细胞也可以衍生自古细菌或真核细胞,例如参见US7,183,105。然而,通常,将利用细菌来源的小细胞,即衍生自细菌亲本细胞的小细胞。

[0700] 可通过使用任何合适的靶向部分(例如,经由小细胞或脂质体上的双特异性抗体、靶向一个或多个scFv的肽等)获得小细胞对细胞的靶向以实现根据本发明的治疗。靶向部分可以在小细胞的表面上表达,或者例如,小细胞可以用一个或多个选定的靶向部分加标或标记。在特别优选的实施方案中,小细胞对肿瘤细胞的靶向可以使用呈这样的双特异性抗体复合物的形式的靶向部分实现,所述双特异性抗体复合物识别小细胞表面脂多糖的O-抗原组分和对待靶向的哺乳动物细胞具有特异性的细胞表面受体(例如EGFR),该复合物的该两种抗体经由它们的Fc区借助于蛋白A/G连接在一起(参见MacDiarmid,J.A.等人,JC(2007),Cancer Cell;11;431-445,和W0 03/033519。然而,本发明不限于此,并且可以如上

所述采用其它靶向部分。

[0701] 如本文所述的一种或多种Lck活化剂可以在小细胞内或小细胞上被携带至靶细胞或组织。例如,所述一种或多种Lck活化剂可以被装载到小细胞中,在小细胞的膜中表达,或者例如通过电荷缔合而被携带在小细胞的膜上。

[0702] 通过在含有Lck活化剂或核酸的孵育介质中孵育小细胞,小细胞可以通过被动扩散而装载如本文所述的Lck活化剂或核酸(例如,表达载体)。为了辅助装载,可使小细胞对所述一种或多种Lck活化剂或一种或多种核酸具有渗透性(例如,通过使小细胞穿孔),或者可以例如通过常规的已知技术增加或增强小细胞对所述剂的渗透性。

[0703] 具体而言,可以通过使用各种已知的可逆和不可逆的方法来促进如本文所述的Lck活化剂和核酸通过细菌小细胞的膜进入。这些方法包括电穿孔(Miller L.等人, *Technology in Cancer Research&Treatment*, 2005, 4:1-7)、暴露于洋地黄皂苷(Melo RF.等人, *Cell Biochemistry and Function*, 1998, 16:99-105)、NSAIDS(Mizushima T, *Inflammation and Regeneration*, 2008, 28:100-105)、Triton-X100(van de Ven AL.等人, *J Biomedical Optics*, 2009, 14(2):1-10)、植物皂苷(Bachran C.等人, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008, 8:575-584)、乳酸(Alakomi HL等人, *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5):2001-5),以及诸如此类的方法。

[0704] 可替代地,可以用表达如本文所述的Lck活化剂的表达载体转染可从其产生小细胞的细菌或其它细胞,其中该小细胞在产生时由此装载有表达的Lck活化剂。

[0705] 小细胞的内含物或货物进入靶细胞可以通过使小细胞易位进入靶细胞来进行,这通过由于小细胞与靶细胞上表达的细胞表面受体的相互作用引起的吞噬作用(例如,通过嗜中性粒细胞和巨噬细胞),或通过胞吞作用(网格蛋白介导的或不依赖网格蛋白的胞吞作用),以及随后小细胞降解和小细胞内含物释放到靶细胞的细胞质中(例如,从细胞内区室,例如内体和/或溶酶体释放)来进行。

[0706] 为了辅助小细胞的装载,可以将如本文所述的Lck活化剂的一个实施方案的肽组分连接至碳水化合物部分,例如葡萄糖(D或L异构体),以便促进通过细菌来源的小细胞上存在的LamB孔蛋白运输。孔蛋白超家族含有许多同型三聚体跨膜蛋白,该三聚体跨膜蛋白在革兰氏阴性细菌的外细胞膜上形成充水孔隙。大多数孔蛋白形成一般的非特异性通道,这些通道受环境变化的调节。麦芽糖孔蛋白(LamB孔蛋白)负责将麦芽糖和麦芽糖糊精引导扩散到大肠杆菌细胞中。具体而言,LamB蛋白还可以促进葡萄糖的扩散(von Meyenburg K和Nikaido H, *Biochem Biophys Res.* 第78卷:第1100-1107页, (1977)),并且从测试的很多种糖中发现葡萄糖在体外跨LamB蛋白扩散的速率最快(Luckey M和Nikaido H, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 第77卷:第167-171页, (1980))。如本文所述的Lck活化剂、融合蛋白及其肽组分可通过如下方式从细胞培养物中纯化:对细胞膜进行超声处理或者使用洗涤剂破坏细胞膜,离心去除膜和固体片段,并且如果适用的话,通过本领域已知的方法进行亲和或免疫亲和色谱法从溶液或上清液中纯化。可以使用的合适的此类固体基质和支持物包括但不限于琼脂糖、琼脂糖凝胶(sepharose)和其它可商购的支持物(例如,乳胶、聚苯乙烯或右旋糖酐珠粒等)。可以利用常用的酰胺或酯类接头,或通过吸附使用于将本发明的肽或融合蛋白固定在固体支持物上以便后续从中洗脱和浓缩的抗体、其结合片段或其它合适的结合分子与固体基质共价结合。

[0707] 进一步地,适合在脂质体、聚合物、含固体金属的纳米颗粒等中使用的纳米颗粒,诸如白蛋白、明胶、磷脂也可用于递送如本文所述的Lck活化剂(例如,参见De Jong WH&Borm PJA,Int J Nanomedicine,2008,3(2):133-149)。用针对靶细胞的各种配体或受体的抗体对纳米颗粒进行外部包被的技术也是众所周知的,并且可以用于本发明的实施方案中。

[0708] 具体而言,根据本发明的Lck活化剂的脂质递送包括通过脂质体、固体脂质纳米颗粒、反向脂质胶束、脂质微管和脂质微柱体(在Swaminatham J&Ehrhardt C,Expert Opin Drug Deliv,2012,9(12):1489-1503中有综述)。含肽货物的脂质体已经例如被提出用于经皮递送,作为喷雾剂,用于鼻内、眼和经颊途径以及用于口服、肠胃外和肺途径(在Swaminatham J和Ehrhardt C,Expert Opin Drug Deliv,2012,9(12):1489-1503中有综述)。脂质体已经作为药物和基因递送媒介物受到广泛研究,并且最近作为肽递送媒介物受到广泛研究(PCT公开号W02013033838 A1,Pharmagap Inc,提交日期2012年8月21日,发明人;Sokoli K和Chabot JM)并且聚乙二醇化脂质体制剂在大多数情况下包含中性脂质和阴离子脂质的混合物。

[0709] 有许多临床上验证的基于脂质体的药物疗法可用,与非靶向脂质体相比,靶向脂质体在肿瘤组织中实现增强的细胞内药物递送(Kirpotin DB等人,Cancer Res,2006,66:6732)。而且,最近已经报道脂质体介导的基因跨血脑屏障成功递送以治疗胶质瘤(Yue P-J等人,Molecular Cancer,2014,13:191)。基于脂质体的细胞靶向和细胞内化途径的组合可用于根据本发明的方法将Lck活化剂递送至细胞(例如,递送至T细胞以增强免疫系统/免疫反应,如针对病原体或癌细胞等的免疫反应)。

[0710] 用于改善如本文所述的Lck活化剂向靶细胞(例如免疫细胞)的递送的方法可以包括用靶向配体对脂质体表面进行功能化,所述靶向配体识别由免疫细胞选择性表达的受体诸如CD3或人源化抗CD4抗体(TNX-355,现在称为伊巴珠单抗,TMB-355),由Zhang X-Q等人,Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2006,50(6):第2231-2233页描述)。伊巴珠单抗是一种非免疫抑制性单克隆抗体,其结合CD4(HIV的主要受体)并抑制病毒进入过程(Ibalizumab(TMB-355):TaiMed Biologics.2009-09-09)。脂质体外表面上的聚乙二醇化也有助于双特异性抗体或其衍生物的使用,该双特异性抗体或其衍生物同时靶向免疫细胞或癌细胞上的PEG单元和受体。通过用连接至将本文所述的Lck活化多肽裂解掉的MMP9/2裂解序列的Lck活化剂靶向癌细胞,这样可以增强肿瘤浸润淋巴细胞的抗癌活性。本发明人已经证明,MMP9/2不裂解本文所述的Lck活化剂多肽。因此,如本文所述的Lck活化剂可以封装在脂质体内,该脂质体靶向在靶细胞(例如,癌细胞或免疫细胞)上表达的表面抗原,诸如HER1、HER2、PSMA(前列腺特异性膜抗原)或另一种抗原。

[0711] 如本文所述的Lck活化剂、肽、融合蛋白、工程化抗体和其它结合部分(例如,scFv)可以例如在宿主细胞中表达,具有本领域已知的标签(例如,c-myc和聚His标签)以有助于它们的纯化以及/或者评价它们与细胞系的结合能力。在利用此类标签的情况下,编码的Lck活化剂、肽等可以进一步包括有利于使用内肽酶去除标签的合适的氨基酸序列。同样,编码如本文所述的Lck活化剂、肽、融合蛋白等的核酸可进一步包括信号肽序列,以促进翻译的产物从宿主细胞中分泌,以便如上所述的那样通过亲和色谱法进行纯化。用于制备用于免疫亲和色谱法和亲和色谱法方案的固体基质的方案例如在Current Protocols in

Molecular Biology-Ausubel FM. 等人, Wiley-Interscience, 1988 及其后续更新中有描述。

[0712] 如本文所述的 Lck 活化剂、其肽组分、融合蛋白和核酸可以分离或纯化的形式提供。如本文所用的术语“纯化的”涵盖如可以通过电泳和/或其它技术评价的, 例如达到 80% 或更高的纯度水平, 或至少 85%, 或至少 90%, 或至少 95%, 或至少 96%, 或至少 97% 或至少 98% 或更高 (例如 99% 或更高) 的纯度水平的部分纯化。

[0713] 在另一些进一步的实施方案中, 如本文所述的 Lck 活化剂的一种或多种肽组分的一个或多个游离末端可以例如甲基化、乙酰化或用多个乙二醇单体单元聚乙二醇化, 以使其抵抗体内蛋白酶降解的能力降低或者以抑制 Lck 活化剂经由肾脏从循环中清除。多肽/肽的聚乙二醇化的方法是本领域众所周知的, 所有此类方法都明确地被本发明所涵盖。通常, 在本发明实施的方法中使用的聚乙二醇化肽将与 2 个或更多个聚乙二醇 (PEG) 单体单元偶联, 并且一般与约 2 至约 11 个 PEG 单体 (即 (PEG)_n, 其中 n 等于 2 至 11) 偶联。最通常地, n 将为 2。而且, 构成本发明实施的 Lck 活化剂的肽可以环化以提供增强的刚性, 从而提供在体内的稳定性, 并且各种此类方法是本领域已知的。

[0714] 虽然如本文所述的 Lck 活化剂可以作为用于防治或治疗根据本发明的适用疾病或病状的唯一药物施用于受试者, 但是在至少一些实施方案中, 该治疗剂可以与一种或多种用于治疗 (即, 防治性或治疗性治疗) 所述疾病或病状的其它药物组合施用。常规用于治疗特定疾病或病状的任何合适的药物都可以与所述组合疗法中的一种或多种如本文所述的治疗剂一起使用, 例如检查点阻断剂。

[0715] 可以在根据本发明的组合疗法中使用的常规抗病毒药可以例如选自逆转录病毒药、蛋白酶抑制剂、整合酶抑制剂、细胞进入抑制剂和神经氨酸酶抑制剂。

[0716] 实例包括核苷逆转录酶抑制剂, 诸如齐多夫定 (zidovudine, AZT)、阿巴卡韦 (Abacavir)、拉米夫定 (lamivudine)、恩曲他滨 (emtricitabine) 和阿昔洛韦 (Acyclovir); 核苷酸逆转录酶抑制剂, 诸如替诺福韦 (Tenofovir); 非核苷逆转录酶抑制剂, 诸如奈韦拉平 (nevirapine) 和依非韦伦 (efavirenz); 细胞进入抑制剂, 诸如马拉韦罗 (maraviroc) 和恩夫韦地 (Enfuvirtide); 整合酶抑制剂, 诸如雷特格韦 (Raltegravir)、埃替格韦 (Elvitegravir) 和度鲁特韦 (Dolutegravir); 蛋白酶抑制剂, 诸如地瑞那韦 (Darunavir)、阿扎那韦 (Atazanavir)、茚地那韦 (Indinavir)、洛匹那韦 (Lopinavir)、奈非那韦 (Nelfinavir)、安普那韦 (Amprenavir) 和利托那韦 (Ritonavir); 以及神经氨酸酶抑制剂, 诸如扎那米韦 (zanamivir) 和奥司他韦 (oseltamivir)。

[0717] 在至少一些实施方案中, 如本文所述的 Lck 活化剂可以包括在用于治疗 HIV 或其它逆转录病毒感染的常规组合疗法中, 所述常规组合疗法例如可以选自由以下组成的组: 可比韦 (combivir) (齐多夫定和拉米夫定)、三协唯 (Trizivir) (阿巴卡韦、齐多夫定和拉米夫定)、克力芝 (Kaletra) (洛匹那韦和利托那韦)、Epzicom (阿巴卡韦和拉米夫定)、特鲁瓦达 (Truvada) (替诺福韦和恩曲他滨)、立普妥 (Atripla) (依非韦伦、替诺福韦和恩曲他滨)、Stribild (埃替格韦、可比司他、替诺福韦和恩曲他滨) 和三恩美 (trumeq) (度鲁特韦、阿巴卡韦和拉米夫定)。

[0718] 可以在根据本发明的组合疗法中使用的常规抗菌药物可以例如选自由以下组成的组: 抗生素, 诸如青霉素、头孢菌素、碳青霉烯、氨基糖苷、磺酰胺、喹诺酮和噁唑烷酮。

[0719] 可以在根据本发明的组合疗法中使用的常规抗原生生物药物可以例如选自以下组成的组：甲硝唑、奥硝唑、依氟鸟氨酸、呋喃唑酮、美拉肿醇、替硝唑和乙胺嘧啶。

[0720] 可以在如本文所述的组合疗法中使用的常规抗蠕虫药物包括苯并咪唑类，诸如阿苯达唑、甲苯达唑、三苯达唑、氟苯达唑和芬苯达唑。

[0721] 如本文所述的Lck活化剂也可用于治疗用常规药物治疗另一种疾病或病状所引起的机会性感染。例如，常用于治疗慢性髓细胞性白血病的药物格列卫 (Gleevec) (伊马替尼, ST1571) 是酪氨酸激酶的有效抑制剂，并且通过抑制Lck活性而降低TCR诱导的增殖和活化 (Seggewiss R等人, 2005, Blood, 105:2473-2479)，这对诱导机会性感染有影响。这也同样适用于改善来自其它酪氨酸激酶抑制剂 (诸如伊马替尼、尼洛替尼或达沙替尼) 的副作用。例如，尽管免疫增强药物诸如细菌超抗原 (例如葡萄球菌肠毒素A (SEA)) 引起了潜在的发病率，但是鉴于Lck受SEA活化并且缺乏选择性Lck活化剂，有人提出将SEA用于预防慢性髓系细胞性白血病中伊马替尼介导的T细胞免疫抑制 (Wang G等人, BioMed Research International, 2014, 文章编号682010)。

[0722] 在一些实施方案中，用于防治或治疗如本文所述的病原性感染或其它疾病或病状的常规药物可通过例如共价键，通过电荷吸引或借助于合适的接头与根据本发明的Lck活化剂复合。用于将药物连接至Lck活化剂的合适的接头包括，例如，优选限定一个或多个酶裂解位点 (例如，MMP裂解位点) 以在靶细胞或靶组织处或其内部释放药物的长度为1至10个原子的接头，巯基接头以及/或者氨基酸或氨基酸序列。举例来说，药物可以直接地或使用如上所述的合适的接头系统间接地与Lck活化剂的化合物 (例如，式II的聚酰胺部分) 偶联 (例如，经由聚酰胺部分的末端NH₂基团或其它合适的末端基团偶联)，或与例如，Lck活化剂的聚阳离子肽 (PP) 或增强肽或其它肽 (AP/P) 的末端偶联。

[0723] 如本文所述的Lck活化剂对细胞的活性和/或细胞毒性的特征可以通过各种常规已知的测定法，诸如以下的一者或多者来确定：评价细胞形态、台盼蓝拒染、凋亡评估、细胞增殖研究 (例如，细胞计数、³H-胸苷摄取和MTT测定)、激酶活性测定、蛋白质印迹 (Western blot) 和免疫荧光研究。

[0724] 可以根据本发明的方法将如本文所述的Lck活化剂施用给哺乳动物，或者可以使细胞与Lck活化剂在体外接触。同样，本发明提供了离体治疗，其中在哺乳动物外部用Lck活化剂处理细胞，然后将细胞返回、施用或植入到哺乳动物体内。

[0725] 如本文所述的Lck活化剂、载体 (例如表达载体) 或核酸可以以用于施用于预期受试者的药物组合物提供，所述药物组合物包含药学上可接受的稀释剂、载剂和/或赋形剂。所述Lck活化剂或核酸可以口服、鼻内、经吸入 (例如通过气雾剂喷雾)、静脉内、肠胃外、直肠、皮下、通过输注、局部、肌肉内、腹膜内、鼻内、脊髓内、眼内或经由任何其它被认为恰当的途径施用。

[0726] 直肠和/或结肠提供了使用与肽偶联的各种吸收增强剂诸如烯胺 (苯丙氨酸和苯基甘氨酸)、5-氨基或-甲氧基水杨酸酯、螯合剂、中链脂肪酸、环糊精、pH敏感聚合物包衣药物、偶氮聚合物前药等来增强肽的药物吸收的途径 (例如，参见Tiwari G等人, International J Drug Delivery, 2010, 2:01-11; Kolte BP等人, Asian J Biomedical & Pharmaceutical Sciences, 2012, 2 (14): 21-28; Philip AK等人, OMJ, 2010, 25:70-78; 和 Lakshmi PJ等人 2012, Asian J Res Pharm Sci, 2 (4): 143-149)，并且如本文所述的Lck活

化剂的此类施用模式和形式也明确涵盖在本文中。

[0727] 药物组合物可以例如是适于所选施用途的液体、悬浮液、乳剂、糖浆、霜剂、可摄取的片剂、胶囊、丸剂、栓剂、粉剂、锭剂、酏剂或其它形式。

[0728] 可用于根据本发明的方法中的药物组合物包括水性药物溶液。可注射的组合物将在存在注射性的程度上是流体,并且通常在预定时期内是稳定的,以提供生产后的储存。而且,药学上可接受的载剂可以包括任何合适的常规已知溶剂、分散介质、水、生理盐水和等渗制品或溶液、表面活性剂,并且可以利用任何合适的药学上可接受的载剂(例如,口服或局部可接受的载剂)。合适的分散介质可以例如含有乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、植物油及其混合物中的一者或多者。具体而言,Lck活化剂或核酸可以例如与惰性稀释剂、可同化的可食用载剂一起配制并且/或者它可以封装在硬壳或软壳明胶胶囊中。

[0729] 如本文所述的药物组合物还可掺有一种或多种适于体内和/或局部施用的防腐剂,诸如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞。另外,可通过在组合物中使用用于延迟吸收的剂诸如单硬脂酸铝和明胶来实现组合物的延长吸收。含有如本文所述的Lck活化剂或核酸的片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可含有以下的一种或多种:粘合剂,诸如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或海藻酸;润滑剂,诸如硬脂酸镁;甜味剂,诸如蔗糖、乳糖或糖精;和调味剂。

[0730] 如上所述的成分和介质在药物组合物中的用途是众所周知的。除非任何常规介质或成分与如本文所述的Lck活化剂不相容,否则它们在如本文所述的治疗性和防治性药物组合物中的用途也被包括。

[0731] 如本文所用的“组合疗法”意指通过相同或不同途径,以与其它一种或多种药物相同或不同的制剂,预先、同时或依序施用根据本发明的Lck活化剂或核酸,由此所述一种或多种活化剂和/或一种或多种核酸在重叠的治疗窗内发挥它们的一种或多种作用。

[0732] 特别优选将肠胃外组合物配制成剂量单位形式以易于施用和实现剂量均一性。如本文所用的剂量单位形式意指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位,每个单位含有预定量的至少一种根据本发明的Lck活化剂或核酸,经计算该预定量会联合所用的相关载剂和/或赋形剂产生所需的治疗或防治效果。当剂量单位形式为例如胶囊、片剂或丸剂时,各种成分可以用作包衣(例如虫胶、糖或两者)以以其他方式改变剂量单位的物理形式或者以促进向受试者的施用。

[0733] 药物组合物一般将含有至少约1重量%的如本文所述的Lck活化剂。该百分比可以变化,并且可以方便地介于所述组合物或制剂的约5%至约80%w/w之间。同样,考虑到提出的施用途,根据本发明的Lck活化剂或核酸的量应使得合适的有效剂量将被递送给受试者。优选的口服药物组合物将含有约0.1 μ g至15g的Lck活化剂。

[0734] 根据本发明的Lck活化剂或核酸的剂量将取决于许多因素,该因素包括将所述Lck活化剂或核酸施用用于防治性还是治疗性用途,预期施用该试剂的疾病、病状或目的,疾病或病状的严重程度,受试者的年龄,以及包括受试者的体重和总体健康状况在内的相关因素,如可由医师或护理人员根据公认的原则确定的。例如,最初可以给予低剂量,随后在评价受试者的反应后在每次施用时增加剂量。类似地,可以以相同的方式来确定施用频率,即通过连续监测受试者在每个剂量之间的反应,并且如有必要,则增加施用频率或可替代地,

降低施用频率。

[0735] 通常,如本文所述的Lck活化剂将根据本发明实施的方法施用,以提供高达约100mg/kg个体体重,更通常在高达约50mg/kg体重的范围内,且最通常在约5mg/kg至40mg/kg体重的范围内的Lck活化剂的剂量。在至少一些实施方案中,将施用Lck活化剂以提供在约5至25mg/kg体重的范围内,通常在约5mg/kg至约20mg/kg的范围内,且更通常在10mg/kg至约20mg/kg的范围内的Lck活化剂的剂量。当口服施用时,每天可施用最多约20g的Lck活化剂(例如每天口服4剂,每剂包含5g的Lck活化剂)。

[0736] 关于静脉内途径,特别合适的途径是通过注射以使Lck活化剂或核酸全身地分布到血管中,血管供给待治疗的组织或一个或多个特定器官。而且,Lck活化剂可以通过任何合适的输注或灌注技术来递送。所述Lck活化剂或核酸(例如,装载在细菌来源的小细胞中的表达载体)也可以递送到腔体,例如胸膜或腹膜腔中,或直接注射到待治疗的组织中。

[0737] 可用于本文所述的方法中的合适的克隆和表达载体及其制备和递送的方法在熟练技术人员众所周知的指南和手册中有描述,例如,参见Ausubel等人(1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, USA, 第1和2卷, John Wiley & Sons, 1992; Sambrook等人(1998) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, New York, 及其再版和更新, 其内容通过交叉引用整体并入本文。同样,可用于如本文所述的组合物中的合适的药学上可接受的载剂和制剂可以在熟练技术人员众所周知的手册和教科书,诸如"Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Mack Publishing Co., 1995)"及其任何再版和更新中找到。例如, WO 200631996、WO 200631689、WO 200629981、WO 200629005、US20060063731和US 20060063924中描述了用于转染细胞以及在体内表达核酸插入物的方法和方案,上面列出的所有前述出版物、指南和手册的内容通过交叉引用整体并入本文。

[0738] 如本文所述的那样治疗的哺乳动物可以是可根据本发明治疗的任何哺乳动物。例如,哺乳动物可以是牛科、猪科、羊科或马科的成员,实验室试验动物诸如小鼠、兔子、豚鼠、猫或狗,或灵长类动物或人。通常,所述哺乳动物是人。

[0739] 在另一方面,本发明提供了本文所述的Lck活化多肽在制造用于治疗和/或预防本文所提及的疾病和/或病状(包括年龄相关性变化)的药物中的用途。

[0740] 在另一方面,本发明提供了本文所述的Lck活化多肽用于治疗 and/或预防本文所提及的疾病和/或病状(包括年龄相关性变化)的用途。

[0741] 下面通过许多非限制性实施例来进一步描述本发明。

[0742] 实施例

[0743] 实施例1: 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(Lck)在体外受聚精氨酸多肽活化。

[0744] 在体外检查本发明的多肽活化Lck的能力。Lck是酪氨酸激酶Src家族的成员。Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited (Dundee Technology Park, Dundee, United Kingdom) 使用在15 μ M表观K_m以内的ATP浓度,在肽底物(KVEKIGEGTYGVVYK)和试验多肽的存在下,在半对数剂量范围内,进行体外Lck活化激酶研究。所有结果均是相对于对照(100%)的Lck活性百分比。

[0745] 以1.0 μ M的浓度评估试验多肽。

[0746] 图1显示包含4、5或6个连续精氨酸残基的多肽在1 μ M的肽浓度下不活化Lck。

[0747] 当以1 μ M的肽浓度使用包含10个连续组氨酸残基的肽(十组氨酸肽;10His)时,未观察到Lck活性的增加。

[0748] 当以1 μ M的肽浓度使用包含10个连续鸟氨酸残基的肽(十鸟氨酸肽;10Orn)时,观察到的Lck活性可忽略不计。

[0749] 然而,令人惊讶地,例如,包含8至20个连续精氨酸残基的多肽能够活化Lck。包含8、9、10、12、14、20个连续精氨酸残基的多肽在1 μ M的肽浓度下活化Lck。

[0750] 例如,12聚体精氨酸序列(IK01200)活化Lck,产生相对于对照的401%的Lck活性。

[0751] 图1还显示,发现10个连续赖氨酸残基(十赖氨酸肽;10Lys)在1 μ M的肽浓度下会使Lck活性增加161%。

[0752] 图1显示包含连续的D精氨酸残基的肽在1 μ M的肽浓度下活化Lck。例如,8聚体精氨酸序列(IKD00800)活化Lck,产生相对于对照的80%的Lck活性。14聚体精氨酸序列(IKD1400)活化Lck,产生相对于对照的228%的Lck活性。

[0753] 图1还证明包含连续精氨酸残基和连续组氨酸残基的肽在1 μ M的肽浓度下活化Lck。例如,9聚体精氨酸序列和10聚体组氨酸序列(IK00910)活化Lck,产生相对于对照的348%的Lck活性。

[0754] 重要的是,图1还证明包含阴离子残基的肽确实活化了Lck。例如,9聚体天冬氨酸序列(IKD9;DDDDDDDD)在1 μ M的肽浓度下不会活化Lck。

[0755] 该数据证明本发明的肽能活化淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(Lck)。

[0756] 实施例2:淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(Lck)受聚精氨酸和聚赖氨酸多肽选择性地活化。

[0757] 在体外检查本发明的多肽活化Src家族激酶的能力。如实施例1所述的那样进行利用肽的激酶活化研究,并且所有激酶活性值均以相对于对照的百分比表示。

[0758] 图2显示,Lck受图1的聚精氨酸Lck活化多肽选择性地活化;除Lck以外,没有Src家族激酶(SFK)被1 μ M肽浓度的聚精氨酸和聚赖氨酸肽活化。与实施例1和图1一致,十组氨酸肽(10His)在该浓度下不诱导Lck的任何活化。

[0759] 该数据证明Lck活化肽选择性地活化Lck,而不活化Blk、cSRC、Fgr、Fyn、Hck、Lyn或Yes。

[0760] 实施例3:Lck活化聚精氨酸多肽增加Lck磷酸化并且Lck活化聚精氨酸多肽增加Lck在Y394处的磷酸化。

[0761] Lck的Tyr394磷酸化导致Lck的构象打开,从而活化Lck激酶。

[0762] 由Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited(Dundee,United Kingdom)执行免疫印迹研究。简言之,将Lck(h)在试验肽的存在下,使用标准KinaseProfilerTM反应条件(Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited)以及在15 μ M的K_m以内的ATP浓度进行孵育。让反应在室温下进行40分钟,然后通过添加SDS-样品缓冲液终止反应。在每种情况下,将Lck酶稀释以得到每25 μ l反应物20ng。还对不存在化合物和肽的适当对照,以及Lck(h)和Lck(h)活化激酶的未经处理的样品进行了试验。然后使用抗体4G10(抗磷酸酪氨酸抗体)(参见图3)和抗pY394 Lck(R&D Systems MAB7500)(参见图2)对所得样品进行SDS-PAGE和蛋白质印迹分析。还使用二次检测抗体(抗小鼠HRP)进行了另一次印迹。将该膜用丽春红S(Ponceau S)染色以验证样品的上样量和有效的蛋白质转

移。4G10抗体是一般的抗磷酸酪氨酸抗体,Lck中有几个酪氨酸残基,但只有一个自体磷酸化酪氨酸残基,即在位置Y394处。因此,抗py394抗体特异性地检测Lck的自体磷酸化。样品如下(数字对应于凝胶上的泳道):

- [0763] 1.分子量标记
[0764] 2.标准Lck
[0765] 3.标准Lck+肽底物+ATP(无试验肽)
[0766] 4.标准Lck-肽底物+ATP(无试验肽)
[0767] 5.标准Lck+ATP+10Arg肽(IK00100;1 μ M)(无肽底物)
[0768] 6.标准Lck+ATP+10Arg肽(IK00100;10 μ M)(无肽底物)
[0769] 7.标准Lck+ATP+8Arg肽(IK00800;1 μ M)(无肽底物)
[0770] 8.标准Lck+ATP+8Arg肽(IK00800;10 μ M)(无肽底物)
[0771] 9.10Arg(IK00100)(10 μ M)(仅试验肽)
[0772] 10.8Arg(IK00800)(10 μ M)(仅试验肽)

[0773] 免疫印迹方案的步骤如下:

SDS-PAGE 凝胶: 处于 200V 下 50 分钟

蛋白质印迹转移: 处于 25V 下 90 分钟

膜: 硝酸纤维素预切印迹膜

[0774] 0.2 μ m 孔隙尺寸(LC2000 (Life Tech))

丽春红染色: 0.1%的在 5%乙酸中的丽春红 S (w/v)

[0775] 在施加一抗和二抗之前,将膜用10mL PBST和10%BSA封闭1小时。

[0776] 一抗:

[0777] 1.抗4G10(Millipore 05-777)以1/1000稀释于PBST中,在4℃下孵育过夜,然后用4x 20mL PBST洗涤。

[0778] 2.抗pY394 Lck(R&D Systems)以1/2500稀释于PBST中,在4℃下孵育过夜,然后用4x 20mL PBST洗涤。

[0779] 二抗:

[0780] 抗小鼠hrp(Sigma A5278)以1/5000稀释于PBST中,然后在室温下在螺旋振荡器上用4x 20mL PBST洗涤5小时。通过SuperSignal ELISA Pico化学发光底物-37070(Pierce)执行检测。

[0781] 用抗磷酸酪氨酸4G10抗体进行探测,在全部泳道2-8中产生条带,如图3A所示。泳道1中的标准Lck产生模糊条带,表明存在一些内源性Lck磷酸化。在ATP的存在下孵育导致与自体磷酸化一致的条带强度增加,而孵育中肽底物KVEKIGEGTYGVVYK的存在似乎不会显著影响自体磷酸化的程度(参见泳道3-4)。在试验肽(8Arg:RRRRRRRR(IK00800)或10Arg:RRRRRRRRRR(IK00100))的存在下孵育导致在Lck上观察到的磷酸化水平显著提高。而且,磷酸化水平随着试验肽浓度的增加而增加(参见泳道5-8)。在泳道9和10(仅试验肽)中未显示相应的条带。

[0782] 该数据证明选择性地活化Lck的聚精氨酸多肽能增强Lck的自体磷酸化。该数据还证明,聚精氨酸多肽能以剂量依赖性方式增强Lck的自体磷酸化。

[0783] 图3B中显影的蛋白质印迹显示了通过抗pY394抗体检测到的Y394处Lck自体磷酸化所获得的结果。如可以看到的,标准Lck泳道(泳道2)未显示出表明在酪氨酸Y394位点处不存在内源性Lck磷酸化的条带。在有或无肽底物KVEKIGEGTYGVVYK的情况下,在ATP的存在下孵育均不会导致条带强度的增加(泳道3-4)。在试验肽的存在下孵育导致在Lck的氨基酸位置Y394处检测到的磷酸化水平显著增加。同样,磷酸化水平随着试验肽浓度的增加而增加(参见图3B的泳道5-8)。相应的条带在泳道9或10中不可见,表明与试验肽8Arg (IK00800)和10Arg (IK00100)没有交叉反应性。

[0784] 该数据证明选择性地活化Lck的聚精氨酸多肽能增强Lck在Y394处的磷酸化。该数据还证明,聚精氨酸多肽能以剂量依赖性方式增强Lck在Y394处的磷酸化。

[0785] 实施例4:聚精氨酸多肽在体外增强Lck活化

[0786] 检查了同时包含赖氨酸和精氨酸的多肽在体外活化Lck的能力。如实施例1所述的那样进行利用肽的Lck活化研究,并且所有激酶活性值均以相对于对照的百分比表示。

[0787] 图4显示,多肽RSKAKNPLY (IK09400)和RSKAKNPLYR (IK14000)在1 μ M下不活化Lck。类似地,该多肽的较短衍生物未显示出Lck活化或仅显示出可忽略的Lck活化。

[0788] 例如,RSKAK和RSKAK-RR显示出相对于对照的仅5%的Lck活化。

[0789] 图4显示,当非Lck活化多肽与图1中描述的Lck活化多肽融合时,令人惊讶地该融合物不仅能够活化Lck,而且观察到Lck活化的意外增强。例如,当非Lck活化多肽RSKAKNPLY与图1所示的包含9个连续精氨酸残基的多肽融合以选择性地活化Lck (RRRRRRRRR;325%)时,所得的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR融合物显示出Lck活化增加(496%)。

[0790] 如从图4可以看出的,对于单独的肽RSKAK或当偶联1-4个精氨酸残基时,没有观察到Lck活化或观察到可忽略不计的Lck活化。类似地,对于单独的肽RSKAKNPLY或RSKAKNPLYR,或当肽RSKAKNPLY与4个精氨酸残基的序列偶联时,未观察到Lck活化。然而,当肽RSKAKNPLY与5个邻接的聚精氨酸残基(肽IK14400)偶联时,观察到中等水平的Lck活化(85%)。用肽RSKAKNPLY-RRRRRR (IK14500) (82%),以及对于完全由D氨基酸组成的右旋反向肽rskaknply-rrrrrrr (ID94600)而言获得了相似的结果,所述右旋反向肽诱导Lck活性增加60%。

[0791] 令人惊讶地,也如图4所示,当将肽RSKAKNPLY-RRRRR通过向该肽的每个末端添加半胱氨酸氨基酸(即,肽C-RSKAKNPLY-RRRRR-C;IK4500C)来进行环化时(221%),或者当将更长的聚精氨酸序列与肽RSKAK和RSKAKNPLY偶联时,获得Lck活性的大幅增加。当将更长的聚精氨酸序列与肽RSKAKNPLY的逆向或右旋逆向形式偶联时,也获得Lck活化的类似大幅增加。参见,例如,观察到Lck活性增加531%的肽RSKAK-RRRRRRRRR (IK50900),获得630%的Lck活性增加的肽RRRRRRRRR-YLPNKAISR (IK9R94Y),以及分别获得490%和616%的Lck活性增加的肽rskaknply-rrrrrrrrrrr (IKD14800)和rrrrrrrrrrr-ylpnkaksr (IKR81400)。

[0792] 此外,获得542%的Lck活性大幅增加的肽RRRRRRRRR-SKAKNPLYR (IK9R94S)。也如图4所示,当将聚阳离子序列KKKKKKKKKK或RHHHHHHHHHH与肽RSKAKNPLY偶联时,仅观察到Lck活性的适度增加(参见肽IK94K90和IK14010)(分别为49%和30%),表明聚精氨酸序列增强Lck活化/刺激的程度高于聚赖氨酸和聚组氨酸序列。

[0793] 当将肽RSKAKNPLY与两个或三个邻接的聚阳离子序列(即,每个由聚精氨酸或聚组氨酸序列组成)或者与包含重复RK氨基酸偶联体的聚阳离子序列偶联时,也获得Lck活性的

大幅增加,如图4和图5中所示。实际上,对于肽IK11480和IK14810分别获得883%和899%的Lck活性增加。在支化肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (Br IK14810) 中也保持大幅增加的Lck活性。

[0794] 此外,如图5中可见,当用单独的肽RVKVKVVVV (IK95000) 或者与测试的范围为5至9个邻接精氨酸氨基酸残基的聚精氨酸序列偶联时,获得Lck活性的大幅增加。也如该表所示,对于肽RRRRRRRRR-RVKVKVVVV-R (IK80150),获得了相似的Lck活性增加。

[0795] 图5中还列出了当将肽RVKVKVVVV (IK95000) 与聚精氨酸和聚组氨酸序列的组合偶联或者与包含重复精氨酸和组氨酸 (RH) 偶联体的聚阳离子序列偶联时的Lck刺激结果。同样,观察到Lck活性的显著增加,对于肽RVKVK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810) 观察到与对照活性相比Lck活性增加778%。

[0796] 这些结果表明,令人惊讶地,非Lck活化多肽(例如RSKAKNPLY)能够增强1 μ M下的本发明的Lck活化多肽(包括Lck活化聚精氨酸多肽(例如RRRRRRRRR))对Lck的活化。

[0797] 实施例5:Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂以剂量依赖方式活化Lck

[0798] 图6证明Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (“IK14804”) 以剂量依赖性方式活化Lck。“(2Adod)₄”表示四个2-氨基十二烷酸。

[0799] 实施例6:Lck活化多肽增加人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系中的IL-2分泌。

[0800] 检查了Lck活化多肽改变IL-2分泌的能力。

[0801] 简言之,通过将野生型Jurkat细胞(永生化人T淋巴细胞系)在抗CD28抗体和抗生物素蛋白(avidin)的存在下暴露于生物素化抗CD3抗体中来对该野生型Jurkat细胞进行刺激。在培养期(48小时或72小时)内,将细胞暴露于试验多肽。在48小时或72小时结束时,如上所述的那样使用标准的商购ELISA试剂盒测定细胞上清液中的IL-2。

[0802] 图7A显示暴露48小时后,Lck活化多肽“IK00900”RRRRRRRRR相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导了IL-2分泌。

[0803] 图7B显示暴露72小时后,Lck活化多肽“IK14800”RSKAKNPLY-RRRRRRRRR相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导了IL-2分泌。

[0804] 这些数据证明,本发明的Lck活化多肽能够诱导人T细胞系中的IL-2分泌,而在未受刺激的Jurkat细胞中不能诱导IL-2分泌。

[0805] 实施例7:Lck活化多肽增加分离的人CD4⁺和CD8⁺T细胞的IL-2分泌。

[0806] 检查了Lck活化多肽对分离的人CD4⁺和CD8⁺T细胞的IL-2分泌的影响。

[0807] 简言之,从健康的人PBMC中分离出CD4⁺和CD8⁺T细胞并进行免疫磁性分离。在Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR的存在下用抗CD3和抗CD28刺激48小时后,检查IL-2的水平。

[0808] 图8显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”) 相对于对照在分离的人CD4⁺和CD8⁺T细胞中诱导了IL-2分泌。

[0809] 实施例8:Lck活化多肽增加分离的人CD3⁺T细胞的IL-2分泌

[0810] 检查了Lck活化多肽对分离的T细胞 (CD3⁺T细胞) 的IL-2分泌的影响。

[0811] 简言之,将分离的T细胞 (CD3⁺) 用抗CD3抗CD28 DynabeadsTM刺激,并且与5个浓度

的范围内的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (“IK15800”)和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (即rvkvkvvvv-rrrrrrrrr; “IKD15800”)加上媒介物对照 (0-1.25 μ M) 一起培养72小时,之后收集上清液并通过ELISA评估上清液中的IL-2。

[0812] 图9显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (即rvkvkvvvv-rrrrrrrrr) 相对于对照在分离的人T细胞中诱导了IL-2分泌。

[0813] 还检查了在受刺激CD4+T细胞测定中Lck活化多肽对CD4+T细胞的IL-2分泌的影响。简言之,将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与5个浓度的范围内的Lck活化多肽RRRRRRRRR (“IK00900”)和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (“IK14800”)加上媒介物对照 (0-1.25 μ M) 一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IL-2和IFN- γ 。在受刺激T细胞测定中,Lck活化多肽RRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR相对于对照在人CD4+T细胞中诱导了IL-2分泌(数据未示出)。这些数据表明本发明的Lck活化多肽能够诱导受刺激人CD4+T细胞的IL-2分泌(数据未示出)。

[0814] 实施例9:Lck活化多肽增加人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系中的IL2Ra (CD25) 表达

[0815] 检查了Lck活化多肽对T细胞系上的IL2Ra (CD25) 表达的影响。

[0816] 简言之,如上那样将野生型Jurkat细胞 (1 $\times 10^6$ 个细胞) 在标准RPMI培养基和10%胎牛血清中培养,不加以刺激或者用PMA (50ng/ml) 和离子霉素刺激96小时。在整个96小时的培养期内,将细胞暴露于图10中列出的试验肽 (浓度2.5 μ M) 中,并使用如上所述的标准商用ELISA格式确定细胞裂解物中的IL-2Ra水平。

[0817] 图10显示将受刺激细胞暴露于肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14900)、HHHHH-RSKSKNPLY-RRRRRRRRR (IK11480)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH (IK14820) 以及尤其是肽RSKAKNPLYRRRRRRRRR (IK14800) 中时,IL-2Ra (CD25) 的表达增加。

[0818] 这个数据表明,本发明的Lck活化多肽能够诱导人T细胞系上的IL-2Ra表达。

[0819] 实施例10:Lck活化多肽增加受到再刺激的耗竭CD4+细胞上的IL2Ra (CD25) 表达。

[0820] T细胞耗竭的特征在于T细胞功能逐步进行性丧失,并且可以反应细胞的物理缺失告终。白细胞介素2 (IL-2) 的产生是首先被消除的效应子活动之一,其次是肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生,而产生干扰素- γ (IFN- γ) 的能力对失活更有抵抗力。

[0821] 检查在1 μ M下不活化Lck的肽IK14000 (RSKAKNPLYR),以及Lck活化融合多肽IK14800 (RSKAKNPLYRRRRRRRRR) 和IKD14800 (rskaknply-rrrrrrrrr) 对IL2Ra表达的影响。

[0822] 使用鼠模型 (Tg4 Ly5.1 (MBP-Tracker小时), B10PlxC57BL/6) 进行CD4+T细胞耗竭测定,由此将CD4+T细胞受体转基因T细胞用于产生完全反应性效应T细胞的野生型髓鞘碱性蛋白肽 (WT-MBP) 或者用于产生耗竭T细胞的改变的肽配体肽MBP (APL-MBP) 进行刺激。将这些细胞静置于IL-2中,然后用APC、一定剂量的APL-MBP肽连同正在研究的任何治疗剂进行二次刺激。

[0823] 细胞培养程序

[0824] 取出上述小鼠的脾脏并进行处理以产生脾细胞的单细胞悬浮液。使MBP-Tracker脾细胞以3 $\times 10^6$ 个/mL重悬,并用WT-MBP (对照,非耗竭细胞) 或APL-MBP刺激 (以产生耗竭细胞)。将细胞刺激72小时。刺激后,通过Ficoll密度梯度纯化T细胞,随后将其以2 $\times 10^6$ 个/mL

在20U/mL IL-2中重新铺板并保持4天。在此静置期结束时,将细胞重悬(4×10^5 个/mL,每孔最终 2×10^4 个),并使用经辐照的APC(来自B10PLxC57BL/6小鼠, 4×10^6 个/mL,最终浓度为每孔 2×10^5 个细胞)、单剂量的一定浓度范围内的APL-MBP肽和试验肽再刺激。培养48-72b小时后,通过流式细胞术针对IL-2Ra和增殖的标志物(分别为CD25和Ki-67)评估细胞,并收集上清液以通过ELISA或多重免疫测定评估细胞因子的产生(IFN- γ 和TNF- α)。

[0825] 培养72小时后对细胞染色进行流式细胞术检查以评估CD25(MFI,顶部,指示表达水平以及频率,底部)。从能存活群体中,对细胞进行设门以聚焦于CD4+细胞,然后对CD4+细胞进行设门以聚焦于CD25+群体。

[0826] 图11证明在用Lck活化融合多肽IK14800(RSKAKNPLY-RRRRRRRRR)和IKD14800(rskaknply-rrrrrrrrrr)再刺激后,在耗竭的CD4+T细胞中CD25的表达增加。该数据证明,Lck活化多肽能够增强已经经受再刺激的耗竭T细胞中的生理控制结果(例如,IL-2Ra表达)。

[0827] 实施例11:Lck活化多肽可从检查点阻断中挽救人T细胞系。

[0828] 为防止免疫系统过度活化,程序性死亡1(PD-1)途径充当检查点以控制T细胞活化。当配体PD-L1和PD-L2与PD-1受体结合时,该途径被活化,导致T细胞“耗竭”,这是对T细胞活化和增殖的可逆性抑制。检查了本发明的Lck活化融合多肽从PD-L1诱导的检查点阻断中挽救人T细胞的能力。

[0829] 简言之,将Jurkat细胞通过暴露于培养皿粘附的抗CD3抗体中来活化,以诱导程序性细胞死亡受体1(PD-1)的细胞表面表达,并且在不存在添加剂的情况下或者与单独的肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH₂(2.5 μ M的IK14800)、单独的5 μ g/ml重组PD-L1(PD-1的配体)一起培养48小时以诱导细胞中的检查点阻断,或者与IK14800肽加上重组PD-L1一起培养。借助于如上所述的标准可商购ELISA试剂盒测量细胞裂解物中的IL-2Ra(CD25)。

[0830] 与以上所示的数据一致,图12显示经CD3刺激的细胞(在不存在PD-L1的情况下),当用本发明的Lck活化融合多肽处理时,具有增加的CD25表达水平。

[0831] 重要的是,图12显示RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH₂的添加挽救了由PD-1/PD-L1相互作用诱导的IL-2Ra的抑制。

[0832] 该数据证明本发明的Lck活化多肽能够从由PD-L1诱导的检查点阻断中挽救人T细胞。

[0833] 实施例12:Lck活化多肽增加经抗CD3刺激的CD4+细胞和CD8+细胞上的IL2Ra(CD25)表达

[0834] 检查了Lck活化多肽对来自经抗CD3刺激的PBMC的CD4+和CD8+T细胞上的IL2Ra(CD25)表达的影响。将新分离的PBMC在所指示浓度(μ M)的根据本发明的Lck活化多肽;RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH₂(“IK14800”)的存在下,用或不用(-aCD3)抗CD3(1 μ g/mL)刺激24小时。

[0835] 图13证明当用抗CD3刺激时,CD4+和CD8+T细胞中的IL2Ra(CD25)的表达增加。

[0836] 该数据证明,Lck活化肽增强CD4+和CD8+T细胞中的IL-2Ra表达。

[0837] 实施例13:Lck活化多肽增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌

[0838] 检查了Lck活化多肽改变IL-12分泌的能力。简言之,通过将野生型Jurkat细胞(永生人T淋巴细胞系)在抗CD28抗体和抗生物素蛋白(avidin)的存在下暴露于生物素化抗

CD3抗体中来对该野生型Jurkat细胞进行刺激。在培养期(48小时)内,将细胞暴露于试验多肽中。在48小时结束时,如上所述的那样使用标准的可商购ELISA试剂盒测定细胞上清液中的IL-12。

[0839] 图14A显示暴露48小时后,Lck活化融合多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRR相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导了IL-12分泌。暴露48小时后,Lck活化聚精氨酸多肽RRRRRRRRR相对于对照在野生型Jurkat细胞中也诱导了IL-12分泌(数据未示出)。这些数据表明,本发明的Lck活化多肽能够在人T细胞系中诱导IL-12分泌。

[0840] 检查Lck在Lck活化多肽改变IL-12分泌的能力中的作用。简言之,通过将缺乏Lck的Jurkat细胞(J.Cam 1.6)在抗CD28抗体和抗生物素蛋白(avidin)的存在下暴露于生物素化抗CD3抗体中来对它们进行刺激。在培养期(48小时)内,将细胞暴露于试验多肽中。在48小时结束时,如上所述的那样使用标准的可商购ELISA试剂盒测定细胞上清液中的IL-12。

[0841] 图14B显示Lck活化多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRR (IK14800) 相对于对照在Jurkat细胞中诱导IL-12分泌的能力因Lck的存在而增强。这些数据证明由Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR引起的人T细胞系中的IL-12分泌因Lck的存在而增强。

[0842] 实施例14:Lck活化多肽增加受刺激PBMC中的IL-12分泌

[0843] 进一步检查Lck活化多肽改变IL-12 (IL-12p70) 分泌的能力。简言之,将经抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (“IK15800”)、RSKAKNPLYRRRRRRRRR (“IK14800”),以及仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和RSKAKNPLYRRRRRRRRR (分别为“IKD15800”和“IKD14800”)一起,在存在和不存在抗CD40L封闭抗体的情况下培养24小时。通过ELISA评估上清液的IL-12p70水平。

[0844] 图15显示相对于在存在抑制IL-12产生的抗CD40L封闭抗体的情况下的经抗CD3刺激的PBMC,Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR以及仅包含D氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (分别为“IKD15800”和“IKD14800”)诱导经抗CD3刺激的PBMC中的IL-12分泌。

[0845] 这些数据还表明,本发明的Lck活化多肽能够诱导PBMC中的IL-12p70分泌。

[0846] 相对于无肽的情况,检查Lck活化多肽改变IL-12 (IL-12p70) 分泌的能力。简言之,将PBMC与抗CD3 (1 μ g/ml) 和Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR或RVKVKVVVV-RRRRRRRRR一起培养24小时或72小时。通过ELISA评估上清液的IL-12p70水平。

[0847] 图16显示,在24小时(和72小时;数据未示出),相对于无肽的情况,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导IL-12p70分泌。在72小时(数据未示出)时,相对于无肽的情况,Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 诱导IL-12p70分泌。

[0848] 实施例15:Lck活化多肽增加受刺激PBMC中的IL-12R β 2分泌

[0849] 检查了Lck活化多肽改变IL-12受体亚基 β 2 (IL-12R β 2) 表达的能力。

[0850] 将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 加上媒介物对照一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD4⁺T细胞和NK细胞 (CD3^{neg} CD56⁺细胞) 的IL-12R β 2表达。

[0851] 图17显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR在NK细胞 (CD3^{neg} CD56⁺细胞) 群体中诱导了IL-12R β 2表达。Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR还在CD4⁺T细胞群体中诱导了IL-12R β 2表达(数据未示出)。

[0852] 实施例16:Lck活化多肽没有增加受刺激CD4+T细胞中的IL-21R表达

[0853] 还检查了在受刺激CD4+T细胞测定中Lck活化多肽对CD4+T细胞上的IL-21R (CD360) 表达的影响。简言之,将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并与Lck活化多肽RRRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR一起培养,然后通过流式细胞术评估细胞的IL-21R表达。Lck活化多肽RRRRRRRRRR (IK00900) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR (IK14800) 没有增加受刺激人CD4+T细胞中的IL-21R表达(数据未示出)。

[0854] 实施例17:Lck活化多肽诱导IFN- γ 分泌

[0855] 检查了Lck活化多肽改变人PBMC的IFN- γ 分泌的能力。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RRRRRRRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR一起培养48小时,之后收集上清液并通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。相对于无肽对照,Lck活化多肽RRRRRRRRRR、RVKVKVVVV-RRRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR诱导了IFN- γ 分泌(数据未示出)。

[0856] 还检查了在受刺激CD4+T细胞测定中Lck活化多肽改变分离的人CD4+T细胞的IFN- γ 分泌的能力。简言之,将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与Lck活化多肽RRRRRRRRRR (IK00900) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR (IK14800) 一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。图18显示,相对于无肽对照,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR诱导IFN- γ 分泌。相对于无肽对照,Lck活化多肽RRRRRRRRRR诱导了IFN- γ 分泌(数据未示出)。

[0857] 检查了在受刺激CD8+T细胞测定中Lck活化多肽改变分离的人CD8+T细胞的IFN- γ 分泌的能力。简言之,将分离的CD8+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与Lck活化多肽RRRRRRRRRR (IK00900) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR (IK14800) 一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。相对于无肽对照,Lck活化多肽RRRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR诱导了IFN- γ 分泌(数据未示出)。该数据证明,本发明的Lck活化多肽能够诱导受刺激人CD8+T细胞的IFN- γ 分泌。

[0858] 实施例18:包含D氨基酸的Lck活化多肽诱导受刺激人CD4+和CD8+T细胞的IFN- γ 分泌

[0859] 检查了在受刺激CD8+T细胞测定中包含D氨基酸的Lck活化多肽改变分离的人CD8+T细胞的IFN- γ 分泌的能力。

[0860] 简言之,将分离的CD8+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与仅包含D氨基酸的Lck活化多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRRR (IKD14800) 一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。图19显示相对于无肽对照,仅包含D氨基酸的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR (IKD14800) 诱导受刺激的人CD8+T细胞的IFN- γ 分泌。

[0861] 还检查了在受刺激CD4+T细胞测定中包含D氨基酸的Lck活化多肽改变分离的人CD4+T细胞的IFN- γ 分泌的能力。简言之,将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与Lck活化多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRRR (IK14800) 或仅包含D氨基酸的Lck活化多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRRR (IKD14800) 一起培养24小时,之后通过ELISA评估上清液中的IFN- γ 。仅包含D氨基酸的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR,与仅包含L氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRRR一样,相对于无肽对照,诱导受刺激人CD4+T细胞的IFN- γ 分泌(数据未示出)。

[0862] 实施例19:在受刺激CD8+T细胞测定中Lck活化多肽增加CD8+T细胞的增殖。

[0863] 检查了在受刺激CD8+T细胞测定中Lck活化多肽诱导分离的人CD8+T细胞的增殖的能力。简言之,将分离的CD8+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并与Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR一起培养24小时,之后通过流式细胞术评估CD8+T细胞的Ki67表达。Ki67是一种用于确定给定细胞群体(在这种情况下为CD8+细胞)的生长分数的增殖标志物。图20显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加人CD8+T细胞的增殖群体。

[0864] 实例20:Lck活化多肽增加PBMC内的CD8+T细胞和CD3^{neg} CD56⁺NK细胞的增殖。

[0865] 检查了Lck活化多肽诱导在PBMC内分离的人CD8+T细胞的增殖的能力。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RRRRRRRRR (IK00900) 和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD8+T细胞中的Ki67表达。Ki67是一种用于确定给定细胞群体(在这种情况下为CD8+细胞)的生长分数的增殖标志物。图21显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 增加人CD8+T细胞的增殖群体。

[0866] 检查了Lck活化多肽诱导在PBMC内分离的人CD3^{neg} CD56⁺NK细胞的增殖的能力。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽rvkvkvvvv-rrrrrrrrr (IKD15800) 一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD3^{neg} CD56⁺NK细胞的Ki67表达。Ki67是一种用于确定给定细胞群体(在这种情况下为CD3^{neg} CD56⁺NK细胞)的生长分数的增殖标志物。Lck活化多肽rvkvkvvvv-rrrrrrrrr (IKD15800) 增加了人CD3^{neg} CD56⁺NK细胞的增殖群体(数据未示出)。

[0867] Lck活化多肽rvkvkvvvv-rrrrrrrrr (IKD15800) 也增加了呈CD25阳性的人CD3^{neg} CD56⁺NK细胞群体、呈CD215阳性的人CD3^{neg} CD56⁺NK细胞群体,以及呈CD360阳性的人CD3^{neg} CD56⁺NK细胞群体(数据未示出)。

[0868] 实施例21:Lck活化多肽增加CD8+和CD4+T细胞中的CD28表达。

[0869] 检查了Lck活化多肽改变CD28表达的能力。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD28表达。

[0870] 图22A显示相对于无肽对照,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导CD8+T细胞中的CD28表达。

[0871] 图22B显示相对于无肽对照,Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 诱导CD4+T细胞中的CD28表达。

[0872] 实施例22:Lck活化多肽增加PBMC上的IL-15R表达及PBMC的IL-15分泌。

[0873] 检查了Lck活化多肽对PBMC中CD4+T细胞上的CD215 (IL-15R) 表达的影响。简言之,将PBMC与抗CD3 (1μg/ml) 刺激物以及5个浓度的范围 (0-1.25μM) 内的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 和RSKAKNPLYRRRRRRRRR一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的CD215 (IL-15R) 表达。Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR增加了受刺激人CD4+T细胞上的IL-15R表达(数据未示出)。

[0874] 还检查了在受刺激CD8+T细胞测定中Lck活化多肽对CD8+T细胞上的IL-15R表达及CD8+T细胞的IL-15分泌的影响。简言之,将PBMC与抗CD3 (1μg/ml) 刺激物以及5个浓度的范围 (0-1.25μM) 内的Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLYRRRRRRRRR (IK14800) 一起培养。收集上清液并通过ELISA评估上清液中的IL-15。图23A显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加CD8+T细胞上的IL-15R表达,并且图23B显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 增加CD8+T细胞的IL-15分泌。图23C显示Lck活化多

肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 还增加了受刺激人CD8+T细胞的IL-15R表达。

[0875] 实施例23:Lck活化多肽增加PBMC内的CD28+CD8+T细胞的增殖。

[0876] 检查了Lck活化多肽诱导PBMC增殖的能力。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估细胞的Ki67表达。Ki67是一种用于确定给定细胞群体(在这种情况下为CD28+/CD8+细胞)的生长分数的增殖标志物。

[0877] 图24显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加人CD28+/CD8+T细胞的增殖群体。

[0878] 实施例24:Lck活化多肽增加CD4+和CD8+T细胞上的IL-18Ra表达。

[0879] 检查了在受刺激CD4+和CD8+T细胞测定中Lck活化多肽对CD4+和CD8+T细胞上的IL-18Ra表达的影响。简言之,将分离的CD8+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并与Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR和仅包含D氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR一起培养24小时,之后通过流式细胞术评估细胞的IL-18Ra表达。Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 和仅包含D氨基酸的RSKAKNPLYRRRRRRRRR (IKD15800),增加受刺激人CD8+T细胞上的IL-18Ra表达(数据未示出)。

[0880] 将分离的CD4+T细胞用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并与Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR和仅包含D氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR一起培养24小时,之后通过流式细胞术评估细胞的IL-18Ra表达。Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 和仅包含D氨基酸的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IKD15800) 增加受刺激人CD4+T细胞上的IL-18Ra表达(数据未示出)。

[0881] 实施例25:Lck活化多肽改变CD4+和CD8+T细胞中的pSTAT4表达。

[0882] 检查了在受刺激T细胞测定中Lck活化多肽对CD4+和CD8+T细胞中的细胞内pSTAT4表达的影响。简言之,将分离的T细胞(CD3+)用抗CD3抗CD28 Dynabeads™刺激,并且与5个浓度的范围内的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR、RVKVKVVVVRRRRRRRRR和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR加上媒介物对照(0-1.25μM)一起培养72小时,之后收集上清液并通过流式细胞术评估p-STAT4表达。

[0883] Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和仅包含D氨基酸的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IKD15800) 增加受刺激人CD4+T细胞上的p-STAT4表达(数据未示出)。

[0884] 实施例26:Lck活化多肽降低人PBMC内调节性T细胞的百分比。

[0885] 检查了Lck活化多肽对人PBMC内调节性T细胞数量的影响。简言之,将经过抗CD3刺激的PBMC与Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR和RSKAKNPLYRRRRRRRRR一起培养48小时,之后通过测量CD4+CD25+CD127^低群体内的Foxp3+细胞比例来确定Treg群体。Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800) 和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 降低了Treg (Foxp3+)的比例(数据未示出)。

[0886] 实施例27:CD40L增强CD14^{neg} CD11c⁺树突细胞表型。

[0887] 检查了CD40L对分离的未成熟DC细胞培养物中的树突细胞表型(CD14表达)的影响。简言之,未成熟的单核细胞来源的DC (iMoDC) 源自MoDC分化培养基中培养7天的分离的CD14+单核细胞。将iMoDC在CD40L (5ug/mL) 和抗CD3 (1ug/mL) 的存在下培养72小时。72小

时后,通过流式细胞术评估细胞的CD14和CD11c表达,以确定DC细胞表型。CD40L增加了CD14阴性CD11c⁺树突细胞的比例(数据未示出)。

[0888] 还检查了试验肽对分离的未成熟DC培养物中的树突细胞(DC)表型(CD14表达)的影响。

[0889] 简言之,未成熟的单核细胞来源的DC(iMoDC)源自Mo-DC分化培养基中培养7天的分离的CD14⁺单核细胞。将iMoDC在5点浓度的曲线上的测试肽加上媒介物(0-1.25 μ M)和抗CD3(1 μ g/mL)的存在下培养72小时。72小时后,通过流式细胞术评估细胞的CD14和CD11c表达,以确定DC细胞表型。呈现的数据指示响应于肽处理,CD11c阳性群体内平均的相应的CD14阳性或阴性细胞群体(%), $\pm$ SEM,n=4。通过RM双因素方差分析和Dunnett事后检验分析数据,将每种肽浓度与媒介物进行比较,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0890] Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)增加CD14阴性树突细胞群体(数据未示出)。

[0891] 实施例28:在受刺激T细胞测定中Lck活化多肽增加CD4⁺和CD8⁺T细胞上的IL-12R β 2表达。

[0892] 检查了Lck活化多肽改变T细胞上的IL-12受体亚基 β 2(IL-12R β 2)表达的能力。

[0893] 简言之,将分离的T细胞(CD3⁺)用抗CD3抗CD28 DynabeadsTM刺激并且与5个浓度的范围内的RVKVKVVVV-RRRRRRRRR加上媒介物对照(0-1.25 μ M)一起培养72小时,之后通过流式细胞术评估CD4⁺和CD8⁺T细胞的IL-12R β 2表达。

[0894] 图25显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)诱导CD4⁺和CD8⁺T细胞中的IL-12R β 2表达。

[0895] 实例29:在受刺激PBMC测定中Lck活化多肽增加NK细胞上的IL-2R β (CD122)表达

[0896] 检查了Lck活化多肽改变NK细胞上的IL-2受体亚基 β 2(IL-2R β)表达的能力。

[0897] 简言之,将来自健康供体的PBMC用抗CD3(1 μ g/mL)在试验肽(0.08-1.25 μ M)或媒介物对照的存在下刺激72小时。在培养期结束时,收集细胞并通过流式细胞术对该细胞进行CD3^{neg}CD56^{+/dim} NK细胞内的IL-2R β (CD122)表达评估。

[0898] 图26显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)诱导CD3^{neg}CD56^{+/dim} NK细胞中的IL-2R β 表达。

[0899] 实施例30:Lck活化多肽引起CD8⁺细胞群体的扩增

[0900] 检查了Lck活化多肽引起PBMC内的CD8⁺细胞群体扩增的能力。

[0901] 简言之,将来自健康供体的PBMC或分离的CD8⁺T细胞在RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(0.08-1.25 μ M)或媒介物对照的存在下经由TCR+IL-2刺激10天。在培养期结束时,收集细胞并通过流式细胞术评估该细胞中的CD8⁺细胞比例。

[0902] 图27显示Lck活化多肽RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)诱导PBMC内的CD8⁺细胞群体的扩增。

[0903] 实施例31:Lck活化多肽诱导CD4⁺T细胞产生IL-21。

[0904] 检查了Lck活化多肽诱导CD4⁺T细胞产生IL-21的能力。

[0905] 简言之,分离CD4⁺T细胞并且将其在抗CD3抗CD28刺激物和RSKAKNPLY-RRRRRRRRR的存在下培养24小时或48小时。在培养结束时,通过ELISA评估上清液中的IL-21。

[0906] 图28显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)诱导CD4⁺T细胞产生IL-

21。

[0907] 实施例32:在抗原刺激之前提供的Lck活化多肽诱导人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-2分泌。

[0908] 检查了Lck活化多肽诱导人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系产生IL-2的能力。

[0909] 简言之,将500万个细胞接种在T25烧瓶中并且用如上表所指示的不同浓度的RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)处理1小时,之后将细胞悬浮液离心并用新鲜培养基洗涤两次。将生物素-抗CD3和抗生物素蛋白(5:1.25ug)在500uL培养基中的混合物添加到12孔板的孔中。10分钟后,按每孔100万个接种细胞并且用培养基使细胞悬浮液达到2mL的体积。随后将样品进一步用抗CD28(5ug/mL)刺激,在37℃下孵育48小时,然后通过ELISA分析上清液(100uL, n=3)的IL-2含量。

[0910] 图29显示当在抗原刺激之前施用时,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)在随后的刺激后诱导人T细胞系产生IL-2。

[0911] 实施例33:施用于小鼠的Lck活化多肽诱导Lewis肺癌小鼠(转移模型)中的CD4+CD28+T细胞。

[0912] 检查了Lck活化多肽诱导小鼠中的CD4+CD28+T细胞的能力。

[0913] 简言之,使来源于ATCC的Lewis肺癌细胞在DMEM中生长至70%融合,将其分离并在PBS中洗涤。第0天,每只小鼠接受通过向尾静脉中静脉注射的 0.5×10^6 个LLC细胞。腹膜内施用治疗剂(IK14800,剂量为250μg在200μl水中),每周两次(细胞转移后第1、4、8和11天)。细胞接种后十五天,对小鼠实施安乐死,并取出脾脏以制作单细胞悬浮液,如上述方案中详述(斜体字)。然后通过流式细胞术评估分离的脾细胞悬浮液的CD4、CD8、NK1.1、CD28、CD215和pSTAT4表达。

[0914] 图30显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中表达CD28的CD4+T细胞的百分比以及CD4+T细胞上的CD28的相对表达。

[0915] Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)也增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中NK细胞上的CD25相对表达(数据未示出)。

[0916] 本发明人还证明了,如通过TIL的CD25+MFI和CD25+CD57+MFI所测量的,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)诱导从人肺癌肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分离的CD57+NK细胞中的CD25表达。简言之,在1.25um下处理后,RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)增加CD25表达。

[0917] 实施例34:施用于Lewis肺癌小鼠(转移模型)的Lck活化多肽诱导脾细胞中表达CD28和CD215的CD8+T细胞。

[0918] 检查了Lck活化多肽诱导小鼠中表达CD28和CD215的CD8+T细胞的能力。

[0919] 使来源于ATCC的Lewis肺癌细胞在DMEM中生长至70%融合,将其分离并在PBS中洗涤。第0天,每只小鼠接受通过向尾静脉中静脉注射的 0.5×10^6 个LLC细胞。腹膜内施用治疗剂(IK14800,剂量为250μg在200μl水中),每周两次(细胞转移后第1、4、8和11天)。细胞接种后十五天,对小鼠实施安乐死,并取出脾脏以制作单细胞悬浮液,如上述方案中详述(斜体字)。然后通过流式细胞术评估分离的脾细胞悬浮液的CD4、CD8、NK1.1、CD28、CD215和pSTAT4表达。

[0920] 简言之,分离出用RSKAKNPLY-RRRRRRRRR治疗的Lewis肺癌小鼠的脾细胞,并检查

经治疗的Lewis肺癌小鼠的CD28+CD8+细胞的比例。

[0921] 图31显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中的表达CD215 (IL-15R) 的CD8+T细胞的百分比和CD4+细胞上的CD28的百分比。

[0922] 实施例35:施用于小鼠的Lck活化多肽增加NK细胞上的pSTAT4表达。

[0923] 检查了Lck活化多肽诱导小鼠中pSTAT4表达的能力。

[0924] 使来源于ATCC的Lewis肺癌细胞在DMEM中生长至70%融合,将其分离并在PBS中洗涤。第0天,每只小鼠接受通过向尾静脉中静脉注射的 0.5×10^6 个LLC细胞。腹膜内施用治疗剂 (IK14800, 剂量为250 μ g在200 μ l水中),每周两次 (细胞转移后第1、4、8和11天)。细胞接种后十五天,对小鼠实施安乐死,并取出脾脏以制作单细胞悬浮液,如上述方案中详述 (斜体字)。然后通过流式细胞术评估分离的脾细胞悬浮液的CD4、CD8、NK1.1、CD28、CD215和pSTAT4表达。

[0925] 简言之,分离出经RSKAKNPLYRRRRRRRRR治疗的Lewis肺癌小鼠的脾细胞,并检查经治疗的Lewis肺癌小鼠的NK细胞上的pSTAT4表达。

[0926] 图32显示Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 增加Lewis肺癌小鼠的脾细胞中NK细胞上的pSTAT4表达。

[0927] 实例36:包含阴离子残基的多肽不活化Lck

[0928] 检查了包含阴离子残基的肽活化Lck的能力。图33显示多肽DDDDDDDD没有增加Lck的活性。

[0929] 实施例37:Lck活化多肽增加人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系中的IL-2分泌

[0930] 检查了Lck在Lck活化多肽改变IL-2分泌的能力中的作用。

[0931] 简言之,用在PBS (200 μ L) 中制成的抗CD3 (5 μ g/mL) 溶液包被12孔板并且将其在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。次日,抽吸抗CD3溶液并且将孔用培养基 (1mL, 10分钟) 轻轻洗涤两次。将Jurkat细胞 (野生型和Lck缺陷型) 以每孔100万个接种在抗CD3包被的12孔板中,进一步用抗CD28 (5mg/mL) 刺激,并在零时用IK14800 (2.5 μ M) 处理。将细胞孵育24小时,然后通过ELISA分析上清液中的IL-2。

[0932] 图34显示Lck活化多肽RSKAKNPLYRRRRRRRRR (IK14800) 相对于对照诱导Jurkat细胞中的IL-2分泌的能力依赖于Lck。该数据证明由Lck活化融合多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR引起的人T细胞系中是IL-2分泌依赖于Lck。

[0933] 实施例38:Lck活化多肽只有在受到刺激时才会增加人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系中的IL-2分泌。

[0934] 检查了在存在或不存在刺激的情况下Lck活化多肽诱导人T淋巴细胞 (Jurkat) 细胞系产生IL-2的能力。

[0935] 简言之,用在PBS (200 μ L) 中制成的抗CD3 (5 μ g/mL) 溶液包被12孔板并且将其在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。然后抽吸抗CD3溶液并且将孔用培养基 (1mL, 10分钟) 轻轻洗涤两次。将Jurkat细胞以每孔100万个接种,进一步用抗CD28 (5 μ g/mL) 刺激,然后在零时用RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) (2.5 μ M) 处理。将细胞孵育72小时,然后通过ELISA分析上清液中的IL-2。

[0936] 图35显示由用Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 处理引起的IL-2产量增加在不存在抗原刺激的情况下没有发生。

[0937] 实施例39:Lck活化多肽对Lewis肺癌小鼠(异种移植模型)中肿块的抑制

[0938] 检查了Lck活化多肽减小Lewis肺癌(LLC)小鼠中的肿块的能力。

[0939] 将Lewis肺癌细胞系培养至约70%融合,然后收集细胞,计数并以 5×10^6 个/mL重新悬浮在无菌HBSS中。向C57BL/6右肋腹皮下注射 1×10^6 个细胞(100 μ l)。肿瘤细胞植入后5天,将小鼠随机分配到治疗组中,使得两组之间平均肿瘤大小大致相等。从肿瘤细胞植入后第10天开始,每周两次(周一和周四)经由腹膜内(i.p)注射施用RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(200ug在200ul水中)或媒介物(水),直到媒介物处理组中的肿瘤达到平均10mm的直径。由对处理组不知情的科研人员,每周使用数字卡尺(星期一、星期三和星期五)对肿瘤进行三次测量。一旦媒介物组的平均肿瘤大小达到直径10mm,就通过颈脱位法处死小鼠并收集肿瘤和脾脏。

[0940] 将肿瘤置于含有胶原酶D(2mg/mL,Roche批号28960126)和DNA酶I(100 μ g/mL,Sigma批号SLBV1446)的2mL RPMI-1640中,并且进行机械消化,然后在37℃下,在振荡培养箱中以80rpm孵育30分钟。使消化的肿瘤样品通过70 μ m滤网,并用冰冷的RPMI-10洗涤两次。离心样品并进行红细胞裂解,然后洗涤并重新悬浮于RPMI-10中。通过台盼蓝拒染计数肿瘤细胞,并对免疫细胞标记CD45(AF700)染色。

[0941] 图36证明,当腹膜内施用时,RVKVKVVVVRRRRRRRRR(IK15800)相对于对照减小了肿块的平均面积。

[0942] 实施例40:与脂肪酸偶联的Lck活化多肽增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系的IL-2分泌。

[0943] 检查了与脂肪酸偶联的Lck活化多肽改变IL-2分泌的能力。

[0944] 简言之,将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积)并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白(5:5:1.25 μ g)刺激。然后用IK14804处理细胞,并然后将其在37℃下孵育48小时。然后分析上清液(100uL,n=3)的IL-2含量。

[0945] 图37显示暴露48小时后,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂(IK14804)相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导IL-2分泌。

[0946] 这些数据证明,本发明的与脂肪酸偶联的Lck活化多肽能够在人T细胞系中诱导IL-2分泌。

[0947] 实施例41:Lck活化多肽增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌。

[0948] 检查了与脂肪酸偶联的Lck活化多肽改变IL-12分泌的能力。

[0949] 简言之,将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积)并用生物素-CD3、CD28和抗生物素蛋白(5:5:1.25 μ g)刺激。然后用IK14800、IK15800、IK14804和IK15804处理细胞。然后在37℃下孵育细胞48小时。然后分析上清液(100uL,n=3)的IL-12含量。

[0950] 图38显示暴露48小时后,Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR(IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR(IK15800)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂(IK14804)和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂(IK15804)相对于对照在野生型Jurkat细胞中诱导IL-2分泌。

[0951] 实施例42:Lck活化多肽抑制细胞膜中的UVB脂质过氧化。

[0952] 检查了Lck活化多肽改变细胞膜中的脂质过氧化的能力。

[0953] 简言之,氧化剂可以改变脂质结构,从而产生脂质过氧化物,脂质过氧化物导致形

成可作为硫代巴比妥酸反应性物质 (TBARS) 测量的丙二醛。

[0954] 在对真皮成纤维细胞和/或角化细胞进行照射或虚假照射后,添加试验肽并孵育 90 分钟,然后收集上清液 (900 μ L)。添加 90 μ L 丁羟基甲苯 (2% w/w 在乙醇中),并将样品保持冷冻 (-20 $^{\circ}$ C),直到进行 TBARS 测定。将皮氏培养皿用 1mL 的 HBSS 洗涤两次,将细胞刮入 600 μ L 水中,并向该溶液中添加 60 μ L 的 0.5% Triton X100 水溶液,以通过 Lowry 方法进行蛋白质测定 (Lowry OH 等人, J. Biol. Chem., 1951, 193:265-275)。如所述的那样 (Morlière P 等人, Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1084:261-268) 通过荧光法测定 TBARS。简言之,为了解冻,将样品在酸性条件下于硫代巴比妥酸的存在下加热,用 1-丁醇萃取 TBARS 并通过荧光法定量 (λ 激发 = 515nm 且 λ 发射 = 550nm)。在测定条件下定量生成丙二醛-硫代巴比妥酸加合物的四乙氧基丙烷用于校准。将 TBARS 值 (以丙二醛 (MDA) 当量表示) 针对每个皮氏培养皿的细胞蛋白作归一化。每项 TBARS 测定均一式三份进行 (例如,每个数据点使用三个皮氏培养皿)。

[0955] 图 39 显示 RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800) 以剂量依赖性方式降低 % TRS。

[0956] 实施例 43: RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 增加 Lck 在 Y394 处的磷酸化

[0957] 如以上所讨论的, Lck 的 Tyr394 磷酸化导致 Lck 的构象打开,从而活化 Lck 激酶。

[0958] 如下执行免疫印迹研究:

[0959] 细胞类型: Jurkat 野生型

[0960] 细胞数量: 5×10^5 个/1ml

[0961] 培养基: RPMI-1640 MEDIUM (Sigma, R8758)、1X 青霉素-链霉素 (Sigma, 100X, P0781)、10% FBS

[0962] 肽: IK14800 (RSKAKNPLY-RRRRRRRRR)

[0963] 肽浓度: 1 μ M

[0964] 肽暴露时间: 2 小时

[0965] 细胞裂解液:

[0966] (100 μ L/孔/30 分钟于冰上)

[0967] RIPA 缓冲液 (Sigma, R0278): 97 μ L

[0968] 蛋白酶抑制剂混合液 (P8340): 1.5 μ L

[0969] 磷酸酶抑制剂混合液 2 (Sigma, P5726): 1.5 μ L

[0970] 蛋白质测定: PierceTM BCA 蛋白质测定试剂盒 (#23225)

[0971] 凝胶: NuPAGE[®] Novex[®] 4-12% Bis-Tris 凝胶 (Life Technologies, NP0335BOX), 上样 20 μ g 蛋白质

[0972] 运行缓冲液 (1x): NuPAGE[®] MOPS SDS 运行缓冲液 (Life Technologies, NP0001)

[0973] 转移印迹: iBlot[®] Transfer Stack、硝酸纤维素、Novex、mini (Life Technologies, IB3010-32)

[0974] 封闭溶液: TBS Blotto B (Santa Cruz, SCZSC-2335)

[0975] 一抗: p-Lck (Tyr 394)、兔多克隆抗体 (Santa Cruz, sc-101728), 1/200 稀释, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。抗 Lck 抗体 [Y123]、兔单克隆抗体 (Abcam, ab32149), 1/1000 稀释, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜

[0976] 二抗: 山羊抗兔 IgG-HRP (sc-2004), 1/5000 稀释, 1 小时

[0977] ECL: Amersham ECL Prime 蛋白质印迹检测试剂

[0978] 图 40 显示, RSKAKNPLY-RRRRRRRRR 相对于无肽对照增加通过抗 pY394 抗体检测到的

Lck在Y394处的磷酸化,而总的Lck水平保持不变。

[0979] 该数据证明选择性活化Lck的Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR能增强Lck的自体磷酸化。

[0980] 实施例44:多肽RSKAKNPLYR和RSKAKNPLY增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-2分泌,并且rskaknply增加(而RSKAKNPLYR未能增加)人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌。

[0981] 检查了多肽RSKAKNPLYR(“14000”)、RSKAKNPLY(“IK94000”)和rskaknply(“IKD94000”)改变IL-2和IL-12分泌的能力。

[0982] 简言之,通过将野生型Jurkat细胞(永生化人T淋巴细胞系)在抗CD28抗体和抗生物素蛋白(avidin)的存在下暴露于生物素化抗CD3抗体中来对该野生型Jurkat细胞进行刺激。将细胞按每孔100万个细胞接种(12孔板,2mL体积)并用生物素-抗CD3、抗CD28和抗生物素蛋白(5:5:1.25 μ g)刺激。用试验肽处理细胞,然后将其在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。然后分析上清液(100 μ L, n=3)的IL-2和IL-12含量。在培养期间(48小时),将细胞暴露于试验多肽RSKAKNPLYR-(2Adod)₄-NH₂中。在48小时结束时,如上所述地使用标准的商购ELISA试剂盒测定细胞上清液中的IL-2和IL-12。

[0983] 图41A显示多肽RSKAKNPLYR和RSKAKNPLY增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-2分泌。

[0984] 图41B显示rskaknply增加人T淋巴细胞(Jurkat)细胞系中的IL-12分泌,而RSKAKNPLYR则未能如此。

[0985] 尽管上面已经描述了本发明的许多实施方案,但是应当理解,在不脱离本发明的范围的情况下,可以对其进行各种修改和改变。因此,上述实施方案仅是说明性的,而不应视为是限制性的。

[0986] 实施例44:Lck活化多肽增加PBMC共培养物中经钙黄绿素-AM染色的K562细胞的特异性细胞毒性的百分比。

[0987] 检查了Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK14804)和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK15804)诱导细胞毒性反应的能力。

[0988] 简言之,将PBMC孵育48小时,然后与用或未用人重组IFN- α 2A (5ng/mL)刺激的经钙黄绿素AM染色的K562细胞一起共培养4小时。使用GloMax[®]Discover评估上清液的钙黄绿素绿色荧光强度,并计算特异性细胞毒性百分比。所示数据表示特异性细胞毒性平均百分比 $\pm$ SEM, n=4。与媒介物对照相比,通过配对t检验分析数据, *p<0.05。

[0989] 还将PBMC用或未用Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)、RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK14804)和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK15804) (0.08-1.25 μ M)预处理48小时,然后与经钙黄绿素AM染色的K562细胞一起以5:1的比率共培养并且再孵育4小时。使用GloMax[®]Discover评估上清液的钙黄绿素绿色荧光强度,并计算特异性细胞毒性百分比。所示数据表示特异性细胞毒性平均百分比 $\pm$ SEM, n=4。通过重复测量双因素方差分析和Holm-Sidak事后检验分析数据,将试验肽与媒介物对照进行比较, *p<0.05, *p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001。

[0990] Lck活化多肽RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK14800)、RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)、

RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK14804) 和RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-(2Adod)₄-NH₂ (IK15804) 增加了PBMK共培养物中经钙黄绿素AM染色的K562细胞的特异性细胞毒性百分比,达到比用IFN-α2A所观察到的水平更高的水平(数据未示出)。

肽	高于对照的Lck活性 (1 μ M)
RRRR (IK00400)	0%
RRRRR (IK00500)	0%
RRRRRR (IK00600)	0%
RRRRRRRR (IK00800)	126%
rrrrrrrrr (IKD00800)	80%
RRRRRRRRRR (IK00900)	325%
RRRRRRRRRRR (IK00100)	389%
RRRRRRRRRRRR (IK01200)	401%
RRRRRRRRRRRRRR (IK01400)	351%
rrrrrrrrrrrrrrrr (IKD01400)	228%
RRRRRRRRRRRRRRRR-OH (IK014OH)	156%
RRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR (IK00200)	279%
KKKKKKKKKK (10Lys)	161%
HHHHHHHHHH (10His)	0%
OrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrnOrn (10 Orn)	13%
HHH-RRRRRRRRRR-HHH (IK03930)	386%
HHHHH-RRRRRRRRRR-HHHHH (IK05950)	286%
KKKKKKKKK-HHHHHHHHHHH (IK00K10)	70%
RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK00810)	259%
RRRRRRRRRR-HHHHHHHHHHH (IK00910)	348%
DDDDDDDDD-NH ₂ (IKD9)	0%
DSEAENPLY-DDDDDDDDD-NH ₂ (IKDE800)	0%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-NH ₂ (IK14800)	377%
RSKAKNPLYR-RRRRRRRRR-(2Adod) ₄ -NH ₂ (IK14804)	468%
RVKVKVVVVR-RRRRRRRRR-(2Adod) ₄ -NH ₂ (IK15804)	335%

图1

肽	高于对照的Lck活性(1 μ M)							
	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%

图2

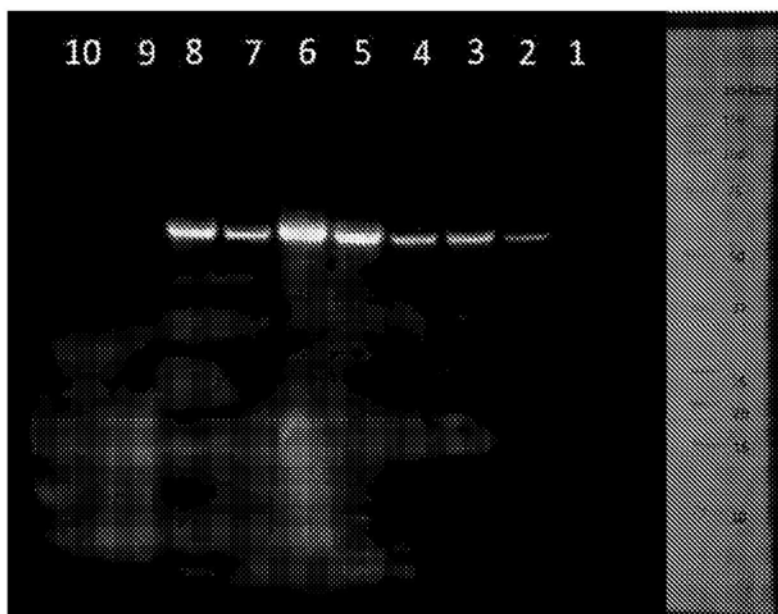


图3A

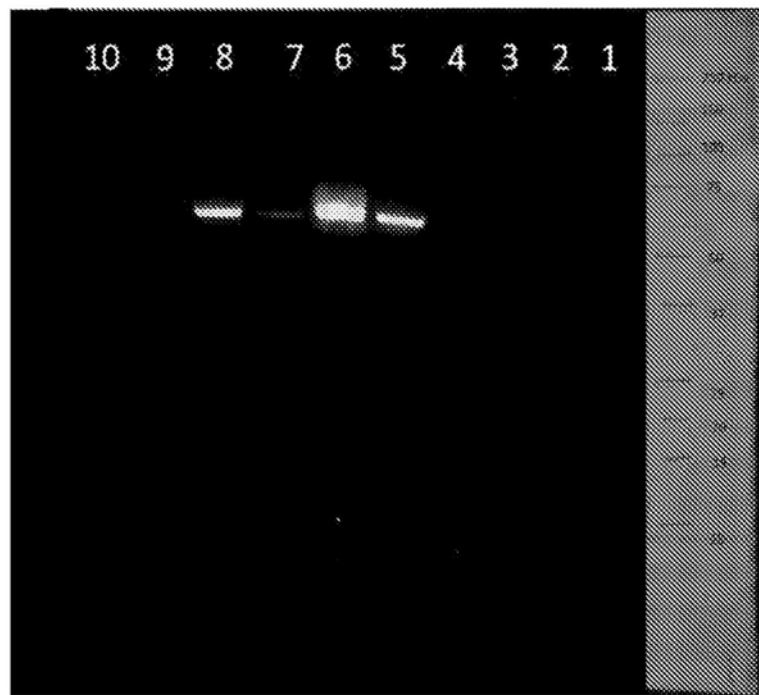


图3B

肽	高于对照的Lck 活性 (1 μ M)
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 r (ID94600)	60%
C-RSKAKNPLY-RRRRRR-C (Cyclised) (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 r (IKD14800)	490%
r 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-YLPNKA KSR (IK9R94Y)	630%
RSKAKNPLY-KKKKKKKKK (IK94K90)	49%
RSKAKNPLY-RHHHHHHHHHH (IK14010)	30%

图4

肽	高于对照的 Lck活性 (1 μ M)
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK14510)	524%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK14810)	899%
Branched < RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (Br IK14810)	596%
RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHHHH (IK14820)	556%
HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR (IK11480)	883%
HHHHH-RRRRRRRRR-HHHHH-RSKAKNPLYR (IK59514)	441%
RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH-RSKAKNPLYR (IK81140)	567%
HHHHH-RSKAKNPLY-RRRRRRRRR-HHHHH (IK51455)	685%
RSKAKNPLY-RKRKRKRKRK (IK94RK0)	456%
RVKVKVVVV (IK95000)	518%
RVKVKVVVV-RRRRR (IK15400)	382%
RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15700)	512%
RVKVKVVVV-RRRRRRRRR (IK15800)	479%
RRRRRRRRR-RVKVKVVVV-R (IK80150)	520%
RVKVKVVVV-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)	778%
RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRH-HH (IK52820)	408%
KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH (IK50810)	778%
RVKVKVVVV-RHRHRHRHRHRHRHRHRH (IK52820)	408%
KEKLKNPLFK-RRRRRRRRR-HHHHHHHHHH IKB2810	379%

图5

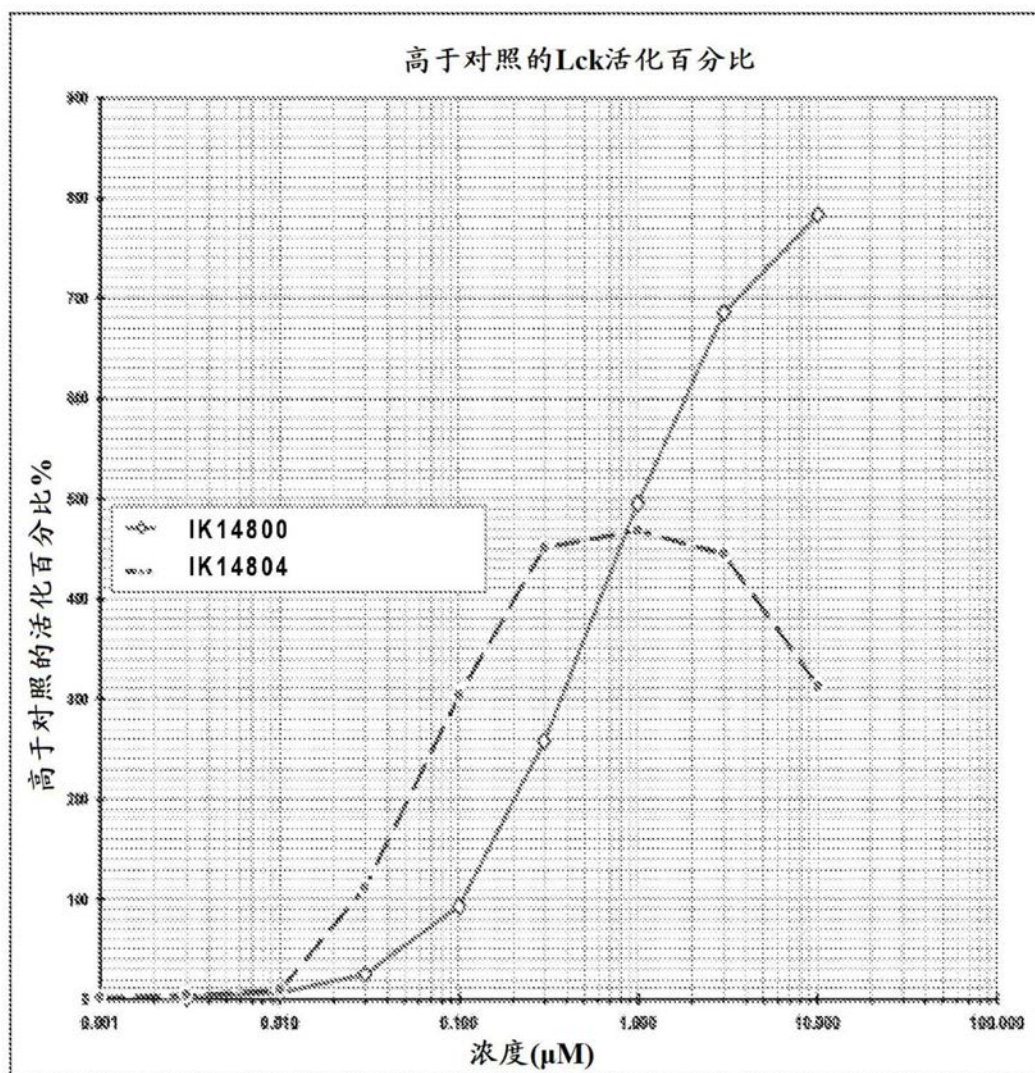


图6

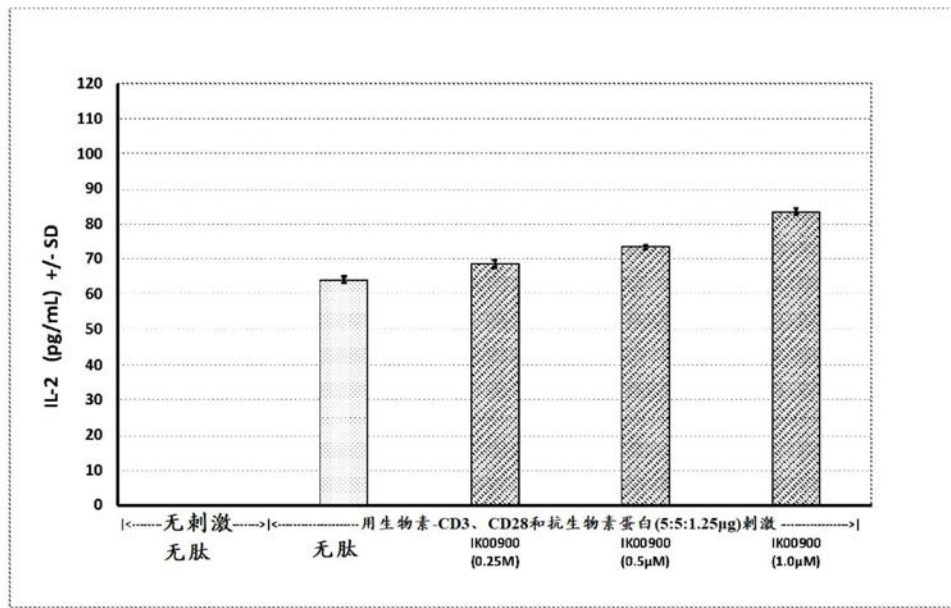


图7A

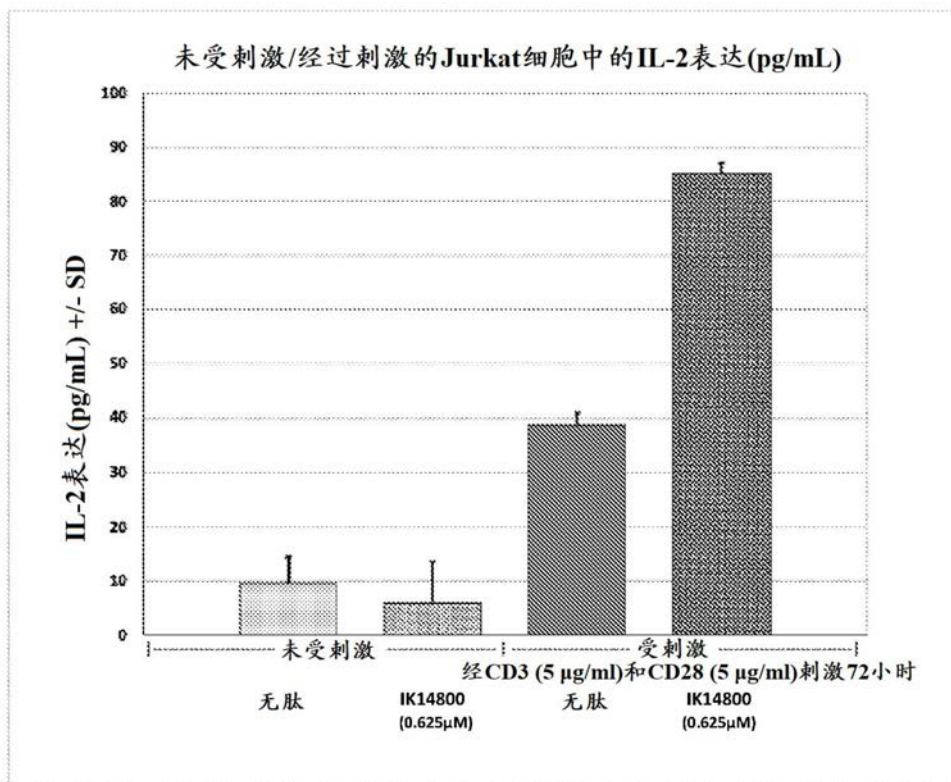


图7B

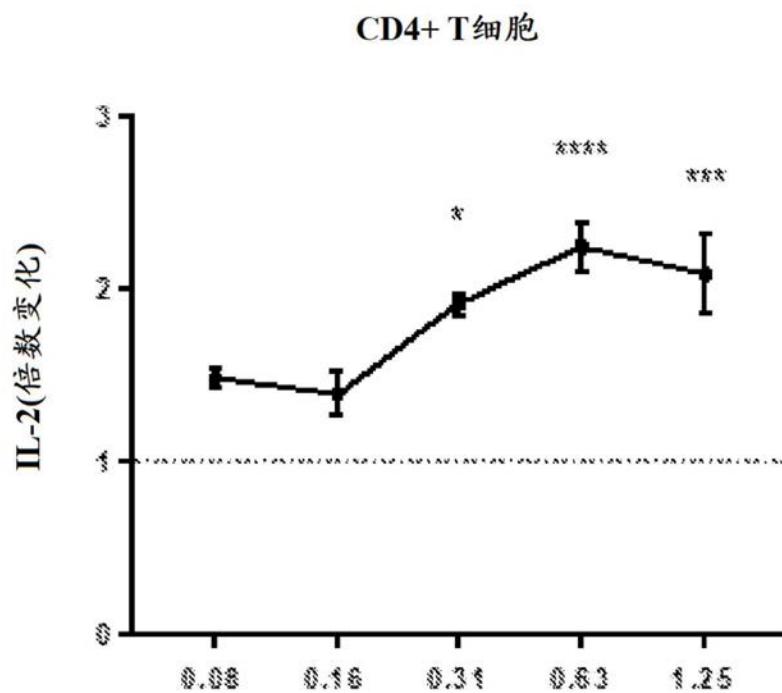


图8A

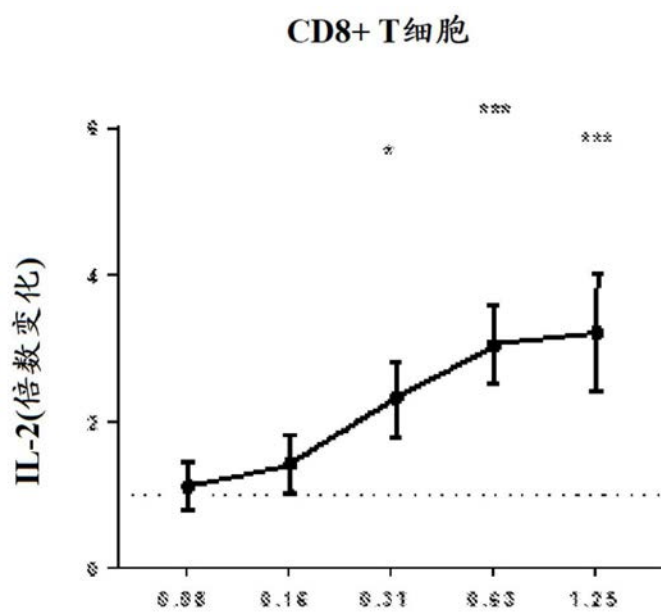


图8B

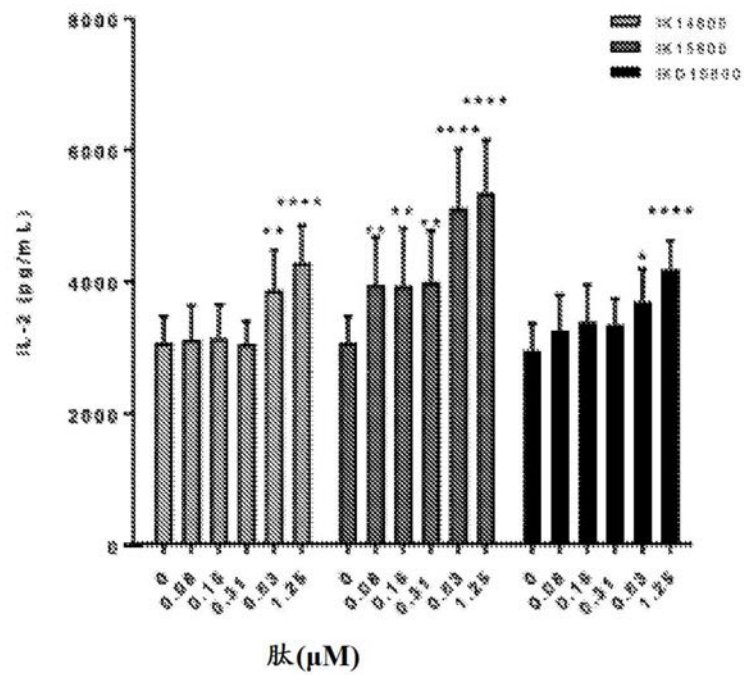


图9A

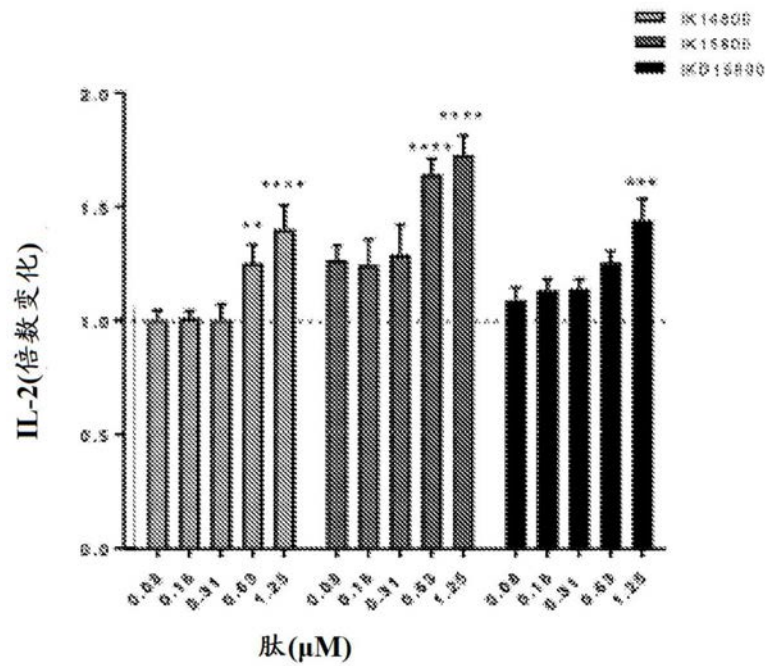


图9B

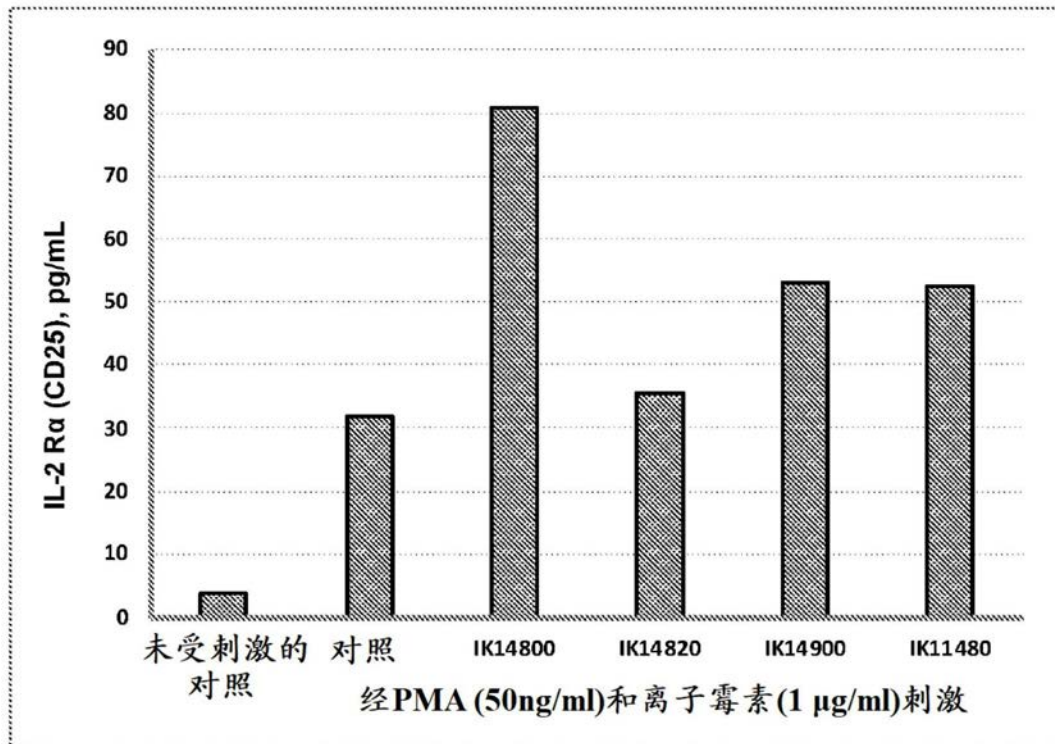


图10

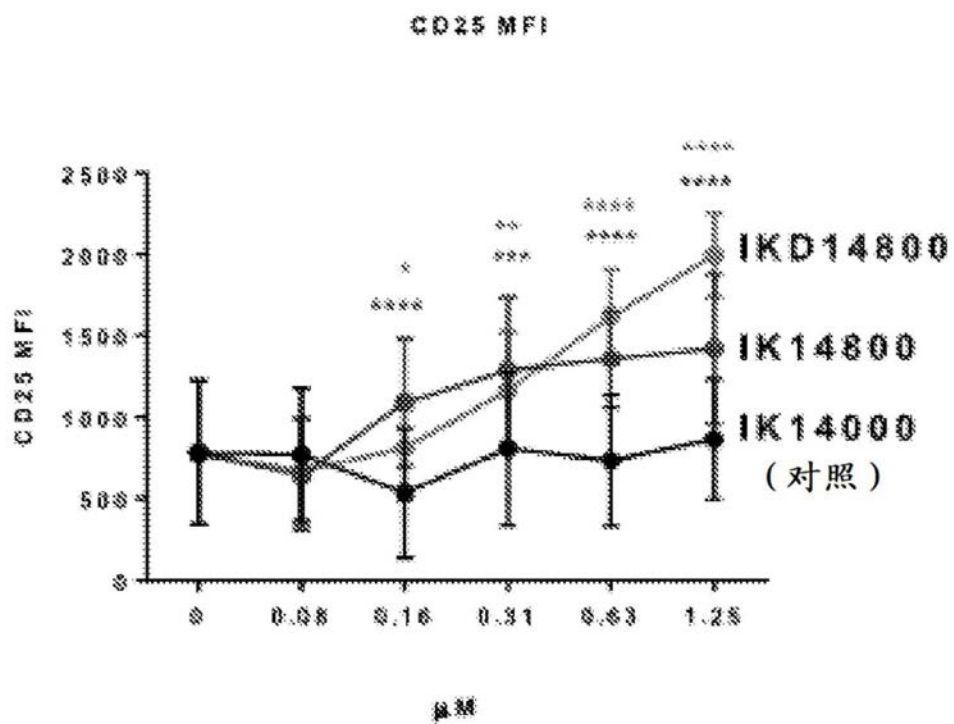


图11A

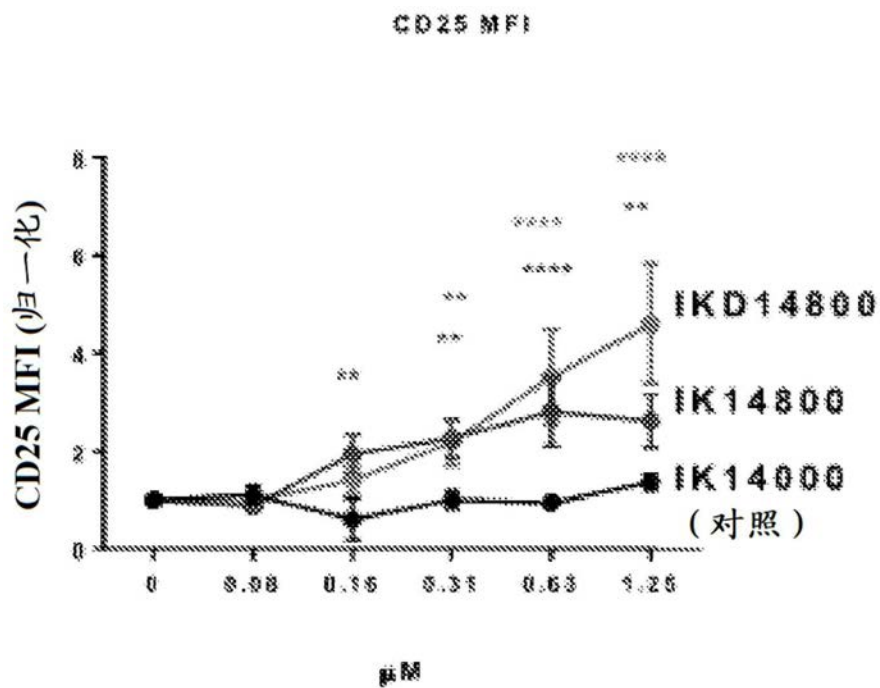


图11B

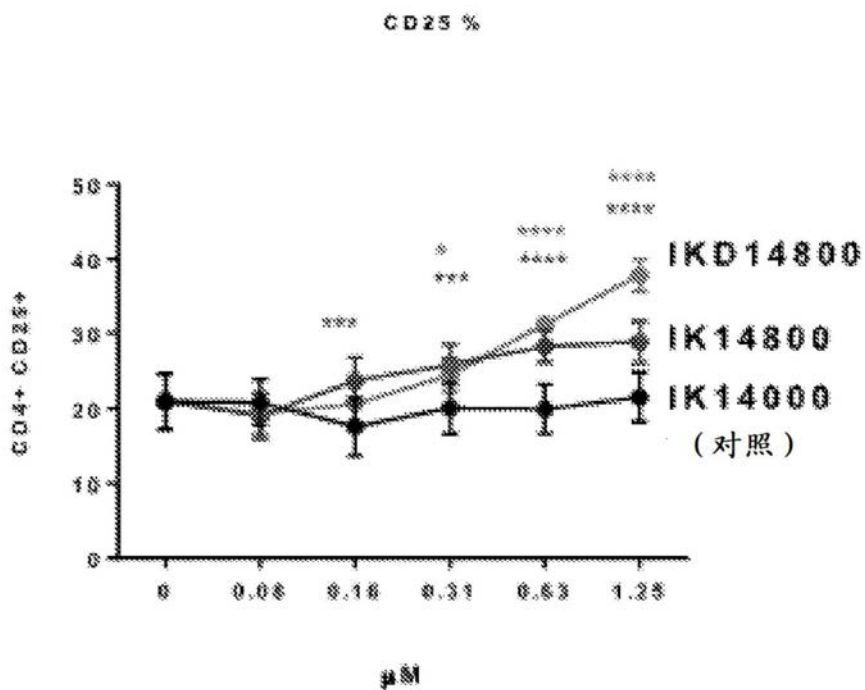


图11C

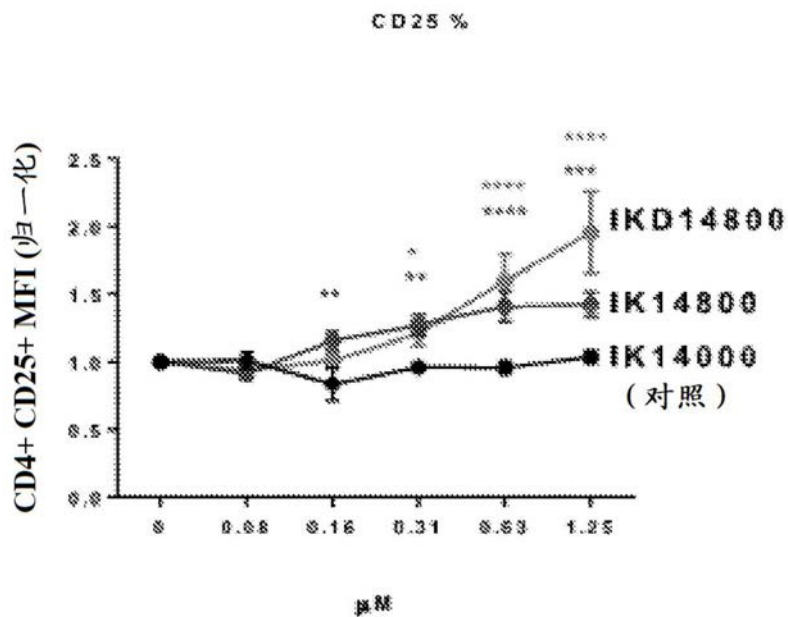


图11D

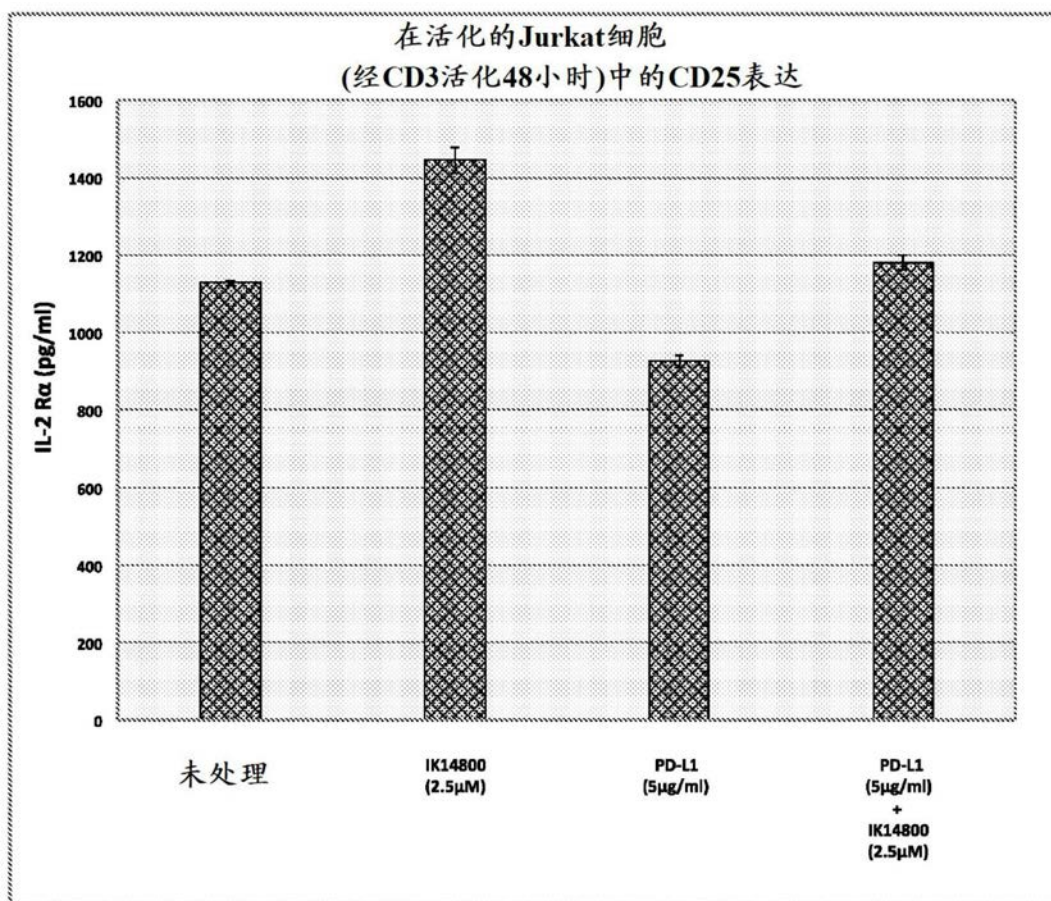


图12

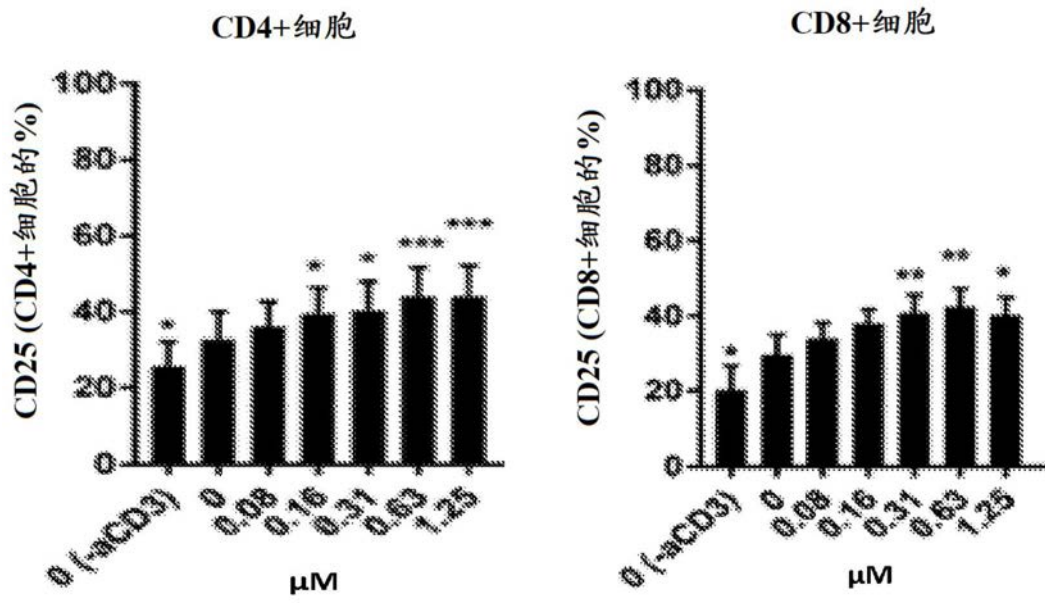


图13

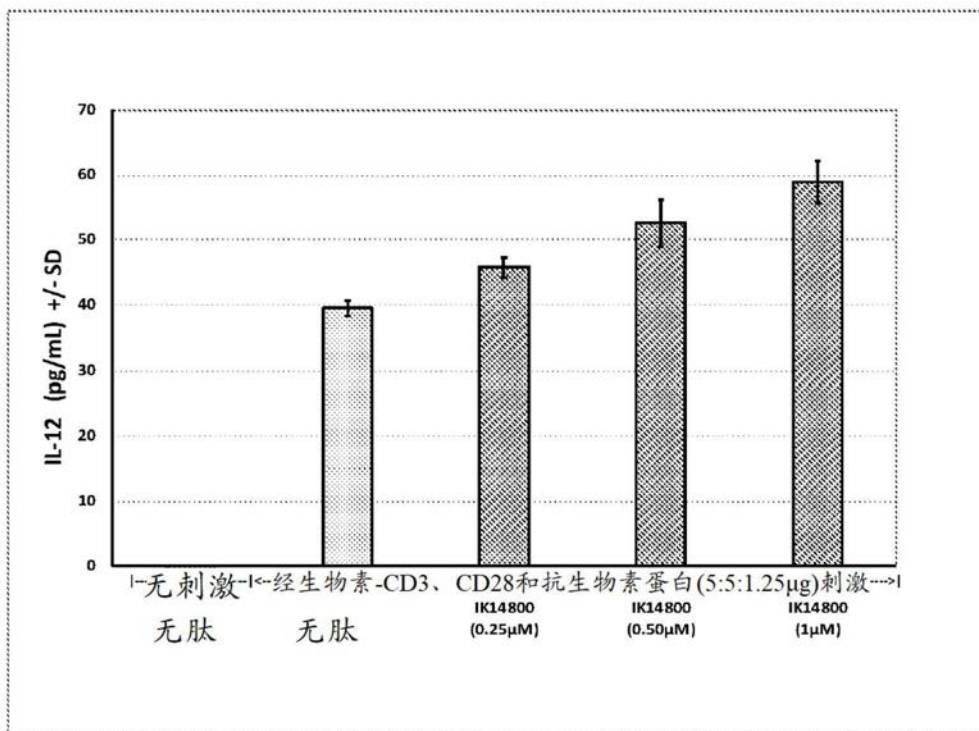


图14A

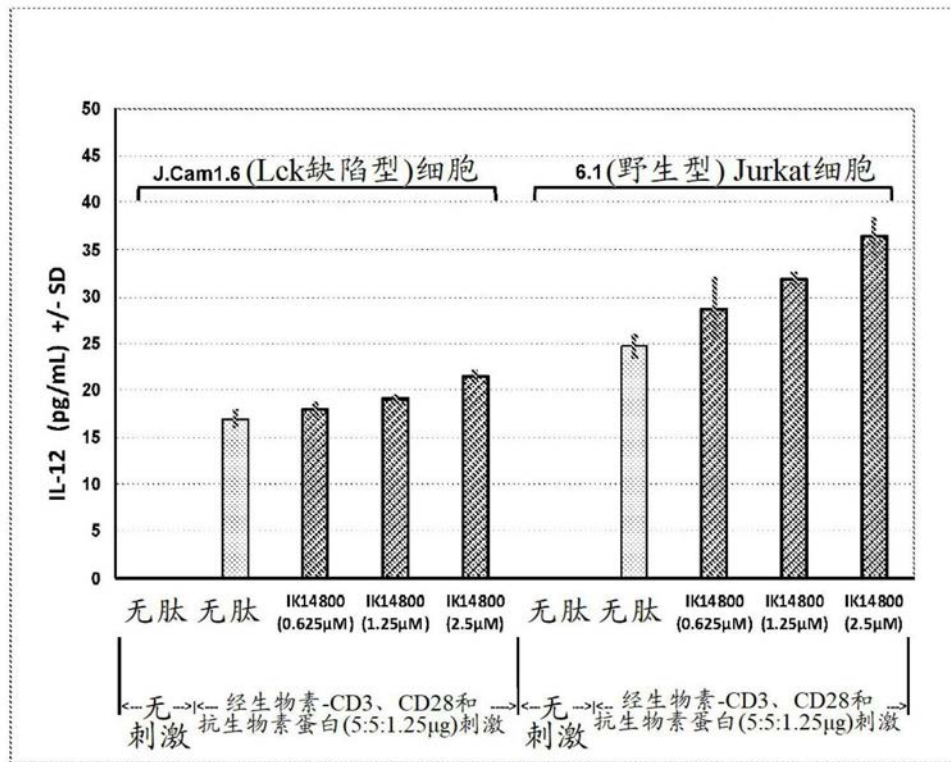


图14B

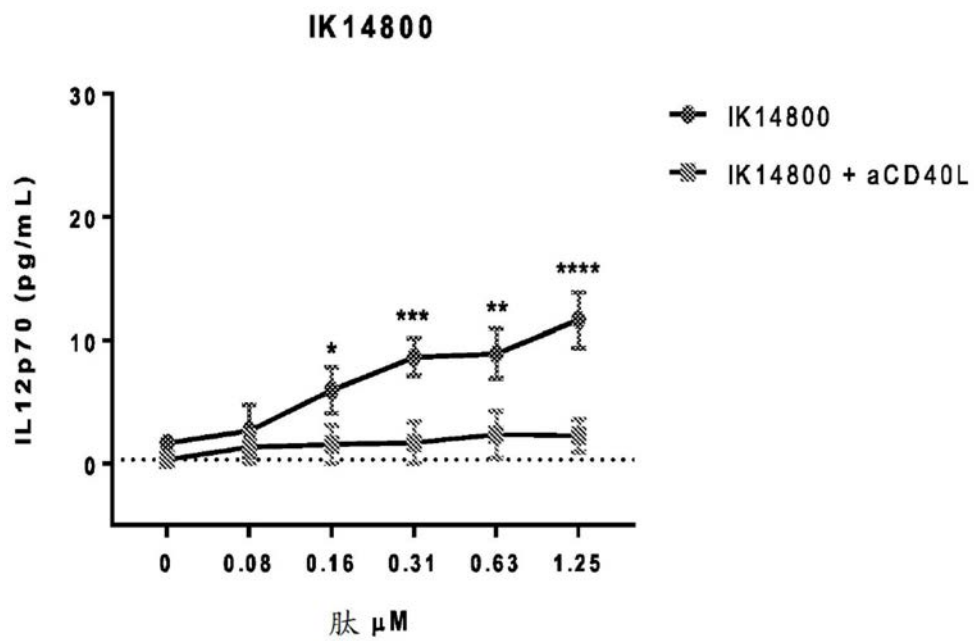


图15A

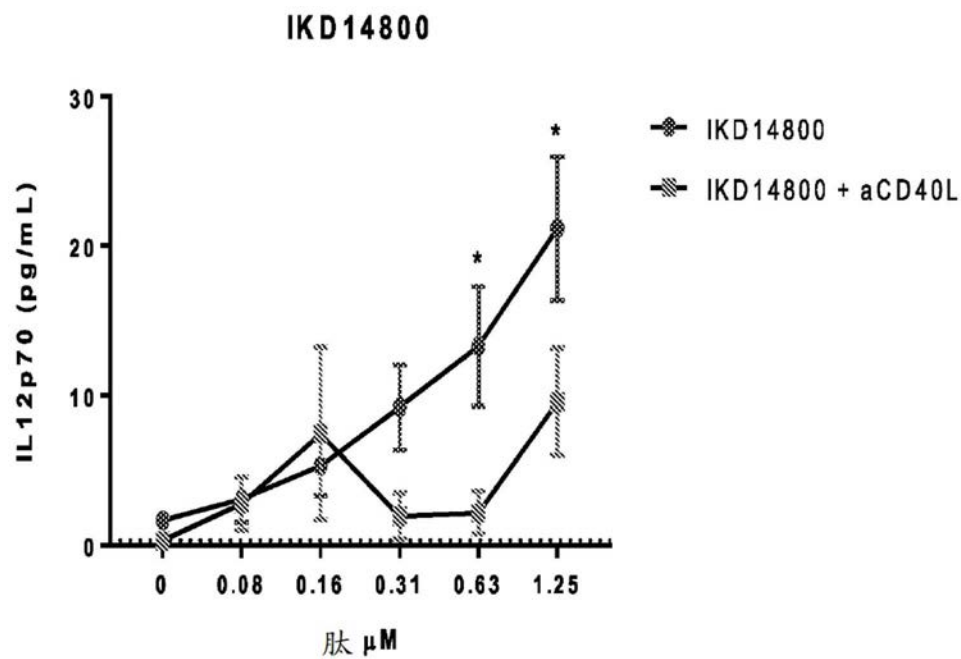


图15B

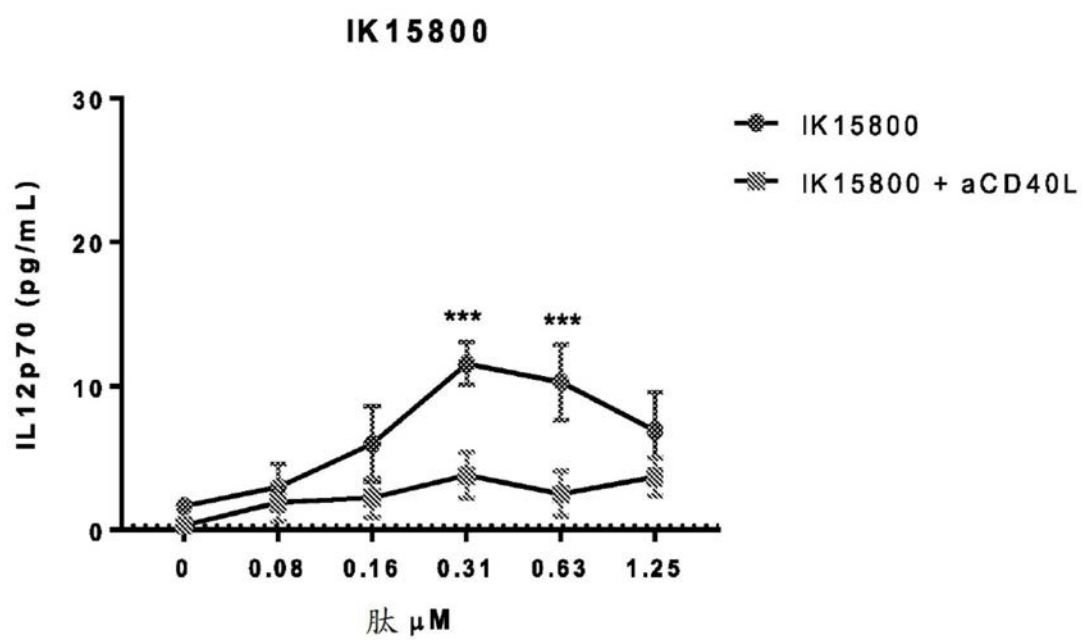


图15C

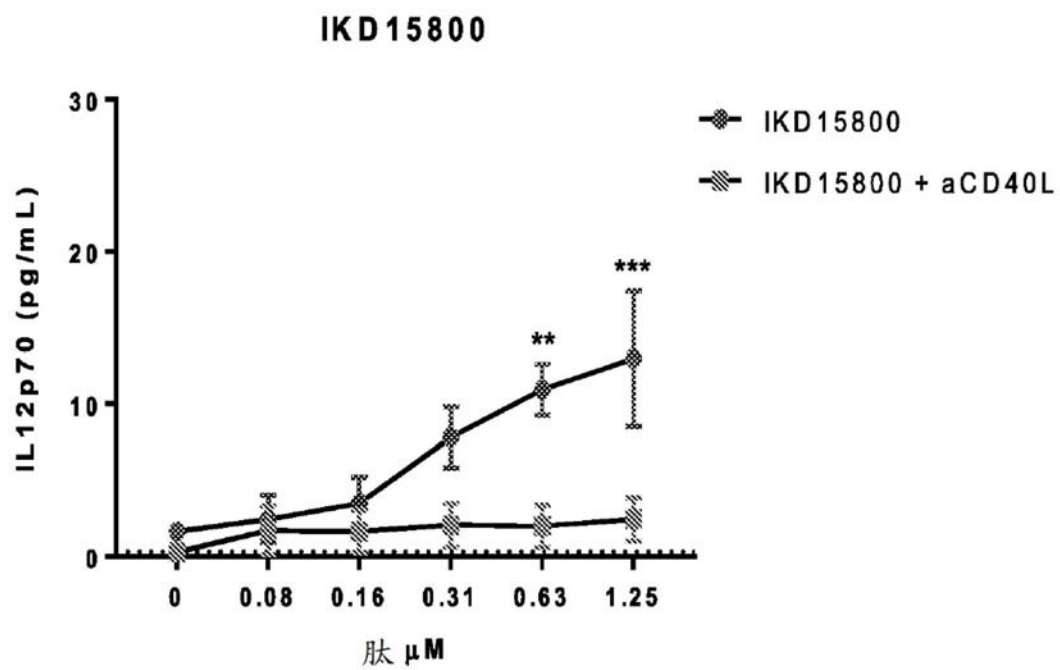


图15D

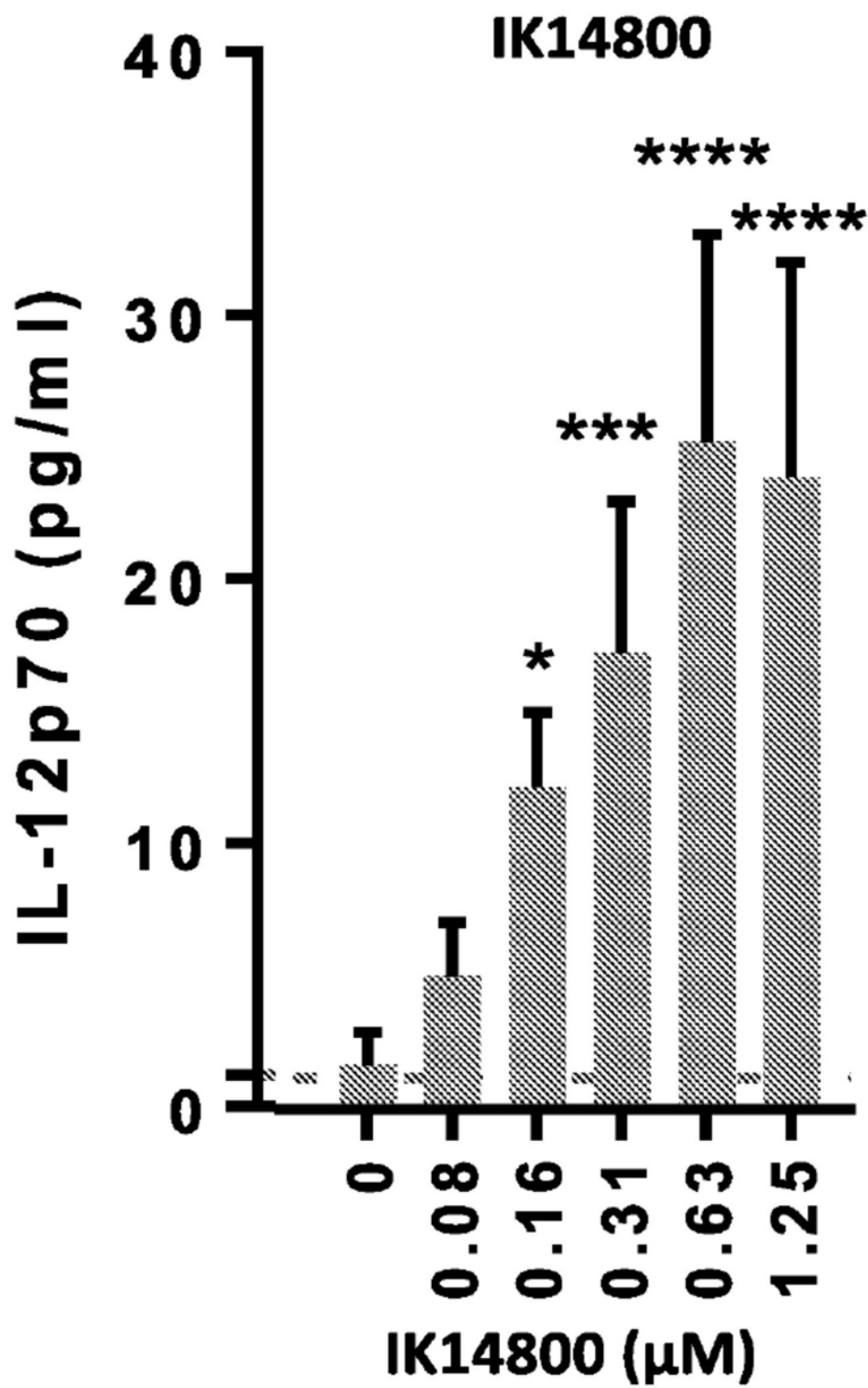


图16

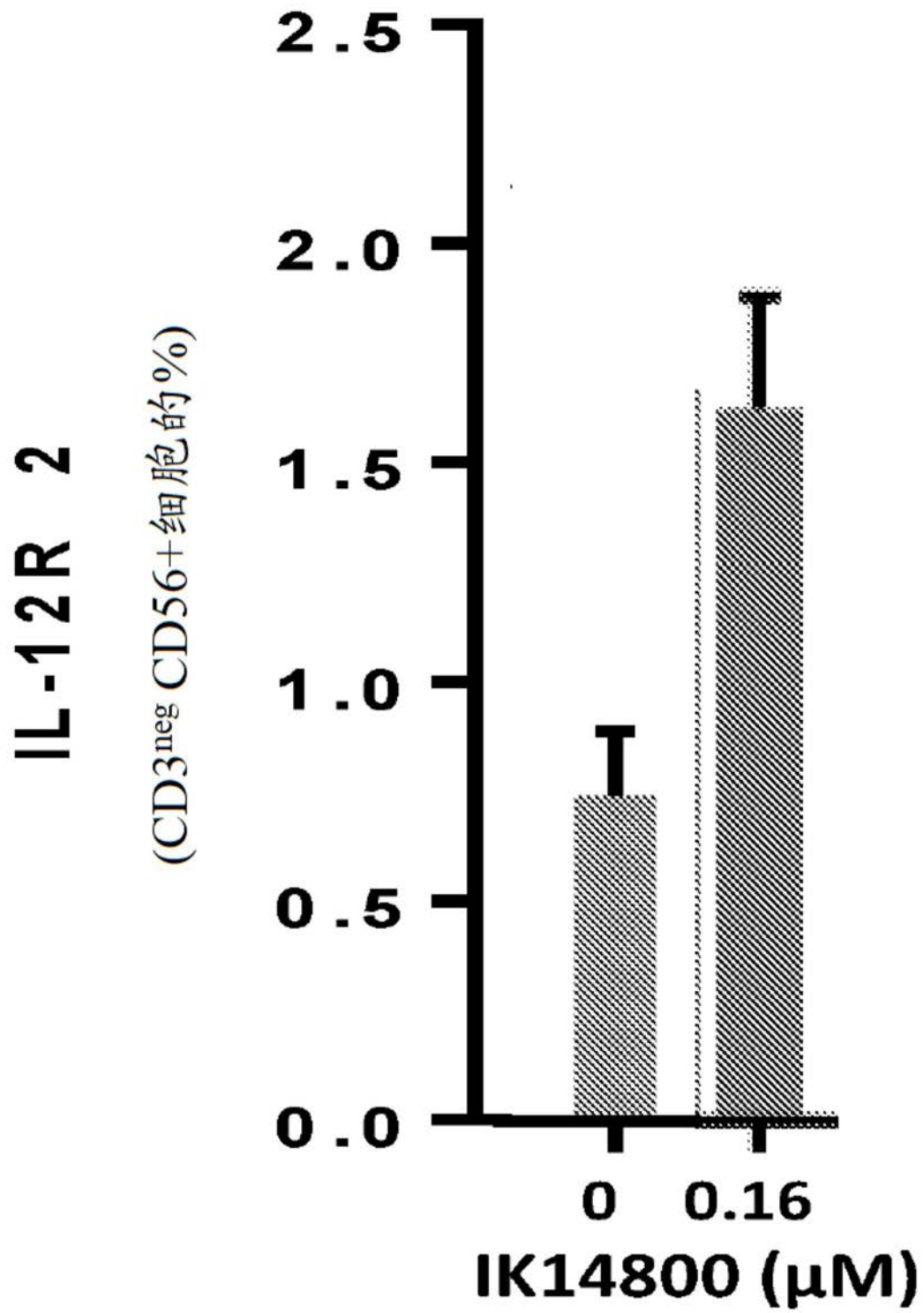


图17

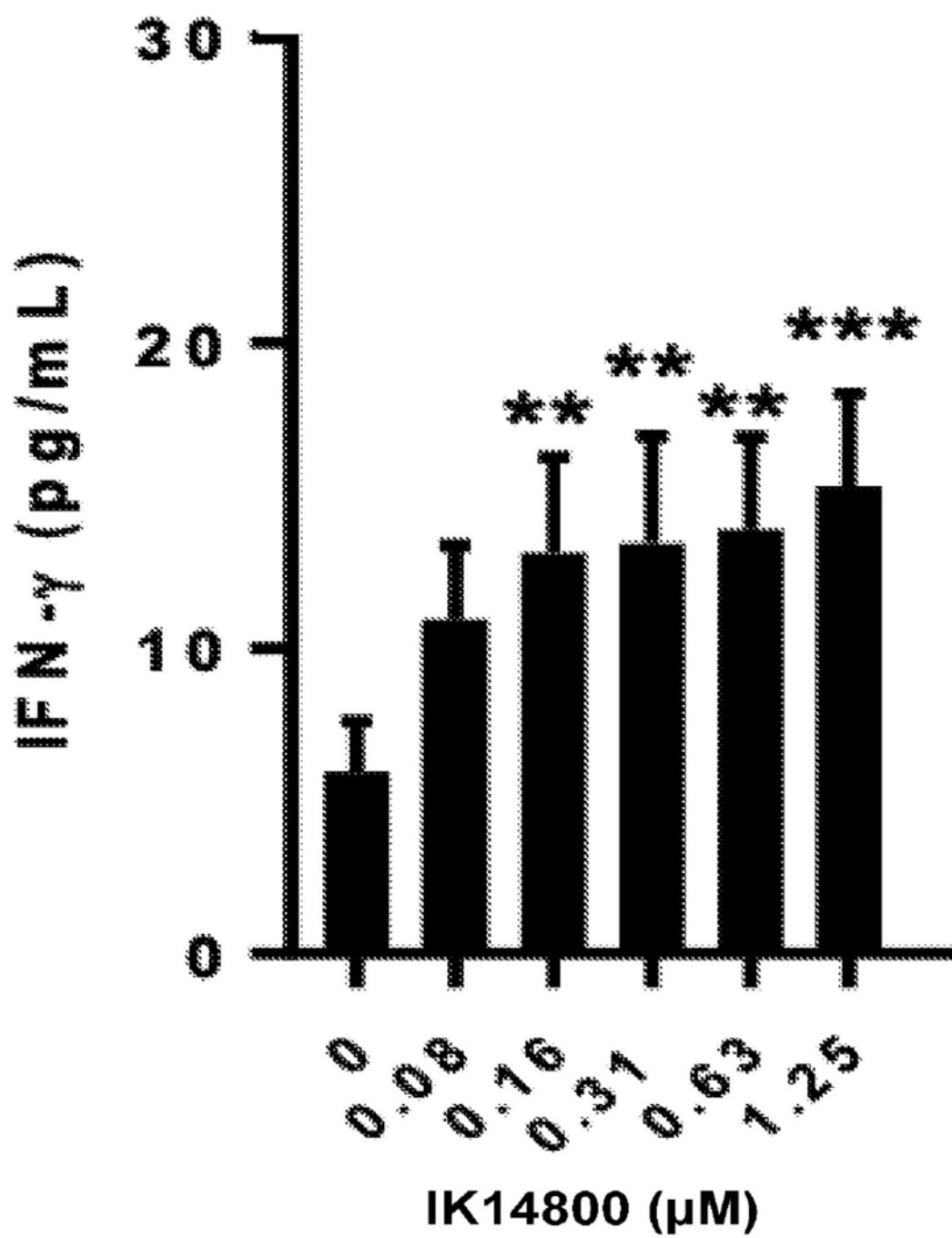


图18

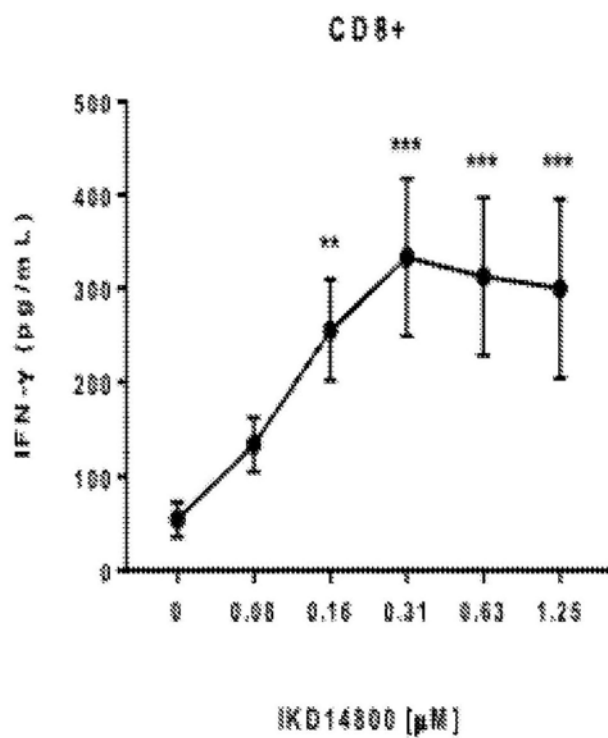


图19A

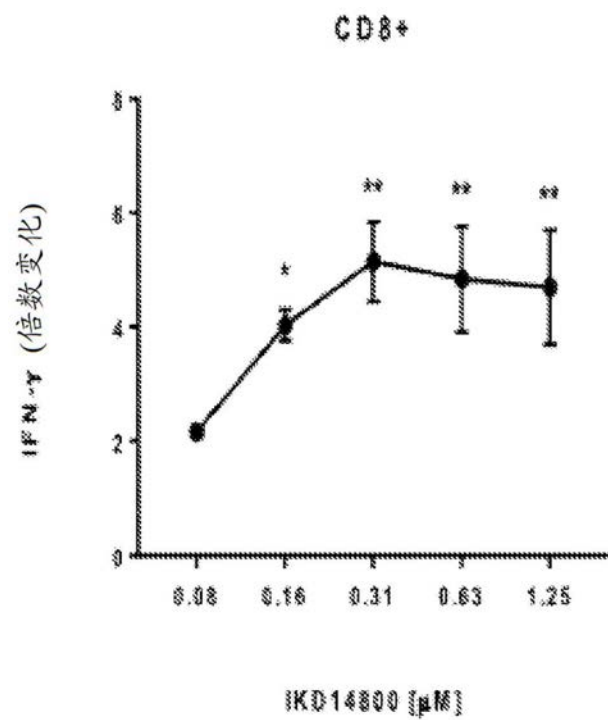


图19B

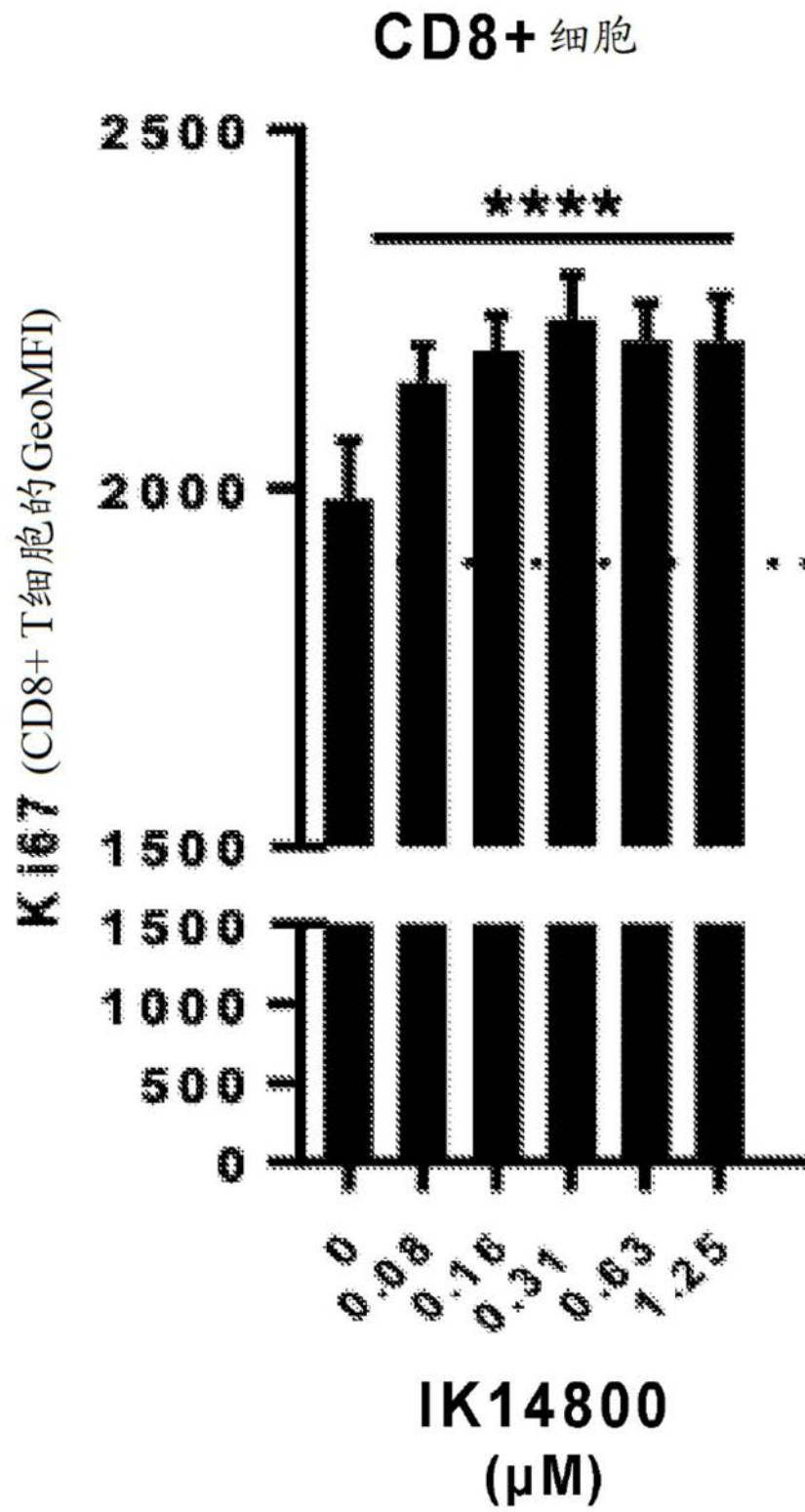


图20

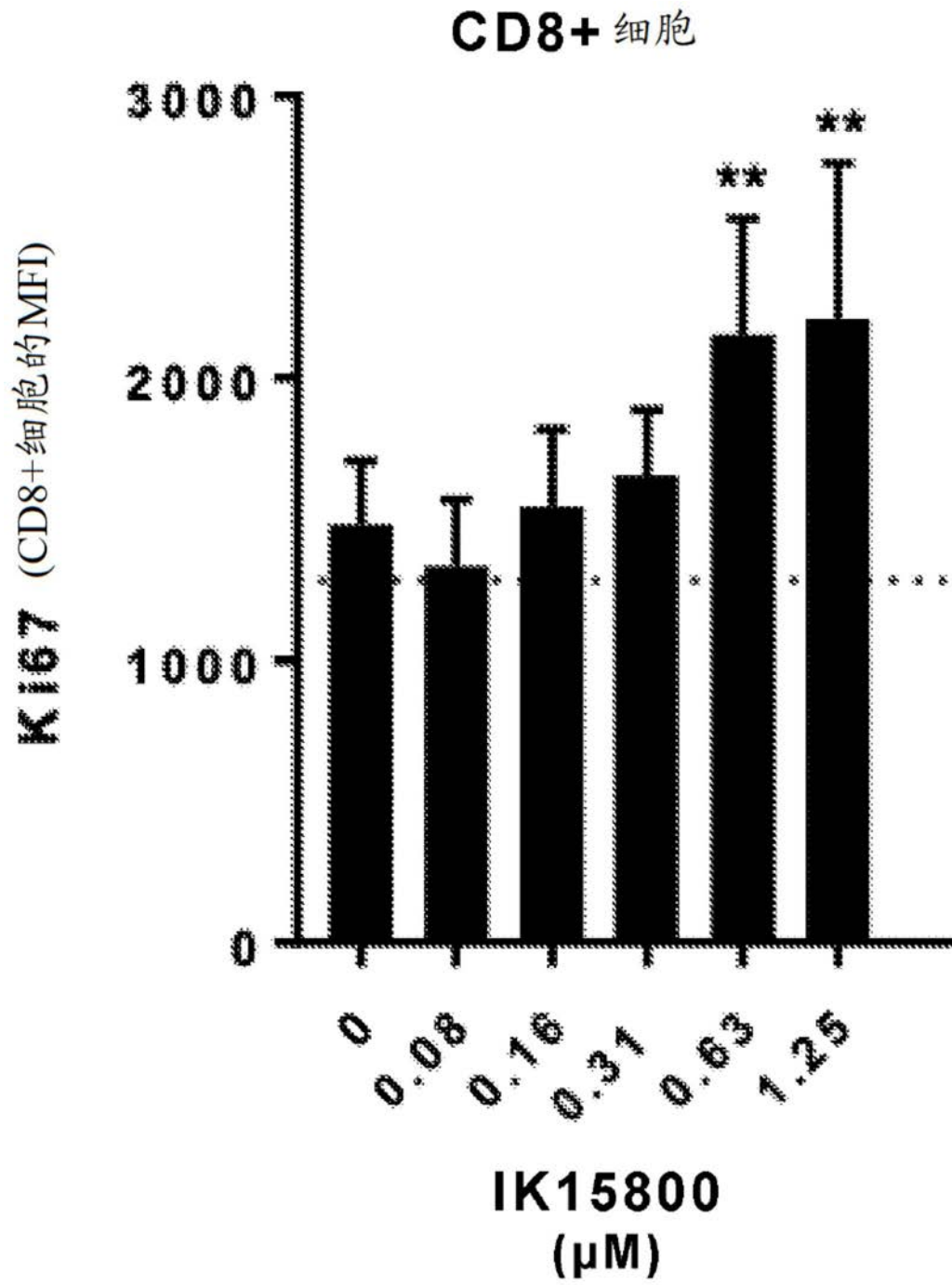


图21

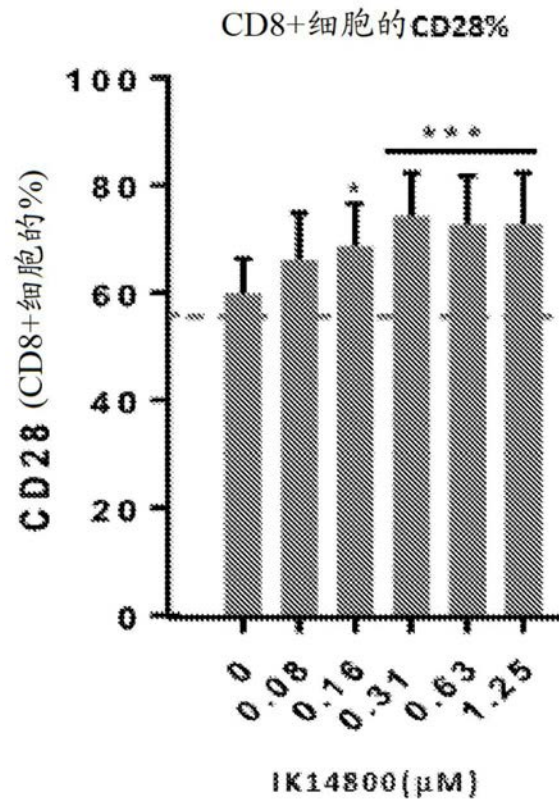


图22A

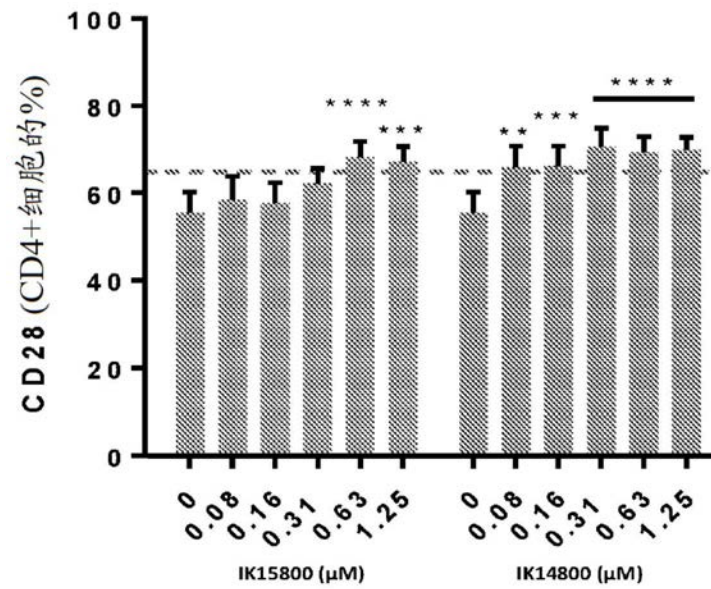


图22B

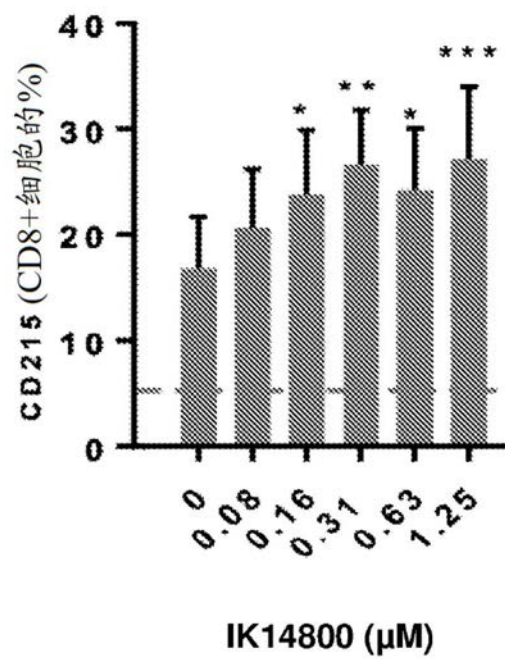


图23A

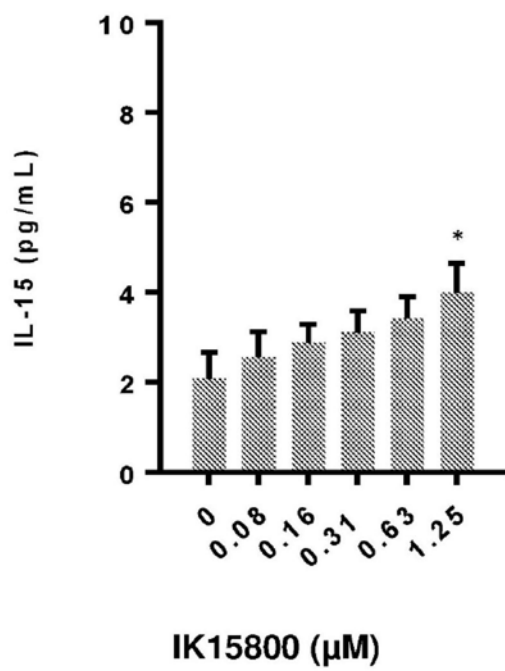


图23B

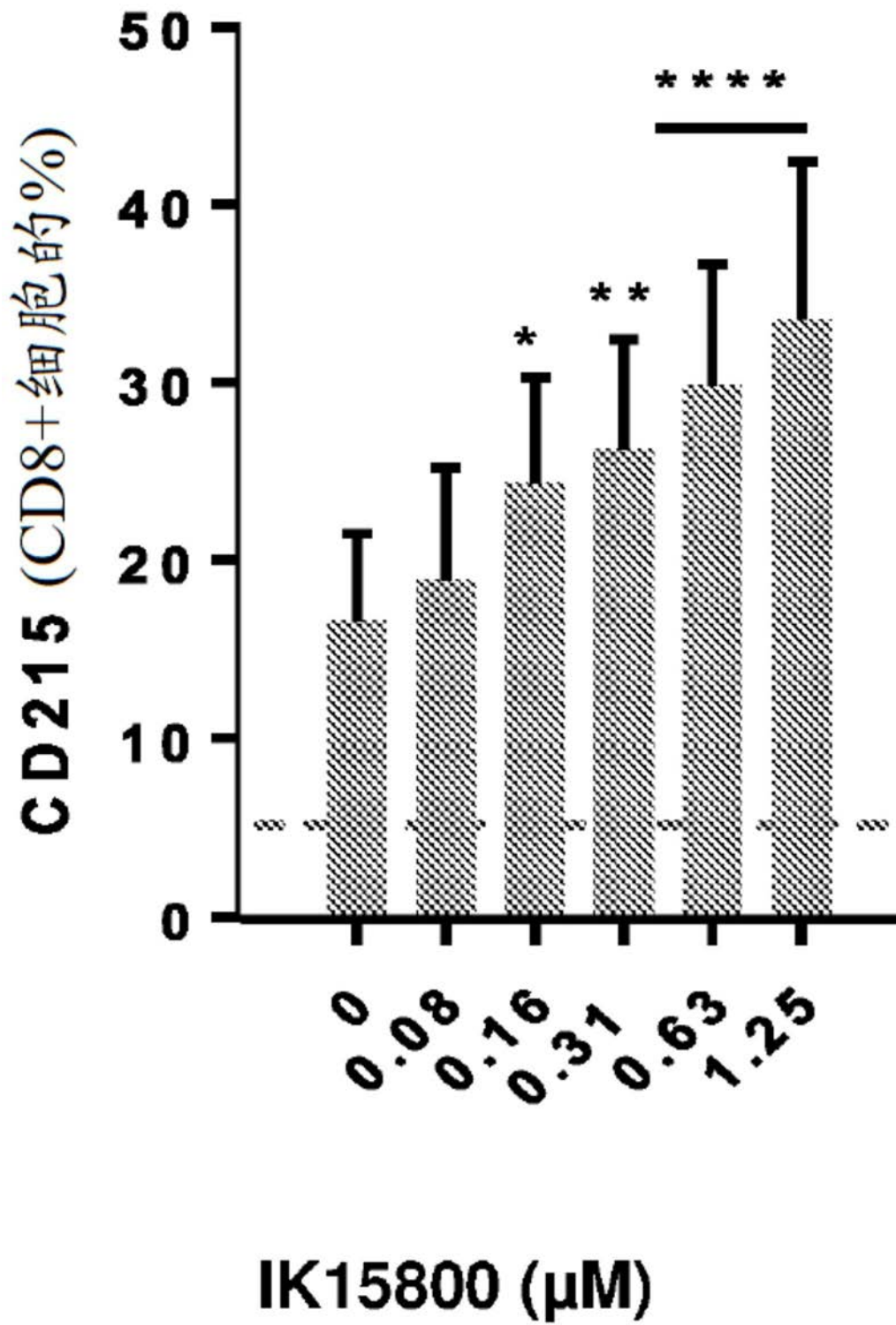


图23C

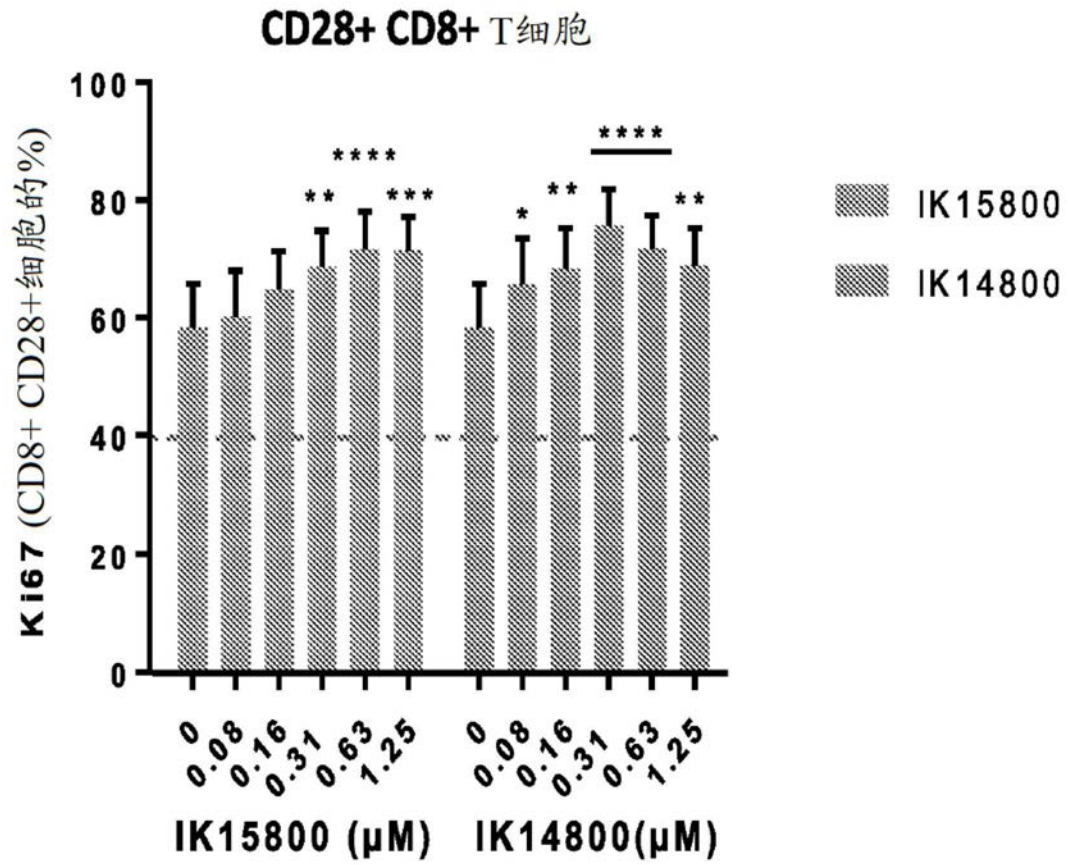


图24

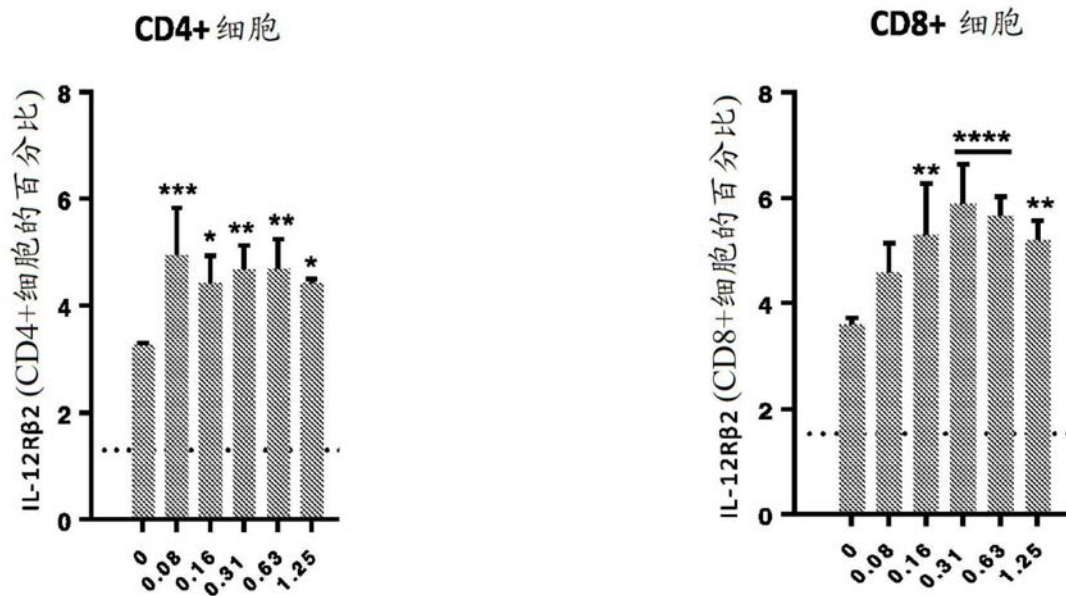


图25

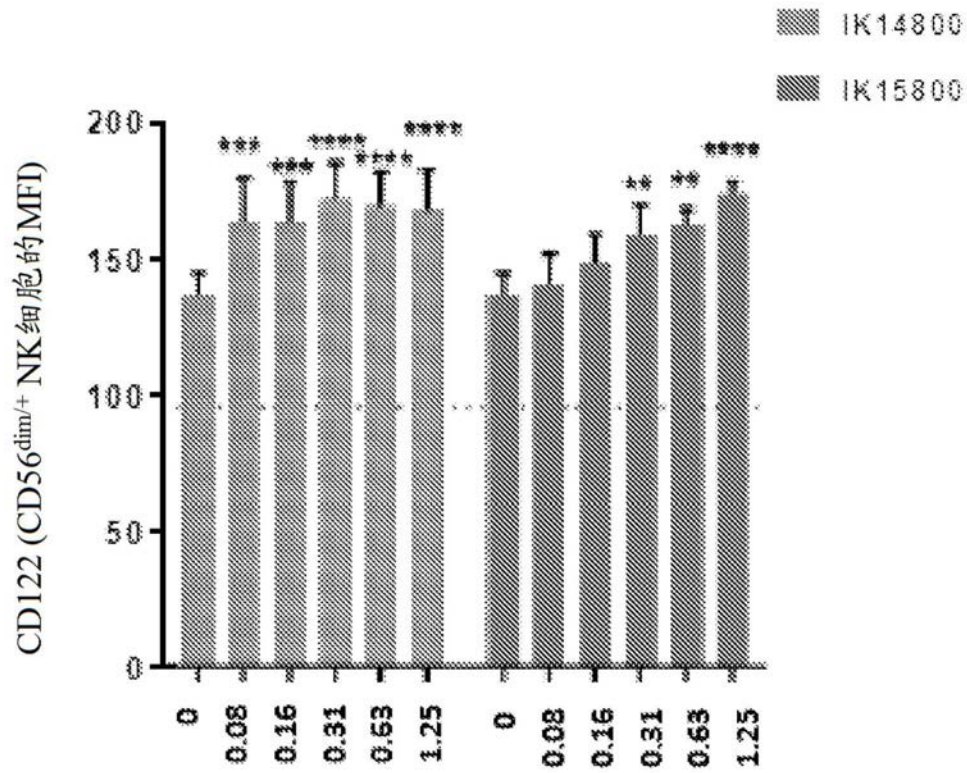


图26A

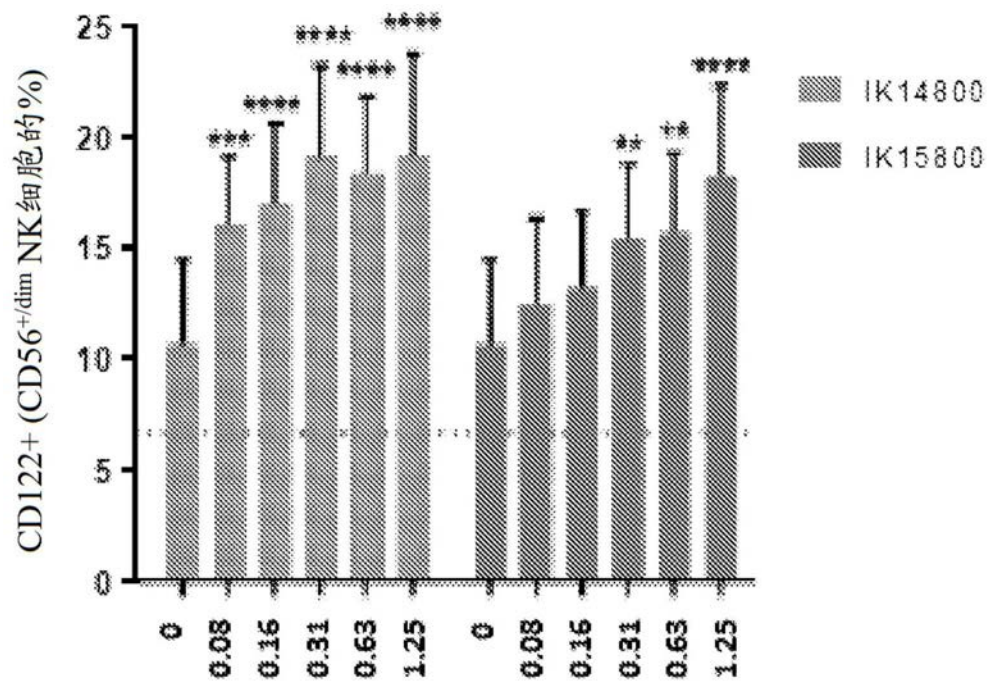


图26B

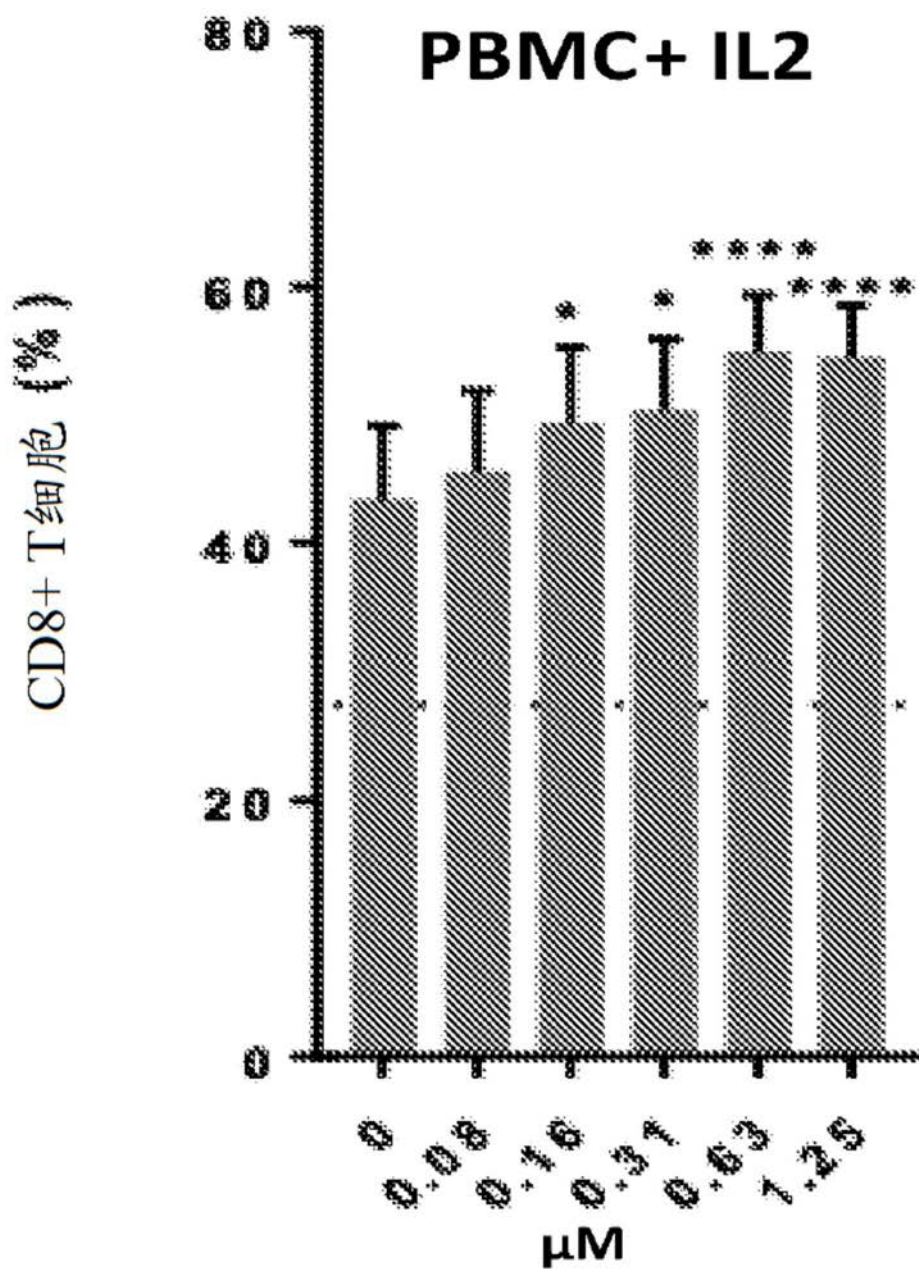


图27

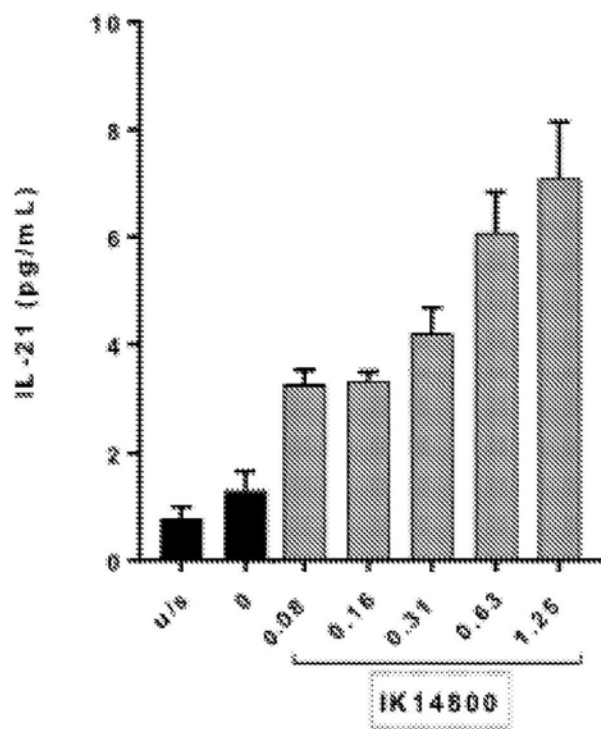


图28A

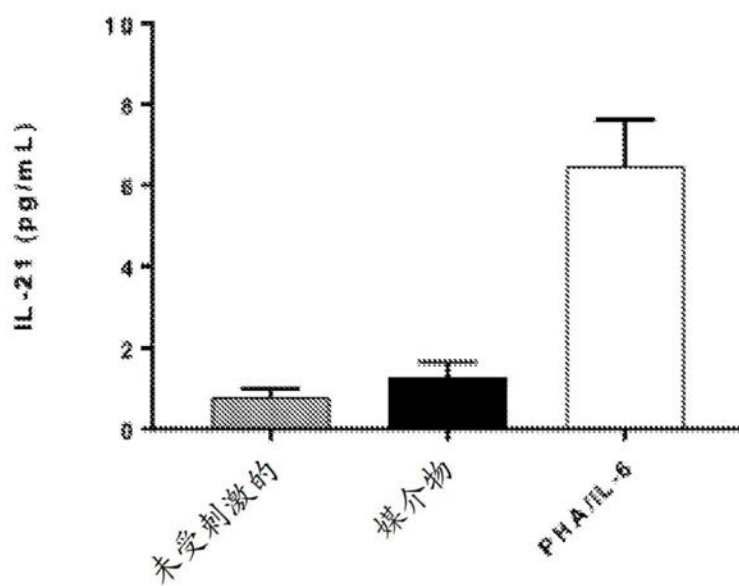


图28B

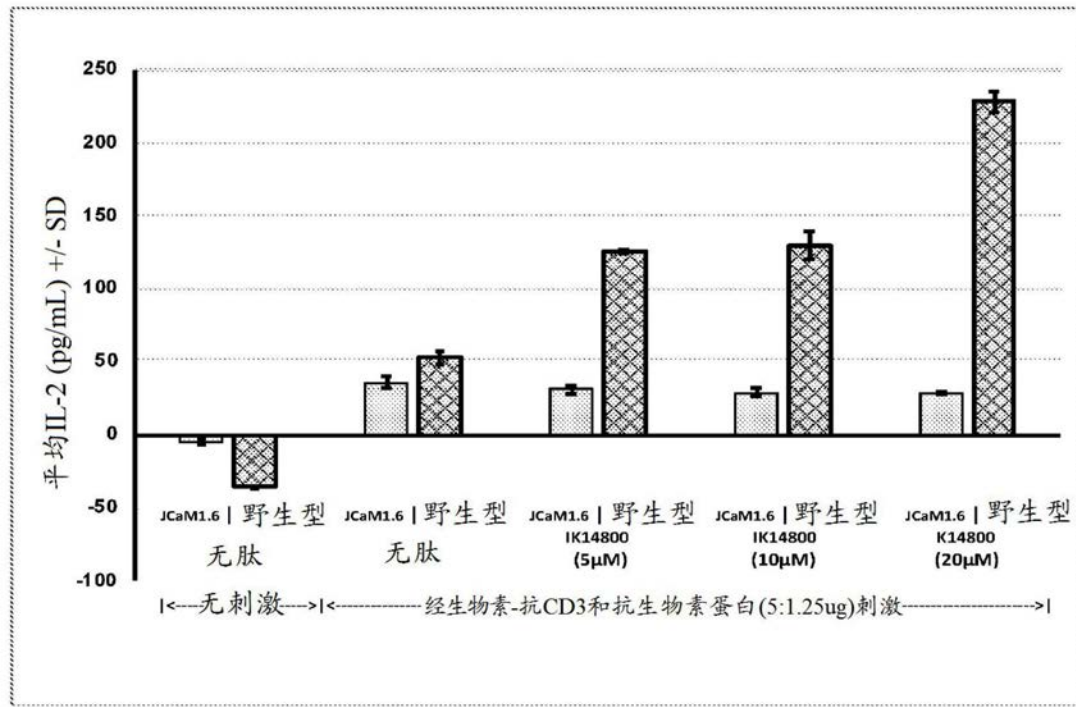


图29

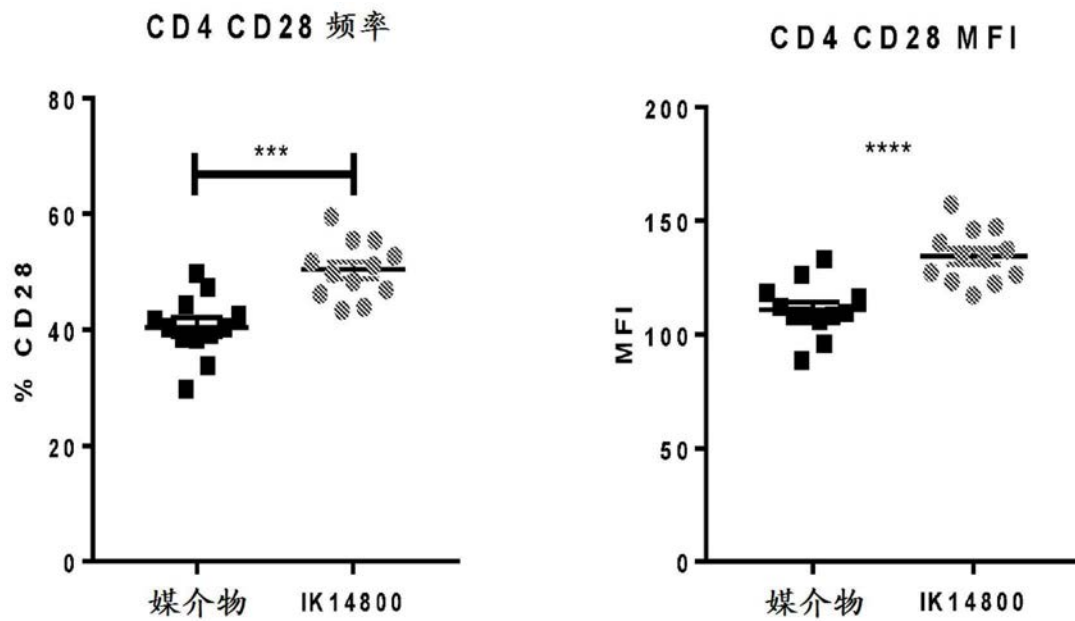


图30

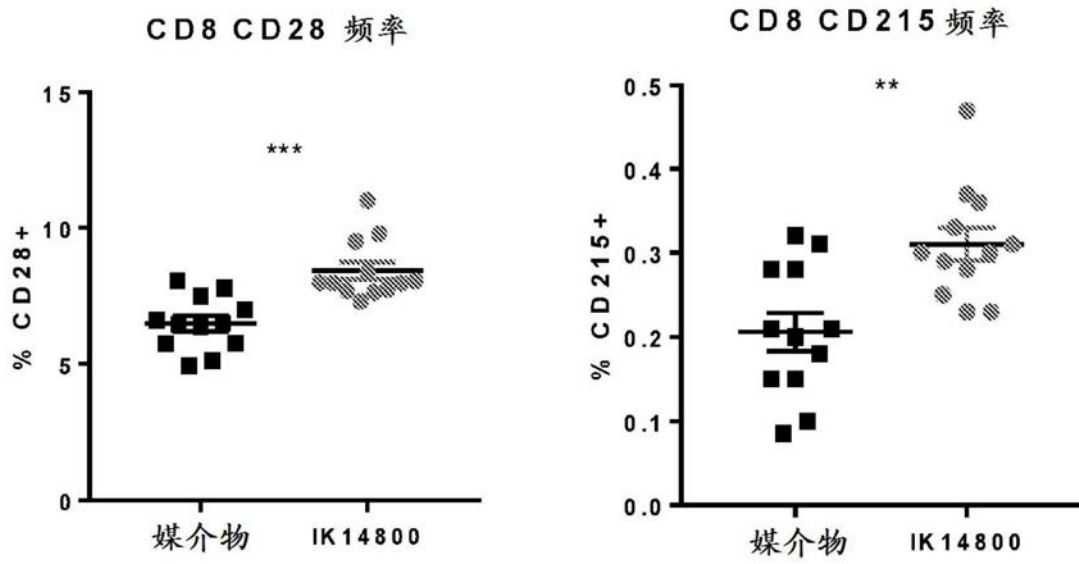


图31

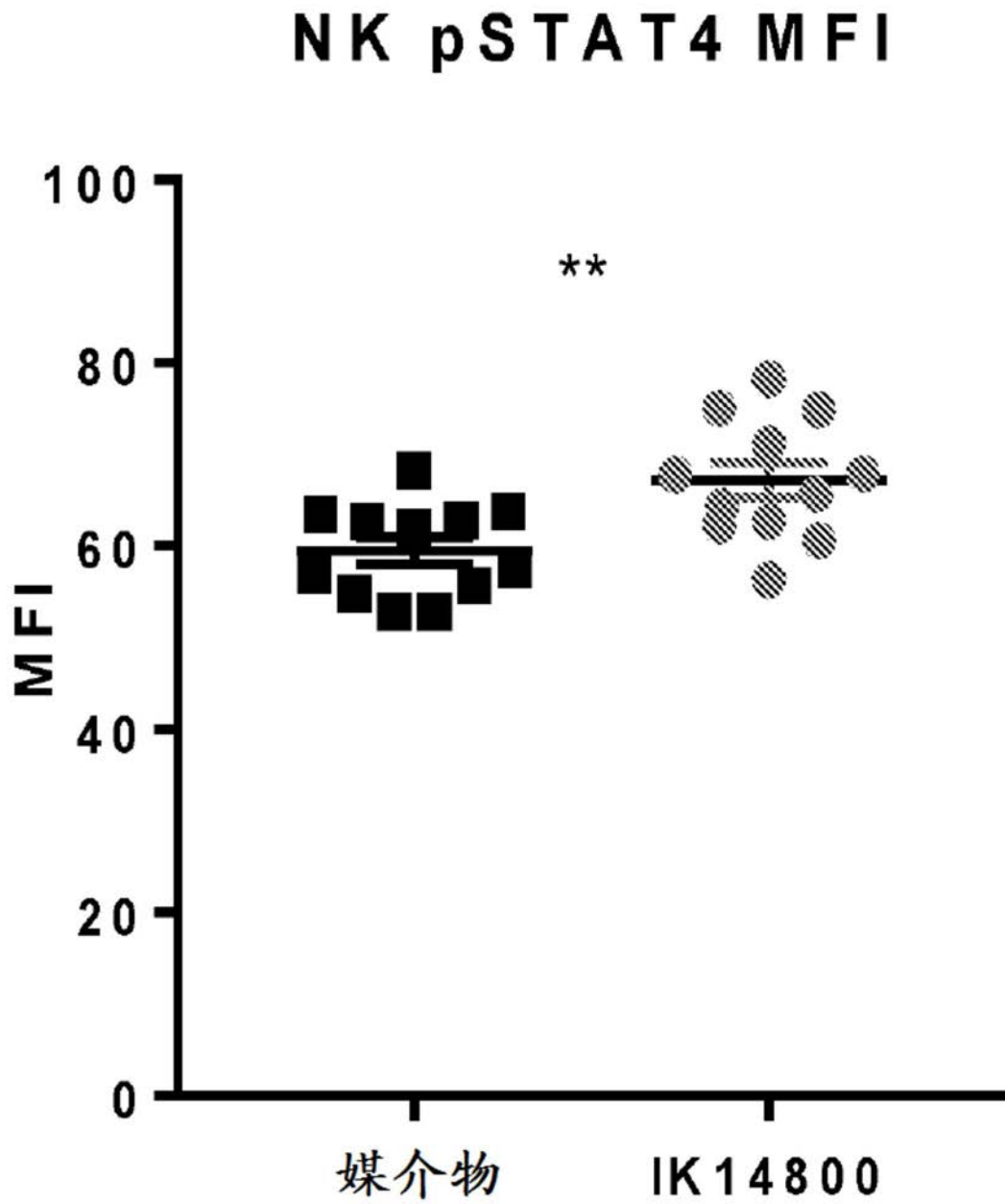


图32

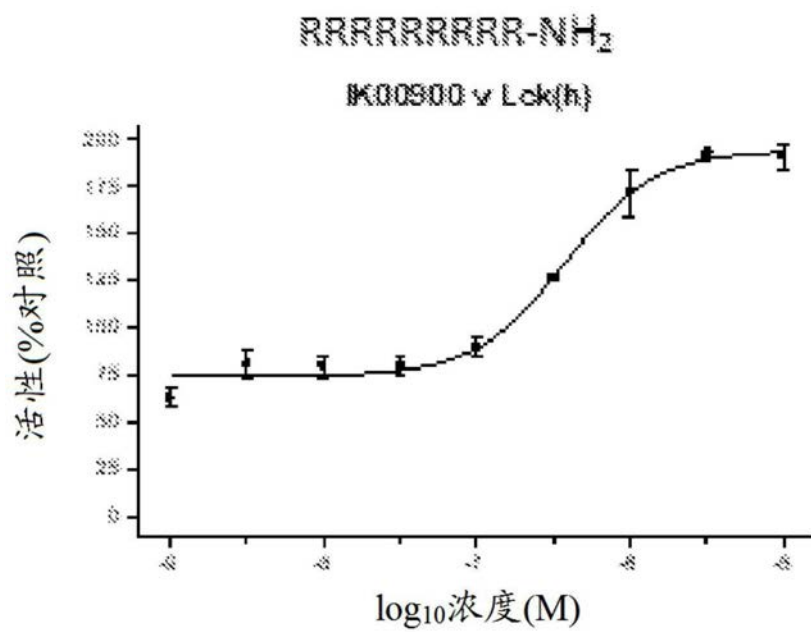


图33A

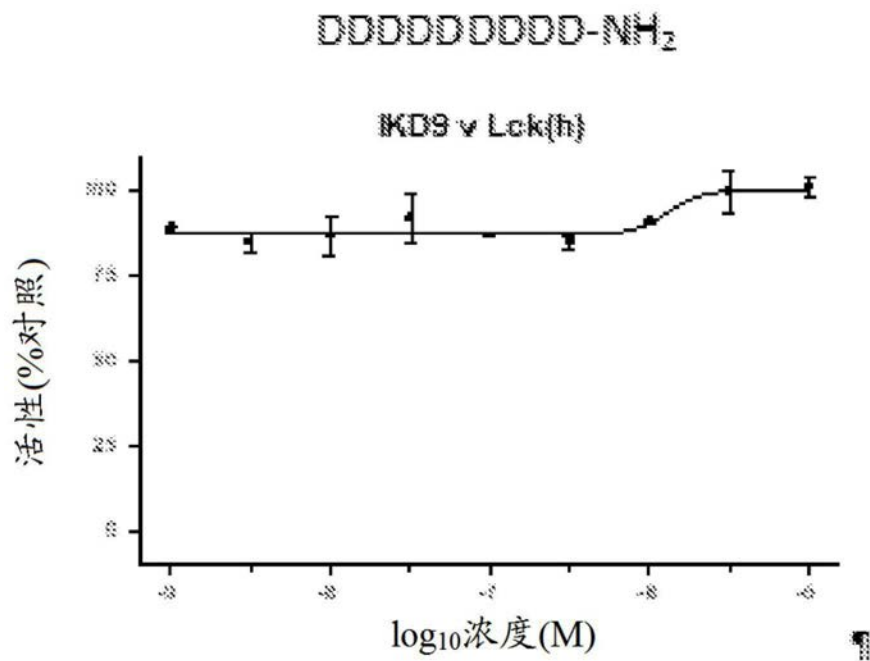


图33B

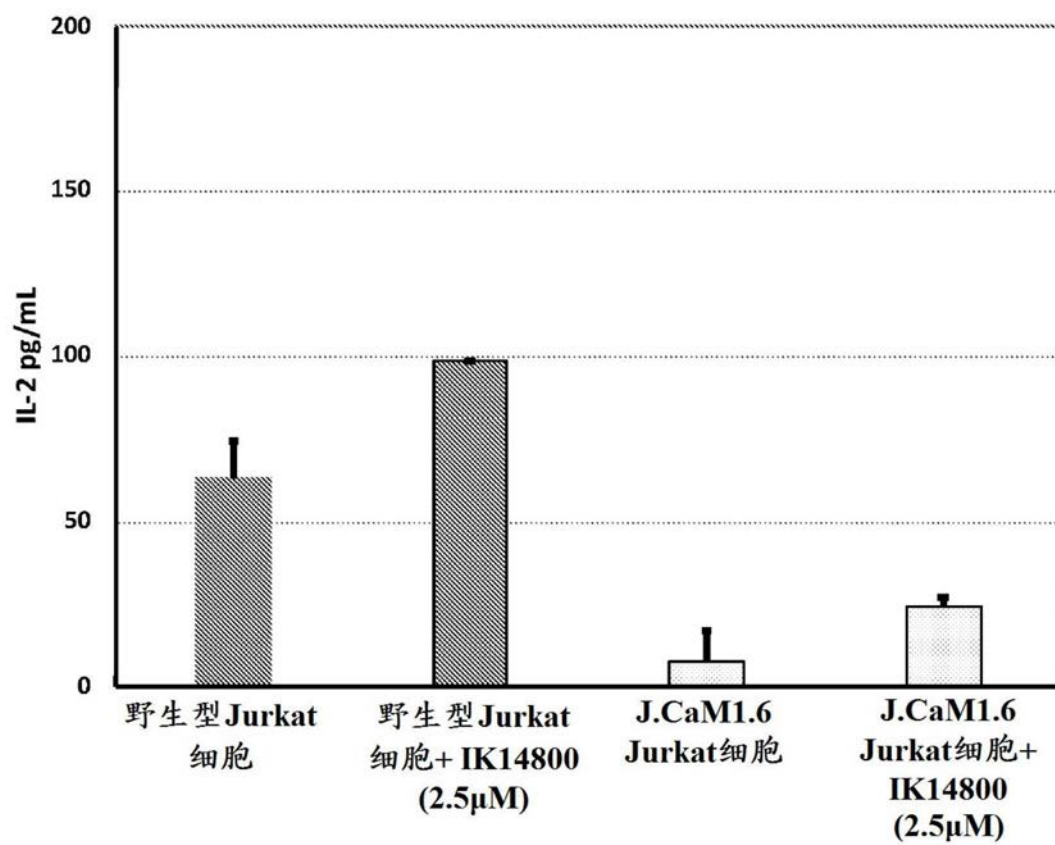


图34

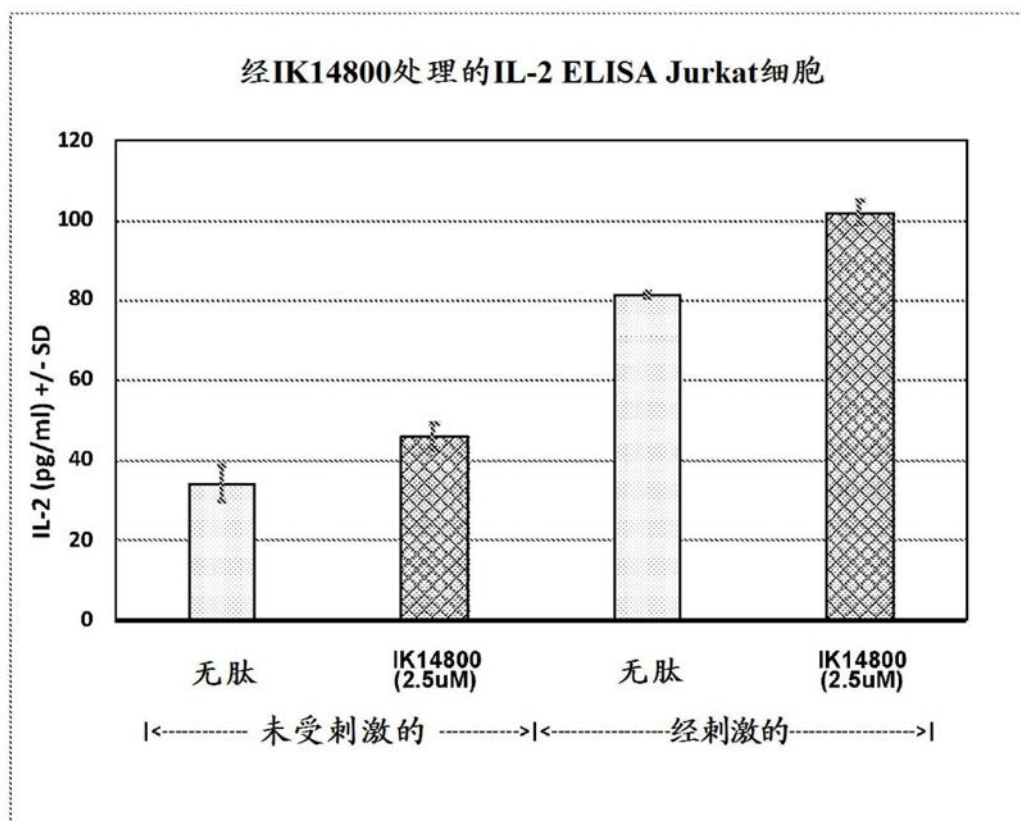


图35

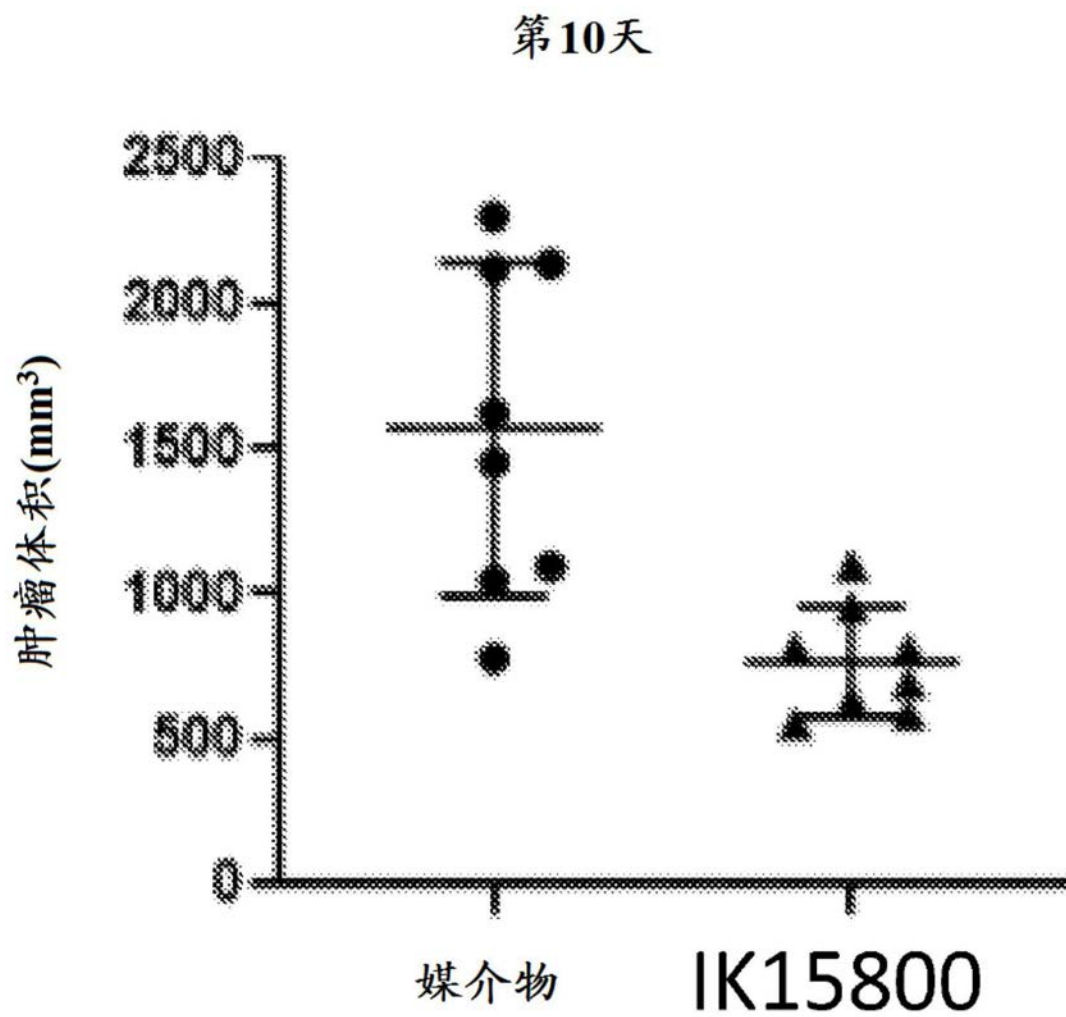


图36

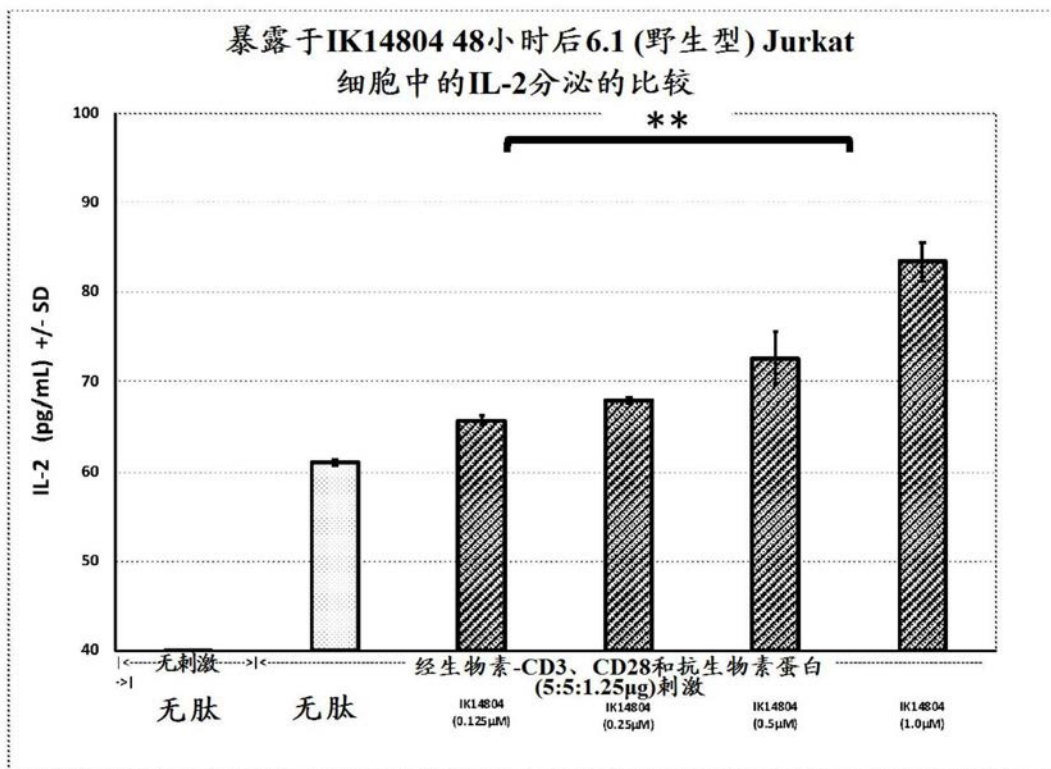


图37

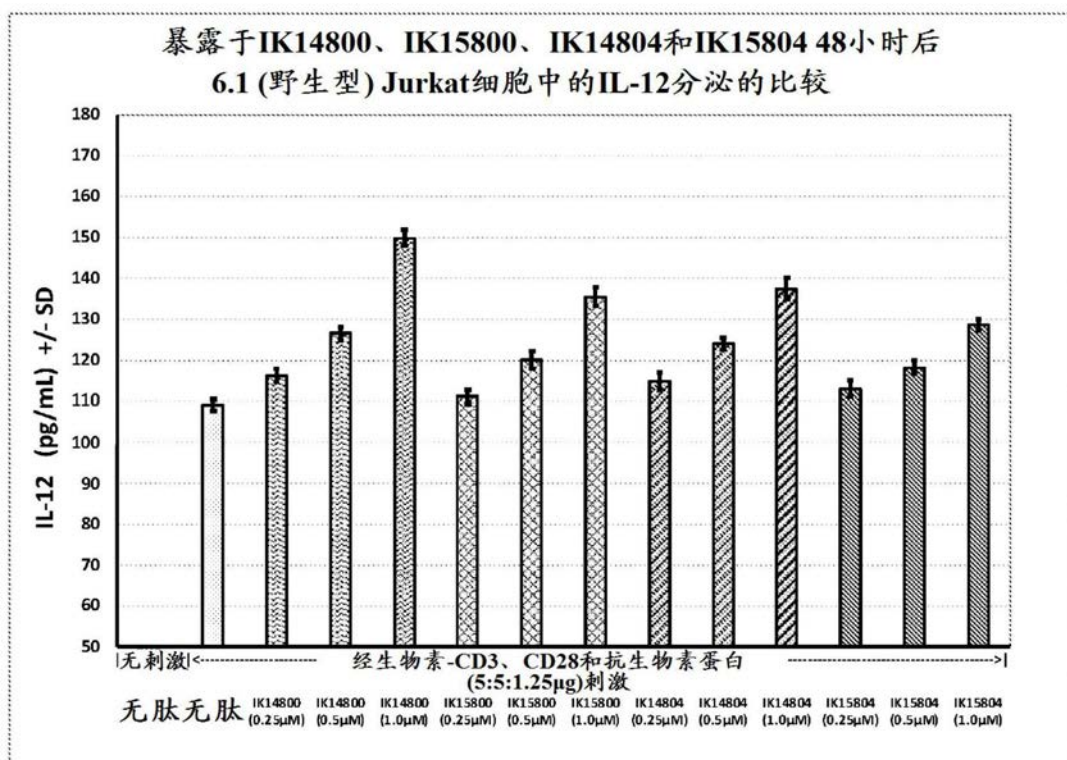


图38

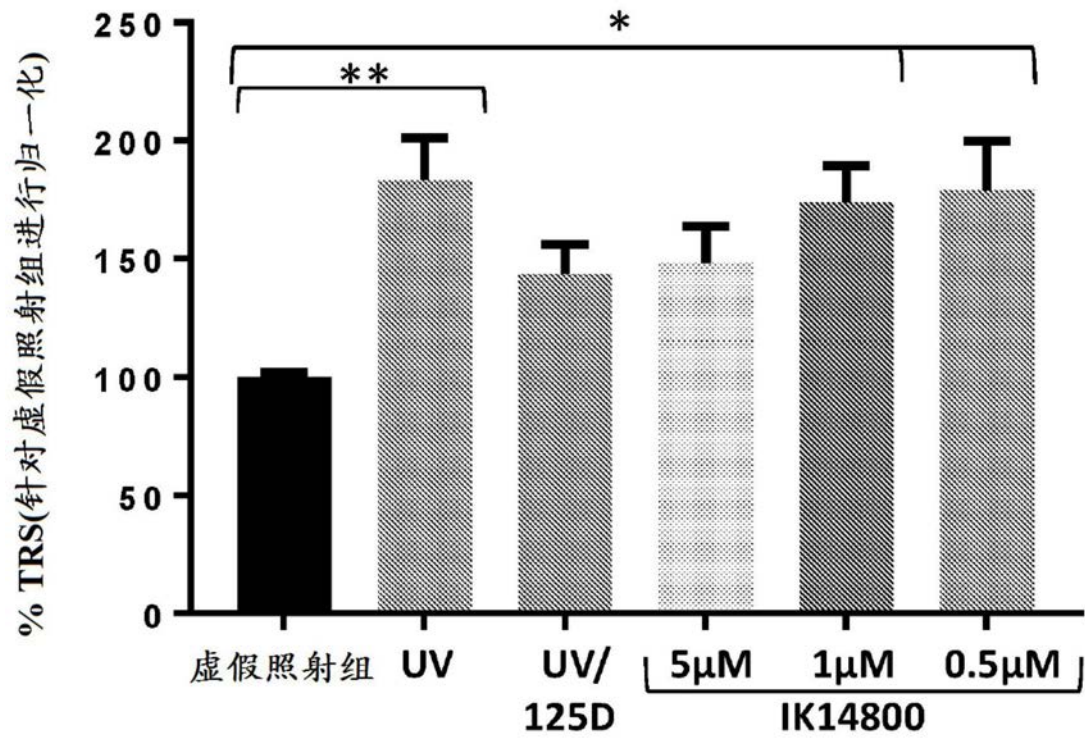
原代人成纤维细胞裂解物中的TRS[#]

图39

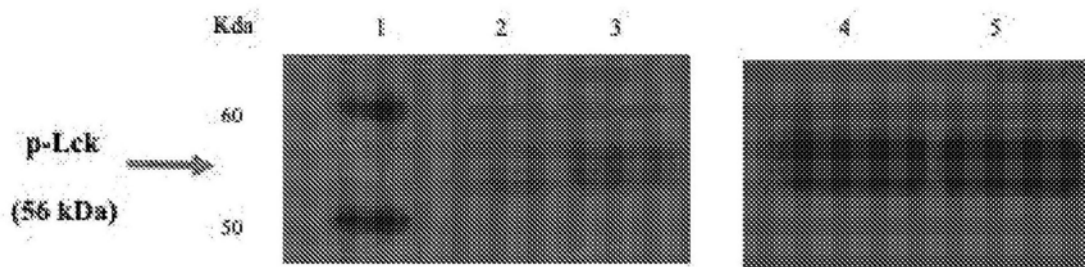


图40

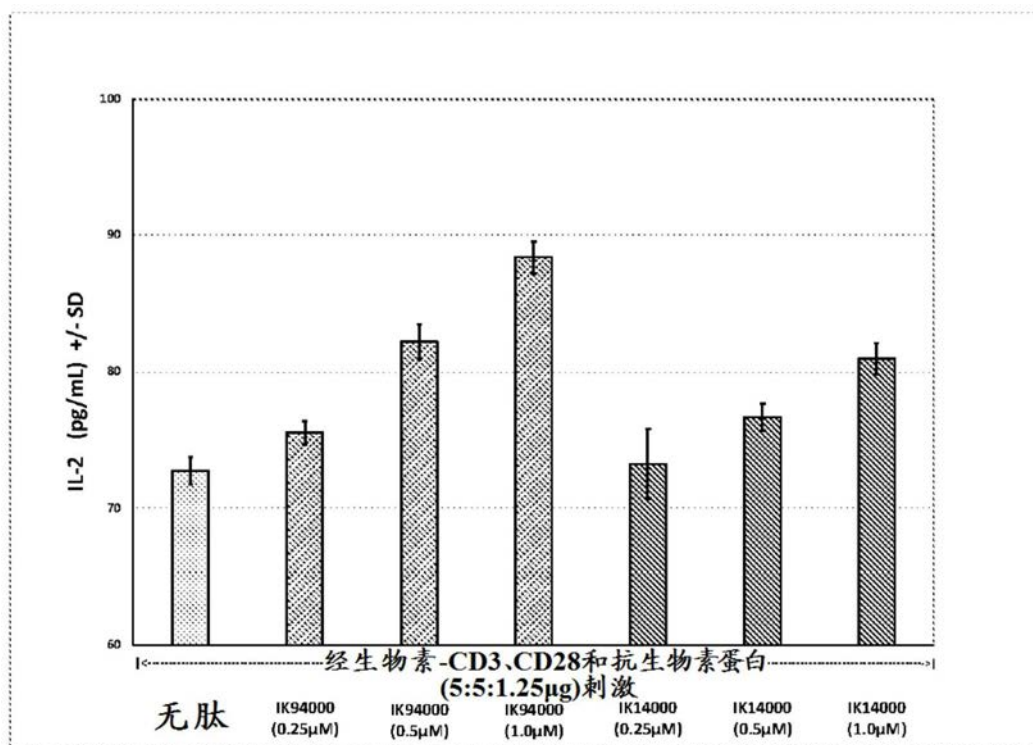


图41A

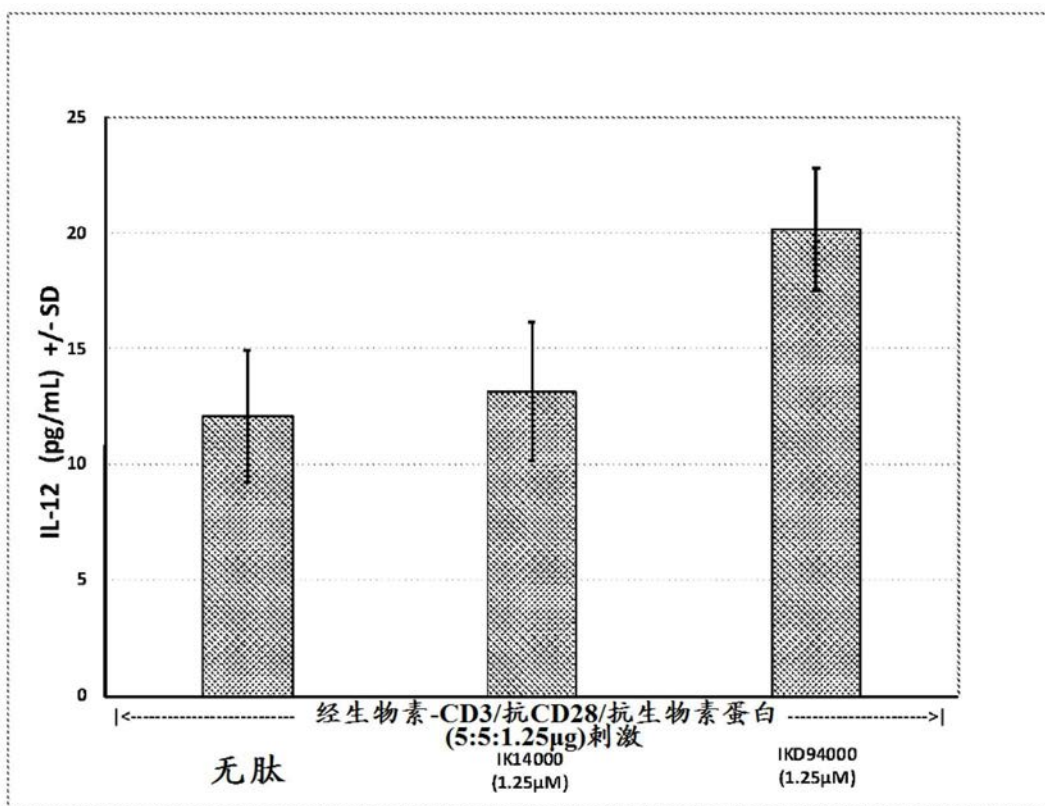


图41B