



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510540 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280088435.9

(22) 申请日 2022.12.16

(30) 优先权数据

63/291,243 2021.12.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081884 2022.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/115048 EN 2023.06.22

(71) 申请人 瑟罗泽恩奥普瑞汀公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李阳 阮俊辉 约里克·波斯特

叶文琛

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 洪欣 伊硕

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

权利要求书4页 说明书37页

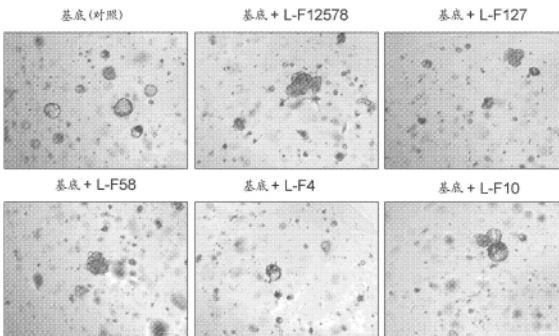
序列表(电子公布) 附图41页

(54) 发明名称

WNT替代剂和用于泪腺再生的方法

(57) 摘要

提供了用于治疗干眼障碍的方法和组合物。特别地,本公开提供了用于调节受试者中的WNT信号传导以调节产生泪液的腺泡细胞的再生以治疗水缺乏干眼病的方法和组合物。



- 1.再生受试者的泪腺细胞的方法,其包括向所述受试者施用WNT信号传导调节剂。
- 2.根据权利要求1所述的方法,其中所述泪腺细胞是腺泡细胞、祖细胞、导管细胞、肌上皮细胞或免疫细胞。
- 3.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂是工程化的WNT信号传导调节剂。
- 4.根据权利要求3所述的方法,其中所述工程化的WNT信号传导调节剂是WNT激动剂。
- 5.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂是包含E3连接酶结合结构域的工程化的WNT超激动剂,所述E3连接酶结合结构域选自:突变型R-脊椎蛋白(RSPO)蛋白;以及特异于E3连接酶的抗体或其功能片段。
- 6.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂包含至少一种工程化的双特异性IgG抗体或其抗原结合片段,所述工程化的双特异性IgG抗体或其抗原结合片段直接激活经典WNT信号传导通路。
- 7.根据权利要求6所述的方法,其中所述双特异性IgG抗体或其抗原结合片段包含对至少一种FZD受体特异的结合组合物和对至少一种LRP受体特异的结合组合物。
- 8.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂选自:(i)WNT3a;(ii)WNT模拟物;或(iii)R-脊椎蛋白模拟物;
 - a)所述FZD结合组合物结合Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8中的至少一种;并且
 - b)所述LRP结合组合物结合Lrp6和/或Lrp5中的至少一种。
- 9.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂结合由以下组成的组:Fzd5和Fzd8,以及Lrp6和/或Lrp5。
- 10.根据权利要求1所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂包含一种或多种选自以下的多肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16,以及以上的任何异构体或同系物。
- 11.根据权利要求10所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂包含:
 - a)两个SEQ ID NO:1的多肽和两个SEQ ID NO:2的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;
 - b)两个SEQ ID NO:3的多肽和两个SEQ ID NO:4的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;
 - c)两个SEQ ID NO:5的多肽和两个SEQ ID NO:6的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;
 - d)两个SEQ ID NO:7的多肽和两个SEQ ID NO:8的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;或
 - e)两个SEQ ID NO:9的多肽和两个SEQ ID NO:10的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;
 - f)两个SEQ ID NO:11的多肽和两个SEQ ID NO:14的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;
 - g)两个SEQ ID NO:12的多肽和两个SEQ ID NO:14的多肽,或与其具有至少90%同一性

的变体;

h) 两个SEQ ID NO:13的多肽和两个SEQ ID NO:14的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体;或

i) 两个SEQ ID NO:15的多肽和两个SEQ ID NO:16的多肽,或与其具有至少90%同一性的变体。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括共同施用至少一种选自以下的分子:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述受试者由于泪腺障碍而需要泪腺细胞再生。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中泪腺障碍是干眼病。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述干眼病是由以下引起的:干燥综合征、慢性移植物抗宿主病(cGVHD)、类风湿性关节炎(RA)、斯蒂芬约翰逊综合征、眼红斑痤疮、化疗、放射肿瘤学治疗、糖尿病、狼疮或睑板腺障碍(MGD)。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述干眼病是干燥综合征。

19. 治疗受试者的泪腺障碍的方法,其包括向所述受试者施用WNT信号传导调节剂。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂是工程化的WNT信号传导调节剂。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂是工程化的WNT激动剂。

22. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂包含至少一种工程化的双特异性抗体或其抗原结合片段,所述双特异性抗体或其抗原结合片段直接激活经典WNT信号传导通路。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述工程化的WNT激动剂选自:(i) WNT3a; (ii) WNT模拟物;或(iii) R-脊椎蛋白模拟物。

24. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂能结合:

a) 以下组中的任一种或多种:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8;以及

b) Lrp6和/或Lrp5。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂能结合:

a) 以下组中的任一种或多种:Fzd1、Fzd2和Fzd7;以及

b) Lrp6和/或Lrp5。

26. 根据权利要求20所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂能结合:

a) 以下组中的任一种或多种:Fzd5和Fzd8;以及

b) Lrp6和/或Lrp5。

27. 根据权利要求19所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂包含选自以下的序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16,及其前述任一项的任一异构体或同系物,任选地,其中所述WNT信号传导调节剂包含:

a) 两个SEQ ID NO:1的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:2的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

b) 两个SEQ ID NO:3的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:4的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

c) 两个SEQ ID NO:5的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:6的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

d) 两个SEQ ID NO:7的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:8的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);或

e) 两个SEQ ID NO:9的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:10的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

f) 两个SEQ ID NO:11的多肽(或一个或两个与其具有至少90%、至少95%或至少98%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:14的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

g) 两个SEQ ID NO:12的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:14的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);

h) 两个SEQ ID NO:13的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:14的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体);或

i) 两个SEQ ID NO:15的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)和两个SEQ ID NO:16的多肽(或一个或两个与其具有至少90%同一性的变体)。

28. 根据权利要求19至27中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括施用以下至少一种:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

29. 根据权利要求19至28中任一项所述的方法,其中所述WNT信号传导调节剂以治疗有效量施用。

30. 根据权利要求19至29中任一项所述的方法,其中所述受试者是活的哺乳动物。

31. 根据权利要求19至30中任一项所述的方法,其中所述受试者是人患者。

32. 根据权利要求19至31中任一项所述的方法,其中所述泪腺障碍是干眼病。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述干眼病是由以下引起的:干燥综合征、慢性移植物抗宿主病(cGVHD)、类风湿性关节炎(RA)、斯蒂芬约翰逊综合征、眼红斑痤疮、化疗、放射肿瘤学治疗、糖尿病、狼疮或睑板腺障碍(MGD)。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述干眼病是由干燥综合征引起的。

35. 用于治疗受试者的干眼障碍的组合物,所述组合物包含WNT信号传导调节剂。

36. 根据权利要求35所述的组合物,其中所述WNT信号传导调节剂包含至少一种工程化的双特异性抗体或其抗原结合片段,所述双特异性抗体或其抗原结合片段直接激活经典WNT信号传导通路。

37. 根据权利要求35所述的组合物,其中所述至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体或其抗原结合片段对以下Fzd组合中的任一种是特异性的或优先结合以下Fzd组合中的任一种:

a) Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8;

b) Fzd1、Fzd2和Fzd7;或

c)Fzd5和Fzd 8,

其中所述工程化的双特异性抗体或其抗原结合片段还结合Lrp5和/或Lrp6。

38.根据权利要求35所述的组合物,其进一步包含抗炎剂。

39.根据权利要求35至38所述的组合物,其中所述组合物包含治疗有效量的组分。

40.根据权利要求35至38所述的组合物,其中所述受试者是活的哺乳动物。

41.根据权利要求35至38所述的组合物,其中所述受试者是人患者。

42.根据权利要求35至38所述的组合物,其中所述水缺乏干眼障碍是由以下引起的:干燥综合征、障碍、慢性移植物抗宿主病(cGHVD)、类风湿性关节炎(RA)、斯蒂芬约翰逊综合征、眼红斑痤疮、化疗、放射肿瘤学治疗、糖尿病、狼疮或睑板腺障碍(MGD)。

WNT替代剂和用于泪腺再生的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年12月17日提交的美国临时申请号63/291,243的优先权,其每个通过引用整体并入本文。

关于序列列表的声明

[0002] 与该申请相关的序列表XML以XML文件格式提供,并通过引用并入说明书。包含序列表XML的XML文件的名称是SRZN_024_01WO_ST26.xml。XML文件为61,424字节,于2022年12月15日创建,并通过USPTO专利中心以电子方式提交。

技术领域

[0003] 本公开涉及WNT信号调节剂和用于各种眼科相关障碍的治疗方法。

背景技术

[0004] 泪腺是位于大多数脊椎动物的上眼睑外侧部分下方的外分泌腺。泪腺产生泪液膜,所述泪液膜通过泪管分泌,并与眼睛健康有关(参见Yao&Zhang第939页)。该膜保持角膜表面和内眼睑湿润并保护角膜和结膜上皮免于物理损伤以及免于免疫反应(参见同上)。

[0005] 泪腺障碍和损伤可引起显著的眼部疾病病理,尤其是干眼病(Dartt, OCULAR DISEASE第105页)。干眼病的特征在于泪液膜渗透压增加和眼表面炎症(参见同上)。泪液的不充分产生可能导致刺激、疼痛和对眼表面的潜在损害。

[0006] 存在两种主要类型的干眼病:水缺乏和蒸发性。而水缺乏被子分类为干燥综合征(自身免疫)干眼和非干燥综合征(非自身免疫)干眼。

[0007] 在水缺乏干眼的情况下,泪腺经常发炎,导致产生泪液液体的腺泡细胞的萎缩和细胞死亡。在腺泡细胞丧失后,泪液产生问题恶化,导致恶性炎症-萎缩周期的加强。因此,泪腺是水缺乏干眼中的靶标。

[0008] 目前,水缺乏和蒸发性干眼病都是通过在眼表面上局部施用人工泪液和/或抗炎剂来治疗(参见同上第106页)。只有少数治疗通过全身施用抗炎剂、所谓的促分泌剂、免疫抑制剂和性激素靶向泪腺本身(参见同上)。这些治疗方法中没有一种直接处理泪腺(包括产生泪液的腺泡细胞)的萎缩和/或损伤。因此,对于再生腺泡细胞、恢复内源性泪液产生和破坏炎症和萎缩的循环的试剂和方法存在极大的未满足的需求。

发明内容

[0009] 本说明书提供了通过泪腺和/或泪腺腺泡细胞的激活和/或再生来治疗干眼障碍的方法及其组合物。

[0010] 在一方面,本发明包括在受试者中再生泪腺腺泡细胞、祖细胞、导管细胞、肌上皮细胞或免疫细胞的方法,包括向受试者施用WNT信号传导调节剂。在实施方案中,WNT信号传导调节剂可以是工程化的WNT信号传导调节剂。在另一个实施方案中,WNT信号传导调节剂是工程化的WNT激动剂或超激动剂,或工程化的WNT拮抗剂。在特定的实施方案中,细胞是上

皮干细胞和/或祖细胞,例如泪腺上皮干细胞和/或祖细胞。

[0011] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体,所述工程化的双特异性全长IgG抗体直接激活经典WNT信号传导通路。在任意实施方案中,工程化的WNT激动剂可以选自:(i)WNT3a;(ii)WNT模拟物;或(iii)R-脊椎蛋白模拟物。WNT模拟物可以是SWAPTM化合物。R-脊椎蛋白模拟物可以是SWEETSTM化合物。

[0012] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以影响以下任何一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8以及Lrp6和/或Lrp5。例如,WNT信号传导调节剂可以靶向以下任一个或多个:Fzd1、Fzd2和Fzd7;或Fzd5和Fzd8中的任一个或多个,同时也靶向Lrp6和/或Lrp5。对于另一个示例,WNT信号传导调节剂可以影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2和Fzd7。

[0013] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的一个实施方案中,方法进一步包括施用以下至少一种的步骤:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

[0014] 在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 $\geq 1\text{nM}$ 。在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以以治疗有效量施用。在任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。在任何实施方案中,受试者可以是人患者。

[0015] 在另一方面,本发明包括治疗受试者的泪腺障碍的方法,所述方法包括向受试者施用WNT信号传导调节剂。在实施方案中,WNT信号传导调节剂可以是工程化的WNT信号传导调节剂。在另一个实施方案中,WNT信号传导调节剂是工程化的WNT激动剂或工程化的WNT拮抗剂。在进一步的实施方案中,WNT信号传导调节剂是工程化的WNT超激动剂。

[0016] 在治疗泪腺障碍的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种直接激活经典WNT信号传导通路的工程化双特异性全长IgG抗体。在任何实施方案中,工程化的WNT激动剂可以选自:(i)WNT3a;(ii)WNT模拟物;或(iii)R-脊椎蛋白模拟物。WNT模拟物可以是SWAPTM化合物。R-脊椎蛋白模拟物可以是SWEETSTM化合物。

[0017] 在治疗泪腺障碍的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8以及Lrp6,和/或Lrp5。例如,WNT信号传导调节剂可以靶向以下任何一个或多个:Fzd1、Fzd2和Fzd7;或Fzd5和Fzd8中的任一个或多个,同时也靶向Lrp6和/或Lrp5。对于另一个示例,WNT信号传导调节剂可以影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2和Fzd7。

[0018] 在治疗泪腺障碍的方法的一个实施方案中,方法进一步包括施用以下至少一种的步骤:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

[0019] 在治疗泪腺障碍的方法的任何实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 $\geq 1\text{nM}$ 。在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以以治疗有效量施用。在任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。在任何实施方案中,受试者可以是人患者。

[0020] 在另一方面,本发明包括用于治疗受试者的干眼障碍的组合物,组合物包含WNT信号传导调节剂。在组合物的任何实施方案中,干眼障碍可以是由于干燥综合征障碍、慢性移植抗宿主病(cGVHD)、类风湿性关节炎(RA)、斯蒂芬约翰逊综合征、眼红斑痤疮、化疗、放射肿瘤学治疗、糖尿病、狼疮等。

[0021] 在组合物的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种工程化的双特异

性全长IgG抗体,所述工程化的双特异性全长IgG抗体直接激活经典WNT信号传导通路。至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体可以对Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8以及Lrp6和/或Lrp5中的任一个或多个具有特异性。

[0022] 在实施方案中,组合物可以进一步包含抗炎剂或泪腺促分泌素。

[0023] 在组合物的任何实施方案中,组合物可以包含治疗有效量的每种组分。

[0024] 在组合物的任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。在组合物的任何实施方案中,受试者可以是人患者。

附图说明

[0025] 图1描绘了在补充了另外的生长因子的Advanced DMEM中,使用标准3D类器官方案7天后,从原代小鼠泪腺组织生长的类器官生长的代表性光学显微照片图像。条件包括单独含有R-脊椎蛋白1 (RSP01) 的基底(对照,左上),或添加各种WNT模拟物化合物,每种浓度为5nM。“F”表示各种FZD结合剂(例如,18R5——FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、FZD8结合剂(“F12578”);R2H1——FZD1、FZD2、FZD7结合剂(“F127”);2919——FZD5、FZD8结合剂(“F58”);5063——FZD4结合剂(“F4”);和与各种FZD受体结合的HB9L9.3——FZD10结合剂(F10);L是与LRP5和LRP6结合的LRP结合剂YW211.31.57。

[0026] 图2描绘了显微照片图像,其显示泪腺的类器官形态(左),荧光指示Mist1腺泡细胞标记基因表达(中)和复合物(右),标尺为100 μ m。

[0027] 图3A至图3C描绘了在对照培养基中或在含有L6-F12578 WNT模拟物化合物的培养基中扩增7天的类器官中,增殖标记物或泪腺衍生细胞和腺泡细胞特异性标记物的相对基因表达的柱状图。测量的基因包括WNT靶Axin2(图3A)、泪管细胞标记物Krt7(图3B)和泪腺腺泡细胞标记物Mist1(图3C)。

[0028] 图4描绘了在腺泡细胞类器官培养物中,在7天WNT模拟物筛选中通过发光定量类器官生长的图表。起始材料是泪腺腺泡细胞类器官细胞。培养基仅含有RSP01(对照),或加入浓度为5nM的WNT模拟物。

[0029] 图5描绘了在WNT模拟物筛选结束时,在对照(左图)或L6-F12578(右图)中显示了类器官形态的光学显微照片。高WNT的实体出芽形态与原代组织的生长共有,并表明腺泡细胞一致性。标尺为200 μ m。

[0030] 图6描绘了通过在具有或不具有RSP01(500ng/mL)的几个剂量的L6-F127 WNT模拟物(0.05nM至5nM)下扩增7天的类器官细胞中的发光(以相对光单位(RLU)表示)来定量活的类器官细胞的图表。

[0031] 图7描绘了在暴露后24小时和48小时测量急性WNT靶基因诱导的实验设计的示意图。

[0032] 图8描绘了在接种后第7天WNT刺激时的类器官培养物的代表性光学显微照片图像。标尺为200 μ m。

[0033] 图9描绘了在诱导后24小时(左)和48小时(右)通过qPCR定量WNT靶Axin2表达水平的图。将不同条件的表达归一化为actinB表达并相对于对照(无WNT模拟物)。

[0034] 图10描绘了两个非干眼人泪腺的图像,其在外植体实验中使用。

[0035] 图11A和图11B描绘了人泪腺细胞培养物在分离后(图11A)和在腺泡细胞培养基中

24小时后(图11B)的光学显微照片。图11A和图11B中的标尺均为200 μm 。

[0036] 图12描绘了在单独的RSP01(对照)或5nM的RSP01+WNT模拟物中在外植体培养开始后24小时通过qPCR定量Axin2表达水平。将不同条件的表达归一化为actinB表达并相对于对照(无WNT模拟物)。

[0037] 图13描绘了通过原位杂交在初始小鼠泪腺组织中测定的WNT受体表达水平。具有探针信号的光学显微照片组织学图像以粉红色表示,标尺为100 μm 。

[0038] 图14描绘了在健康人泪腺组织中通过原位杂交测定的WNT受体表达水平。具有探针信号的光学显微照片组织学图像以粉红色表示,标尺为100 μm 。

[0039] 图15描绘了基于照相机的荧光显微镜图像,显示了初始小鼠泪腺细胞的四个样品:暴露14天后的对照(仅RSP01)样品和三个WNT模拟物样品(10mpk, IP, 每周两次),用4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和抗Ki67(增殖细胞标记物(绿色))染色。

[0040] 图16描绘了用各种WNT模拟物治疗14天后,定量泪腺的相对重量(泪腺重量/体重)的图表。(WNT模拟物3mpk, RSP02 0.1mpk, IP, 每周两次)。图例在图表中是从左到右的。

[0041] 图17描绘了体内小鼠实验的示意性模型,其中通过局部注射IL1 α 来模拟干眼病。红色代表注射了重组IL-1 α 和WNT模拟物(或对照抗GFP)的同侧。黑色代表对侧对照侧。

[0042] 图18A和图18B描绘了在暴露于IL1 α +WNT模拟物和IL1 α +抗GFP 8小时和24小时后,定量WNT靶基因Axin2(图18A)和Rnf43(图18B)的表达的图表。将不同条件下的表达归一化为actinB表达并相对于对照(暴露于GFP 8小时)。

[0043] 图19描绘了在四种实验条件下在五天时间过程中同侧的平均泪液量分泌:(1)局部施用WNT模拟物(10 μg 泪腺内);(2)局部施用抗GFP(10 μg 泪腺内);(3)全身施用WNT模拟物(200 μg IP);和(4)全身施用抗GFP(200 μg IP)。

[0044] 图20描绘了在用IL1 α 注射泪腺后3天,定量小鼠中萎缩/变性和炎症的病理学评分和四种不同实验处理条件的柱状图:(1)局部施用WNT模拟物(10 μg 泪腺内);(2)局部施用抗GFP(10 μg 泪腺内);(3)全身施用WNT模拟物(200 μg IP);和(4)全身施用抗GFP(200 μg IP)。每个类别的图例从左到右显示。

[0045] 图21A和图21B描绘了注射IL1 α +WNT模拟物和IL1 α +抗GFP的小鼠的用苏木精和伊红(H&E)染色的泪腺切片的光学显微照片。两个图像中的标尺均为100 μm 。

[0046] 图22显示了用3mg/kg的WNT模拟物每两周处理14天后的唾液腺重量(以克为单位)。图例在图表中从左到右显示。

[0047] 图23显示了3mg/kg剂量的各种WNT模拟物给药两周后的唾液腺组织学。A列显示了在第14天通过HE染色每个处理组的唾液腺组织学的图像。B列显示了在第14天每个处理组中的棕色Ki67(增殖标记物)的染色。标尺200 μm 。

[0048] 图24A和图24B显示了两周10mg/kg给药后的唾液腺组织学。图24A显示了在第14天通过每个处理组的HE染色的唾液腺组织学的代表性图像。图24B显示了每个处理组通过Image J对浆液腺泡面积上的粘液腺泡面积(白色)的定量。标尺200 μm 。

[0049] 图25是表示用不同浓度的RSP02-Fc给药两周后的唾液腺重量(以克为单位)的图表。图例在图表中从左到右显示。

[0050] 图26A和图26B显示了小鼠唾液腺类器官扩增。图26A提供了在第7天用RSP01或RSP01+L-F12578处理的原代组织的唾液腺类器官扩增的明场图像。标尺200 μm 。图26B显示

了对于具有不同FZD特异性的WNT模拟物,在第7天以细胞活力测量的剂量依赖性小鼠唾液腺类器官扩增。

[0051] 图27显示了小鼠唾液腺类器官WNT受体分布图。通过定量PCR检测Fzd和Lrp基因在小鼠颌下腺类器官中的表达水平。

[0052] 图28A和图28B显示了对狼疮小鼠唾液腺的治疗效果。图28A提供对照(MRL/MpJ)和用抗GFP或L-F12578处理两周的狼疮(MRL-1pr)小鼠的唾液腺重量(以克为单位)。图28B显示了在第14天通过对狼疮和对照小鼠的每个处理组的HE染色获得的唾液腺组织学的图像。标尺200 μ m。

[0053] 图29显示了在IL-1 α 模型中局部注射24小时后WNT靶基因Axin2的表达。所有处理组注射10 μ g。数据归一化为抗GFP对照组。阳性对照L-F12578和1SH1-03显著升高。

[0054] 图30显示了在IL-1 α 模型中局部注射24小时后WNT靶基因Axin2的表达。除抗GFP对照外的所有处理组在三种不同剂量下注射:10 μ g、50 μ g或150 μ g。数据归一化为抗GFP对照组。所有1SH1-03组和高剂量1SH1-26组显著升高。

[0055] 图31显示了在IL-1 α 模型中使用酚红棉线的泪液量测量。数据代表12只动物的平均值。与抗GFP对照相比,在第2天和第3天的几个处理组中的泪液量显著升高。在第2天,从上到下的线对应于:1-F12578、1SH1-03、1SH1-36、1SH1-26和抗GFP。

[0056] 图32显示了在IL-1 α 模型中局部注射3天后WNT靶基因Axin2的表达。1SH1-03处理组以两种不同剂量注射:10 μ g或150 μ g。数据归一化为抗GFP对照组。1SH1-03高剂量的Axin2在第3天显著升高。

[0057] 图33显示了在IL-1 α 模型中使用酚红棉线的泪液量测量。数据代表12只动物的平均值。与抗GFP对照相比,在第2天、第3天、第4天的几个处理组中的泪液量显著升高。在第3天,从上到下的线是:1-F12578、1SH1-36、1SH1-03、1SH1-26和抗GFP。

[0058] 图34A和图34B显示了导管结扎模型。图34A是同侧(蓝色)泪腺导管结扎的示意图。另一侧(对侧,红色)作为对照。图34B是导管结扎模型的研究时间线;3天闭合并测量泪液体积,并在除去结扎后记录。

[0059] 图35A和图35B显示了导管结扎损伤。图35A显示了在管道闭合3天后使用酚红棉线的泪液量测量。结扎导致在2周至3周内恢复的泪液量的强烈降低。在第0天,顶部线是对侧的,而底部线是同侧的。图35B显示了导管结扎后泪腺组织学的代表性图像。与对照相比,第7天的严重萎缩在第14天和第21天缓慢恢复。

[0060] 图36显示了在导管结扎模型中24小时的WNT靶基因Axin2表达,在导管闭合3天后进行治疗。处理组在两个不同剂量下注射:10 μ g或100 μ g。数据归一化为抗GFP对照组。1SH1-03和阳性对照L-F12578的Axin2显著升高。

[0061] 图37是在导管闭合3天后使用酚红棉线测量一周的泪液量。在第7天,在阳性对照L-F12578和100 μ g的1SH1-03中泪液量显著增加。在第7天,从上到下的线是:1-F12578(10 μ g)、1SH1-03(100 μ g)、1SH1-03(10 μ g)和抗GFP。

[0062] 图38显示了导管结扎研究的第7天(来自图34)的同侧和对侧腺体中增殖腺泡细胞(Mist1+Ki67+)的定量。同侧和高剂量1SH1-03对侧增殖细胞增加。对于每组柱,从左到右的柱是:GFP、L-12578(10 μ g)、1SH1-03(10 μ g)和1SH1-03(100 μ g)。

[0063] 图39显示了在导管闭合3天后使用酚红棉线测量两周的泪液量。在阳性对照L-

F12578和1SH1-03中,第7天后泪液量显著升高。在最后的时间点,从上到下的线是:1-F12578(10 μ g)、1SH1-03(100 μ g)、1SH1-03(10 μ g)和抗GFP。

[0064] 图40显示了在导管结扎研究的第14天(来自图39),同侧和对侧腺体中增殖腺泡细胞(Mist1+Ki67+)的定量。同侧和高剂量1SH1-03对侧增殖细胞增加。对于每组柱,从左到右的柱对应于:GFP、G211-18R5、1SH1-03(10 μ g)和1SH1-03(100 μ g)。

[0065] 图41A和图41B显示了腺泡细胞的体外增殖。图41A显示了用对照或10nM 1SH1-03处理的泪腺细胞的代表性图像。使用1SH1-03的WNT激活在第7天产生更大的类器官。图41B显示了在第7天在对照培养基或不同剂量的1SH1-03中扩增的类器官的细胞活力定量。使用1SH1-03显著增加更多的细胞的剂量反应效应。

[0066] 图42显示了在动物中两周全身给药后动物中唾液腺增殖的定量。与对照组和其它时间点相比,L-F12578的施用在第7天具有更多的增殖上皮细胞(Ki67+/ECad+)。溶媒为左,L-F12578在每个时间点都为右。对于每个时间点,左边的柱是溶媒,右边的柱是L-F12578。

[0067] 图43显示了在动物中两周全身给药后动物中唾液腺组织重量的定量。与对照相比,L-F12578的施用显著提高了第7天、第9天、第11天和第14天的器官重量。溶媒为左,L-F12578在每个时间点都为右。对于每个时间点,左边的柱是溶媒,右边的柱是L-F12578。

[0068] 显而易见地,对于本领域的普通技术人员而言,上述附图仅是说明性的,而不是限制本公开的范围。

具体实施方式

I. 定义

[0069] 如本文所用,包括所附权利要求书,单数形式的词语如“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括其相应的复数引用,除非上下文另外清楚地指出。

[0070] 本文引用的所有参考文献通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利申请或专利被具体地和单独地指出通过引用并入本文。

[0071] 分子的“活性”可描述或指分子与配体或受体的结合、催化活性、刺激基因表达的能力、抗原活性、调节其它分子的活性等。分子的“活性”也可指调节或维持细胞与细胞相互作用(例如粘附)的活性,或维持细胞结构(例如细胞膜或细胞骨架)的活性。“活性”也可以意味着特异性活性,例如[催化活性]/[mg蛋白]或[免疫活性]/[mg蛋白]等。

[0072] 本文所用的术语“施用”或“引入”或“提供”是指将组合物递送至细胞、受试者的细胞、组织和/或器官或受试者。这种施用或引入可以在体内、体外或离体进行。

[0073] 如本文所用,术语“抗体”是指分离的或重组的结合剂,其包含特异性结合抗原表位的必需可变区序列。因此,抗体是任何形式的抗体或其片段,其显示所期望的生物活性,例如结合特异性靶抗原。因此,它在最广泛的意义上使用并且具体地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、纳米抗体、双抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,包括但不限于scFv、Fab和Fab2,只要它们表现出期望的生物活性。

[0074] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,例如,完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(例如,Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子(例如,scFv);和由抗体片段形成的

多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单一的抗原结合位点,和残余的“Fc”片段,这是反映容易结晶的能力的名称。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

[0075] 术语“抗原”是指能够被选择性结合剂(例如抗体)结合的分子或分子的一部分,并且另外能够在动物中使用以产生能够与该抗原的表位结合的抗体。在某些实施方案中,当结合剂(例如,WNT替代分子或其结合区,或WNT拮抗剂)优先识别其在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的靶抗原时,其被称为特异性结合抗原。

[0076] 本文所用,术语“抗原结合片段”是指多肽片段,其含有至少一个免疫球蛋白重链和/或轻链的互补决定区(CDR),或VHH/sdAb(单域抗体)或Nanobody®(Nab)的互补决定区,其结合感兴趣的抗原,特别是一种或多种Fzd受体,或LRP5和/或LRP6。在这方面,本文所述抗体的抗原结合片段可包含来自结合一种或多种Fzd受体或LRP5和/或LRP6的抗体的VH和VL的1个、2个、3个、4个、5个或全部6个CDR。

[0077] 如本文所用,术语“生物活性(biological activity)”和“生物活性(biologically active)”是指归因于细胞中特定生物元素的活性。例如,WNT激动剂或其片段或变体的“生物活性”是指模拟或增强WNT信号的能力。作为另一个示例,多肽或其功能片段或变体的生物活性是指多肽或其功能片段或变体进行其天然功能(例如结合、酶活性等)的能力。在一些实施方案中,功能片段或变体保留相应天然蛋白或核酸的至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%或至少100%的活性。作为第三个示例,基因调控元件(例如启动子、增强子、Kozak序列等)的生物活性是指调控元件或其功能片段或变体分别调控,即分别促进、增强或激活翻译其可操作地连接的基因的表达能力。

[0078] 如本文所用,术语“双功能抗体”是指包含对一个抗原位点具有特异性的第一臂和对不同抗原位点具有特异性的第二臂的抗体,即双功能抗体具有双特异性。

[0079] 如本文所用,“双特异性抗体”是指通过四源杂交瘤技术产生的全长抗体(参见Milstein et al.,Nature,305(5934):537-540(1983)),通过化学缀合两种不同的单克隆抗体(参见Staerz et al.,Nature,314(6012):628-631(1985)),或通过杵臼结构(knob-into-hole)或类似方法,其在Fc区中引入突变(参见Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90(14):6444-6448(1993)),产生多种不同的免疫球蛋白种类,其中仅一种是功能性双特异性抗体。双特异性抗体在其两个结合臂之一(一对HC/LC)上结合一种抗原(或表位),并在其第二个臂(一对不同的HC/LC)上结合不同的抗原(或表位)。通过该定义,双特异性抗体具有两个不同的抗原结合臂(在特异性和CDR序列中),并且对于其结合的每个抗原是单价的。

[0080] “包括/包含”意味着在所述要素(例如组合物、方法、试剂盒等)中是必需的,但是在权利要求的范围内可以包括其它要素以形成例如组合物、方法、试剂盒等。例如,“包含”编码与启动子可操作地连接的治疗性多肽的基因的表达盒是可以包含除基因和启动子之外的其它元件,例如聚腺苷酸化序列、增强子元件、其它基因、接头结构域等。

[0081] “基本上由……组成”意味着将所述的(例如,组合物、方法、试剂盒等的)范围限制于不会实质上影响(例如,组合物、方法、试剂盒等的)基本和新颖特征的指定材料或步骤。例如,“基本上由”编码与启动子和聚腺苷酸化序列可操作连接的治疗性多肽的基因“组成”

的表达盒可以包含其它序列(例如,接头序列),只要它们不会实质上影响基因的转录或翻译。作为另一个示例,“基本上由”所述序列“组成”的变体,或突变体、多肽片段具有所述序列的氨基酸序列加上或减去基于其衍生自的全长初始多肽的所述序列的边界处的约10个氨基酸残基,例如比所述边界氨基酸残基少10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个残基,或比所述边界氨基酸残基多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个残基。

[0082] “由……组成”意味着排除权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分的组合、方法或试剂盒。例如,“由”所述序列“组成”的多肽或多肽结构域仅包含所述序列。

[0083] “控制元件”或“控制序列”是参与分子相互作用的核苷酸序列,其有助于多核苷酸的功能调控,包括多核苷酸的复制、重复、转录、剪接、翻译或降解。调控可以影响过程的频率、速度或特异性,并且在性质上可以是增强的或抑制的。本领域已知的控制元件包括,例如,转录调节序列例如启动子和增强子。启动子是能够在特定条件下结合RNA聚合酶并启动通常位于启动子下游(3'方向)的编码区转录的DNA区域。

[0084] “表达载体”是载体(例如,质粒、小环、病毒载体、脂质体等),如本文所讨论的或本领域已知的,其包含编码目的基因产物的区域,并且用于在预期的靶细胞中实现基因产物的表达。表达载体还包含控制元件(例如,启动子、增强子、非翻译区(UTR)、miRNA靶向序列等),可操作地连接到编码区以促进基因产物在靶中的表达。控制元件和它们可操作地连接用于表达的一个或多个基因的组合有时被称为“表达盒”,其中大量是本领域已知的和可获得的,或者可以容易地由本领域可获得的组分构建。

[0085] 如本文所用,术语“FR集”是指编码重链或轻链V区的CDR集的CDR的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可能与结合的抗原接触;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是直接与CDR相邻的FR残基。在FR中,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有的V区序列都含有大约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR显示为形成抗原结合表面的突出环基序。通常认为,存在FR的保守结构区,其影响CDR环折叠成某些“经典”结构,而不管精确的CDR氨基酸序列。此外,已知某些FR残基参与非共价结构域间接触,其稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0086] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指哺乳动物,包括但不限于人和非人灵长类动物,包括猿和人;哺乳动物运动动物(例如,马);哺乳动物农场动物(例如,绵羊、山羊等);哺乳动物宠物(狗、猫等);和啮齿类(例如,小鼠、大鼠等)。

[0087] “人源化”抗体或其片段是指来自非人物种的抗体或其片段,其蛋白序列已经被修饰以增加它们与在人中天然产生的抗体变体的相似性。“人源化”过程通常应用于为施用于人而开发的单克隆抗体。

[0088] “单克隆抗体”是指同质抗体群体,其中单克隆抗体由参与表位选择性结合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)组成。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)、单域抗体(sdAb,也称为纳米抗体)、其变体、包含单克隆抗体的抗原结合片段的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体,和免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型,其包含所需特异性和结合表位的能力的抗原结合片段(表位识别位点),包括本文公开的WNT替代分子。不打算限制抗体的来源或其制备方式(例如,通过杂交

瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上述“抗体”定义下的片段等。

[0089] 如本文所用,术语“天然”或“野生型”是指存在于野生型细胞、组织、器官或生物体中的核苷酸序列,例如,基因,或基因产物,例如,RNA或蛋白质。如本文所用,术语“变体”是指参比多核苷酸或多肽序列(例如天然多核苷酸或多肽序列)的突变体,即与参比多核苷酸或多肽序列具有小于100%的序列同一性。换句话说,变体包含相对于参比多核苷酸序列(例如,天然多核苷酸或多肽序列)的至少一个氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失)。例如,变体可以是与全长天然多核苷酸序列具有50%或更多、60%或更多,或70%或更多序列同一性的多核苷酸,例如,与全长天然多核苷酸序列具有75%或80%或更多,例如85%、90%或95%或更多,例如,98%或99%同一性。作为另一个示例,变体可以是与全长天然多肽序列具有70%或更多序列同一性的多肽,例如,与全长天然多肽序列具有75%或80%或更多同一性,例如85%、90%或95%或更多,例如,98%或99%同一性。变体还可以包括参比序列的变体片段,其与参比序列(例如天然序列)的片段共享70%或更多的序列同一性,例如,与天然序列具有75%或80%或更多,例如85%、90%或95%或更多,例如,98%或99%同一性。

[0090] “可操作地连接(operatively linked)”或“可操作地连接(operably linked)”是指遗传元件的并置,其中元件处于允许它们以预期方式操作的关系。例如,如果启动子有助于启动编码序列的转录,则启动子可操作地连接于编码区。在启动子和编码区之间可能存在插入残基,只要保持这种功能关系即可。

[0091] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸的聚合物。该术语还包括已被修饰的氨基酸聚合物;例如,包括二硫键形成、糖基化、脂质化、磷酸化,或与标记组分缀合。

[0092] 术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸可以包含修饰核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物,并且可以被非核苷酸组分中断。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。如本文所用,术语多核苷酸可互换地指双链和单链分子。除非另有说明或需要,本文所述的本发明的任何实施方案,多核苷酸包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种。

[0093] 多核苷酸或多肽与另一个多核苷酸或多肽具有某种百分比“序列同一性”,这意味着当比对时,当对齐时,当比较两个序列时,这个百分比的碱基或氨基酸是相同的。当在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中使用时,术语“相同的”或“同一性”是指在感兴趣的序列和参比序列中相同的残基的数目或百分比。百分比可以通过将感兴趣的序列与参比序列最优地对齐来计算;在参比序列的整个长度上比较两个序列;确定在两个序列中存在相同氨基酸残基或核酸碱基的位置的数目,以产生匹配位置的数目;将匹配的位置数目除以通过添加在生成对齐时引入到参考序列中的间隙位置数目而调整的参比序列中的位置总数;并且将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。当比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以被认为是相同的。序列“同一性”可以通过使用用于BLAST两个序列(b12seq)的独立可执行BLAST引擎程序来确定,该程序可以从国家生物技术信息中心(NCBI)ftp站点或通过万维网在ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/获取,使用默认参数(Tatusova and Madden,FEMS

Microbiol Lett.,1999,174,247-250;其通过引用整体并入本文)。

[0094] 如本文所用,“启动子”包括指导RNA聚合酶结合从而促进RNA合成的DNA序列,即足以指导转录的最小序列。启动子和相应的蛋白质或多肽表达可以是普遍存在的,意味着在广泛的细胞、组织和物种中,或细胞类型特异性、组织特异性或物种特异性强活性。启动子可以是“组成型的”,是指持续活性的,或“诱导型的”,是指启动子可以通过存在或不存在生物或非生物因子而被激活或失活。本发明的核酸构建体或载体还包含增强子序列,其可以与启动子序列相邻或不相邻。增强子序列影响启动子依赖性基因表达,并且可以位于天然基因的5'或3'区域。

[0095] 用于多核苷酸的“重组”意味着该多核苷酸是克隆、限制或连接步骤的各种组合,以及导致与自然界中发现的多核苷酸不同的构建体的其它方法的产物。

[0096] 如本文所用,“干燥综合征(Sjögren's syndrome)”或“干燥综合征(Sjogren's syndrome)”是影响泪腺和唾液腺的慢性自身免疫疾病,其根据通常的国际诊断标准定义,如Vitali et al (2002) Ann.Rheum.Dis.61:554中所述。干燥综合征是两个主要的水缺乏干眼病亚类之一,不同于非干燥综合征类型。

[0097] 如本文所用,“SWAPTM”(Surrozen WNT信号激活蛋白)是指包含工程化的双特异性全长免疫球蛋白-G(IgG)抗体的WNT模拟物化合物,所述抗体像WNT蛋白一样直接激活靶组织(例如,泪腺组织)中的经典WNT信号传导通路。

[0098] 如本文所用,“SWEETSTM”(经改造用于组织特异性的Surrozen WNT信号增强剂)是指US20200048324中所述的基于抗体的R-脊椎蛋白模拟化合物。

[0099] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treatment)”等通常是指获得所需的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该效果可以是预防性的,例如降低疾病或其症状在受试者中发生的可能性,和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的负面影响而言,可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖哺乳动物中疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制疾病,即阻止或减缓其发展;或(b)缓解疾病,即引起疾病的消退或减轻或者减轻疾病的严重性。治疗剂可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。其中治疗稳定或减轻患者不期望的临床症状的正在进行的疾病的治疗是特别令人感兴趣的。这种治疗理想地在受影响组织中功能完全丧失之前进行。期望在疾病的有症状阶段期间,并且在一些情况下在疾病的有症状阶段之后,对受试者施用治疗。

[0100] 除非另有说明,本发明的实践将采用细胞生物学、分子生物学技术、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述技术在本领域技术人员的范围内。这样的技术在文献中有充分的解释,例如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook et al.,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait,ed.,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney,ed.,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press,Inc.);“Handbook of Experimental Immunology”(D.M.Weir&C.C.Blackwell,eds.);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(J.M.Miller&M.P.Calos,eds.,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel et al.,eds.,1987);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis et al.,eds.,1994);以及“Current Protocols in Immunology”(J.E.Coligan et al.,eds.,1991),其各自明确地以引用的方式并入本文。

[0101] 下面参考用于说明的示例应用来描述本发明的数个方面。应当理解,阐述了许多具体细节、关系和方法以提供对本发明的全面理解。然而,相关领域的普通技术人员将容易认识到,本发明可以在没有个或多个具体细节的情况下或利用其它方法来实施。本发明不受所示的行为或事件的顺序的限制,因为一些行为可以以不同的顺序发生和/或与其它行为或事件同时发生。此外,并非所有示出的行为或事件都是实现根据本发明的方法所必需的。

[0102] 本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而不旨在限制本发明。如本文所用,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”旨在也包括复数形式,除非上下文另外清楚地指示。此外,就在详细描述和/或权利要求书中使用术语“包括(includes)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“具有(with)”或其变体而言,这些术语旨在以类似于术语“包含(comprising)”的方式包括在内。

[0103] 术语“约”或“大致”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受的误差范围内,其将部分地取决于如何测量或确定值,即测量系统的限制。例如,“约”可以是指在本领域习惯的1个或多于1个标准差内。或者,“约”可以是指给定值的至多20%,优选至多10%,更优选至多5%,还更优选至多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程,该术语可以是指在一个数值的一个数量级内,优选在一个数值的5倍内,更优选在一个数值的2倍内。当在申请和权利要求中描述特定值时,除非另有说明,否则应当假定术语“约”是指在该特定值的可接受的误差范围内。

[0104] 本文提及的所有出版物通过引用并入本文以公开和描述与所引用的出版物有关的方法和/或材料。应当理解,本公开在存在矛盾的情况下取代了并入的出版物的任何公开。

[0105] 还应注意的是,权利要求书可以被起草以排除任何可选的元素。因此,该声明旨在用作使用诸如“单独”、“仅”等与权利要求元素的引用有关的排他性术语或使用“否定”限制的前提基础。

[0106] 除非另有说明,本文所用的所有术语具有与本领域技术人员所理解的相同的含义,并且本发明的实践将采用本领域技术人员所知的微生物和重组DNA技术的常规技术。

II. 通用

[0107] 本发明提供了调节WNT信号以治疗泪腺障碍的方法,所述泪腺病症由以下引起,包括但不限于干燥综合征障碍、慢性移植物抗宿主病(cGVHD)、类风湿性关节炎(RA)、斯蒂芬约翰逊综合征、眼红斑痤疮、化疗、放射肿瘤学治疗、糖尿病、酒渣鼻、狼疮等。

[0108] Wnt(“无翅相关整合位点”或“无翅和Int-1”或“无翅-Int”)配体及其信号在许多必需器官和组织的发育、体内平衡和再生的控制中起关键作用,包括骨、肝、皮肤、胃、肠、肾、中枢神经系统、乳腺、味蕾、卵巢、耳蜗、肺和许多其它组织(例如,由Clevers, Loh, and Nusse, 2014; 346:1248012综述)。WNT信号传导通路的调节具有治疗退行性疾病和组织损伤的潜力。

[0109] 调节作为治疗剂的WNT信号传导的挑战之一是存在多种WNT配体和WNT受体——卷曲蛋白1至10(Fzd1至10)——许多组织表达多个和重叠的Fzd。经典WNT信号还涉及作为共受体的低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6),除了Fzd外,它们广泛地在各种组织中表达。R-脊椎蛋白1至4是放大WNT信号的配体

家族。每种R-脊椎蛋白通过受体复合物起作用,所述受体复合物在一端含有锌和环指蛋白3(ZNRF3)或环指蛋白43(RNF43),在另一端含有富含亮氨酸的含有重复的G蛋白偶联受体4至6(LGR4至6)(例如,由Knight&Hankenson 2014,Matrix Biol.;37:157-161综述)。R-脊椎蛋白也可以通过另外的作用机制起作用。ZNRF3和RNF43是特异性靶向WNT受体(Fzd1至10和LRP5或LRP6)用于降解的两种膜结合E3连接酶。R-脊椎蛋白与ZNRF3/RNF43和LGR4至6的结合导致三元复合物的清除或分离,从而从WNT受体中除去E3连接酶并稳定WNT受体,导致增强的WNT信号。每种R-脊椎蛋白含有两个Furin结构域(1和2),Furin结构域1与ZNRF3/RNF43结合,Furin结构域2与LGR4至6结合。含有Furin结构域1和2的R-脊椎蛋白的片段足以扩增WNT信号传导。尽管R-脊椎蛋白作用依赖于WNT信号,由于LGR4至6和ZNRF3/RNF43在各种组织中广泛表达,R-脊椎蛋白的作用不是组织特异性的。

[0110] 通过WNT激动剂激活WNT信号传导可以用于治疗各种泪腺疾病和障碍,包括干眼病。类似地,通过RSP0或RSP0模拟物放大WNT信号传导可以用于治疗各种泪腺疾病和障碍,包括各种干眼和唾液腺疾病。WNT激动剂分子也可以用于治疗干眼和唾液腺障碍。特别地,活跃的WNT信号传导可以提供主要干细胞维持信号,并且在调节腺泡细胞的再生中起关键作用,例如在唾液腺中。

III. 工程化的Wnt激动剂

[0111] 本公开提供了工程化的WNT激动剂并且考虑了使用工程化的WNT激动剂来刺激、激活或促进WNT信号传导,例如通过经典WNT/ β -连环蛋白信号传导通路。这样的工程化的WNT激动剂也可以称为WNT/ β -连环蛋白信号传导激动剂或Wnt模拟物。

[0112] 本公开提供了具有药物样特性的工程化的Wnt模拟物,特别是以重组双特异性抗体的形式,所述抗体将Fzd和Lrp集合在一起以刺激信号传导,模拟内源性Wnt配体。本公开的Wnt模拟物可以自由地扩散、接近受损组织并引导需要Wnt信号的组织修复。本公开还提供了Wnt模拟物,其能够在不与RSP0组合的情况下修复受损的泪腺或唾液腺组织。

[0113] 在一些实施方案中,WNT/ β -连环蛋白信号传导拮抗剂或激动剂可以包括结合剂或表位结合结构域,所述结合剂或表位结合结构域结合一种或多种Fzd受体并抑制或增强WNT信号传导。在某些实施方案中,剂或抗体特异性结合其所结合的人卷曲蛋白受体内的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。此外,还可以使用含有针对LRP的表位结合结构域的拮抗性结合剂。在一些实施方案中,WNT/ β -连环蛋白拮抗剂具有结合剂或表位结合结构域,所述结合剂或表位结合结构域结合E3连接酶ZNRF3/RNF43和一种或多种FZD受体或一种或多种LRP共受体以促进FZD或LRP受体的降解,并且该分子还可以包含结合结构域,所述结合结构域结合用于靶向的细胞类型特异性表位。E3连接酶激动剂抗体或其片段可以是单分子或与其它WNT拮抗剂(例如Fzd受体拮抗剂、LRP受体拮抗剂等)组合。

[0114] 如本领域所熟知的,抗体是免疫球蛋白分子,其能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区上的表位结合结构域与靶(例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)特异性结合。如本文所用,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其含有表位结合结构域(例如,dAb、Fab、Fab'、(F(ab')₂、Fv、单链(scFv)、VHH(即,Nanobodies®)或单域抗体(sdAb)、DVD-Ig(也称为Fv-Ig))的片段、其合成变体、天然存在的变体、包含和表位结合结构域的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体,和包含所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。“双抗体”,通过基因融合构建的

多价或多特异性片段(W094/13804;P.Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448,1993)也是本文考虑的抗体的特定形式。包含与CH3结构域连接的scFv的微抗体也包括在本文中S.Hu et al.,Cancer Res.,56,3055-3061,1996)。参见例如,Ward,E.S.et al.,Nature 341,544-546(1989);Bird et al.,Science,242,423-426,1988;Huston et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85,5879-5883,1988);PCT/US92/09965;W094/13804;P.Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448,1993;Y.Reiter et al.,Nature Biotech,14,1239-1245,1996;S.Hu et al.,Cancer Res.,56,3055-3061,1996;C.Bever et al.,Anal Bioanal Chem.2016Sept;408(22);5985-6002。

[0115] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生几个片段,其中两个(F(ab)片段)各自包括包含完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。根据本公开的某些实施方案使用的Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解切割以及IgG或IgA免疫球蛋白分子的罕见情况来产生。然而,使用本领域已知的重组技术更通常地获得Fv片段。Fv片段包括非共价VH::VL异二聚体,所述异二聚体包含保留天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力的抗原结合位点。Inbar et al. (1972)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69:2659-2662;Hochman et al. (1976)Biochem 15:2706-2710;以及Ehrlich et al. (1980)Biochem19:4091-4096。

[0116] 在某些实施方案中,考虑了单链Fv或scFv抗体。例如,Kappa体(III et al.,Prot.Eng.10:949-57(1997));微抗体(Martin et al.,EMBO J 13:5305-9(1994));双抗体(Holliger et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.90:6444-8(1993));或Janusins(Traunecker et al.,EMBO J 10:3655-59(1991)以及Traunecker et al.,Int.J.Cancer Suppl.7:51-52(1992)),可以根据本申请关于选择具有所需特异性的抗体的教导,使用标准分子生物学技术制备。在还有其它实施方案中,可以制备包括本公开的配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌合抗体可以包含来自不同抗体的CDR和框架区,而双特异性抗体可以通过一个结合域引起特异性结合一个或多个Fzd受体,并通过第二个结合域引起特异性结合第二个分子。这些抗体可以通过重组分子生物学技术产生或者可以物理缀合在一起。

[0117] 单链Fv(scFv)多肽是共价连接的VH:VL异二聚体,其由基因融合表达,所述基因融合包括通过肽编码接头连接的VH编码基因和VL编码基因。Huston et al. (1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85(16):5879-5883。已经描述了许多方法来辨别用于将天然聚集但化学分离的轻链和重链多肽链从抗体V区转化成scFv分子的化学结构,所述scFv分子将折叠成基本上类似于抗原结合位点结构的三维结构。参见,例如,Huston等人的美国专利号5,091,513和5,132,405;以及Ladner等人的美国专利号4,946,778。

[0118] 在某些实施方案中,如本文所述的抗体呈双抗体的形式。双抗体是多肽的多聚体,每个多肽包含第一结构域和第二结构域,所述第一结构域包含免疫球蛋白轻链的结合区,所述第二结构域包含免疫球蛋白重链的结合区,两个结构域连接(例如,通过肽接头)但不能彼此缔合以形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内的一个多肽的第一结构域与多聚体内的另一个多肽的第二结构域的缔合形成(W094/13804)。

[0119] 抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward,E.S.et al.,(1989)Nature 341:544-546)。

[0120] 当要使用双特异性抗体时,这些抗体可以是常规的双特异性抗体,其可以以多种

方式制备 (Holliger, P. & Winter G., Curr. Opin. Biotech. 4, 446-449 (1993)) (例如化学制备的或从杂交瘤制备的), 或可以是上述双特异性抗体片段中的任一种。双抗体和 scFv 可以仅使用可变结构域构建而不包含 Fc 区, 潜在地减少了抗独特型反应的影响。

[0121] 与双特异性完全抗体相反, 双特异性双抗体也可以是特别有用的, 因为它们可以容易地在大肠杆菌中构建和表达。可以使用噬菌体展示 (W094/13804) 从文库中容易地选择具有适当结合特异性的双抗体 (和许多其它多肽, 例如抗体片段)。如果双抗体的一个臂保持恒定 (例如, 具有针对抗原 X 的特异性), 则可以制备文库, 其中另一个臂是变化的, 并且选择具有适当特异性的抗体。双特异性完全抗体可以通过杆臼结构工程制备 (J.B.B. Ridgeway et al., Protein Eng., 9, 616-621 (1996))。

[0122] 在某些实施方案中, 本文所述的抗体可以以 UniBody® 的形式提供。UniBody® 是除去了铰链区的 IgG4 抗体 (参见 GenMab Utrecht, The Netherlands; 还参见, 例如, US2009/0226421)。这种专有的抗体技术产生了稳定的、较小的抗体形式, 与目前的小抗体形式相比, 具有预期的更长的治疗窗口。IgG4 抗体被认为是惰性的, 因此不与免疫系统相互作用。可以通过消除抗体的铰链区来修饰完全人 IgG4 抗体, 以获得相对于相应的完整 IgG4 (Genmab, Utrecht) 具有不同稳定性的半分子片段。将 IgG4 分子减半仅在可与同源抗原 (例如, 疾病靶点) 结合的 UniBody® 上留下一个区域, 因此 UniBody® 仅与靶细胞上的一个位点单价结合。

[0123] 在某些实施方案中, 如本文所述的抗体及其抗原结合片段包括分别插入重链和轻链框架区 (FR) 集之间的重链和轻链 CDR 集, 所述 CDR 集为 CDR 提供支持并限定 CDR 相对于彼此的空间关系。如本文所用, 术语“CDR 集”是指重链或轻链 V 区的三个高变区。从重链或轻链的 N 末端开始, 这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此, 抗原结合位点包括六个 CDR, 其包括来自重链和轻链 V 区中的每一个的 CDR 集。包含单个 CDR (例如, CDR1、CDR2 或 CDR3) 的多肽在本文中称为“分子识别单元”。许多抗原-抗体复合物的结晶学分析已经证明 CDR 的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触, 其中最广泛的抗原接触是与重链 CDR3。因此, 分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0124] 如本文所用, 术语“FR 集”是指编码重链或轻链 V 区的 CDR 集的 CDR 的四个侧翼氨基酸序列。一些 FR 残基可能与结合的抗原接触; 然而, FR 主要负责将 V 区折叠成抗原结合位点, 特别是直接与 CDR 相邻的 FR 残基。在 FR 中, 某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面, 所有的 V 区序列都含有大约 90 个氨基酸残基的内部二硫环。当 V 区折叠成结合位点时, CDR 显示为形成抗原结合表面的突出环基序。通常认为, 存在 FR 的保守结构区, 其影响 CDR 环折叠成某些“经典”结构, 而不管精确的 CDR 氨基酸序列。此外, 已知某些 FR 残基参与非共价结构域间接触, 其稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0125] “单克隆抗体”是指同质抗体群体, 其中单克隆抗体由参与表位选择性结合的氨基酸 (天然存在的和非天然存在的) 组成。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体, 还包括其片段 (例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链 (scFv)、Nanobodies®、其变体、包含单克隆抗体的抗原结合片段的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体, 和免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型, 其包含所需特异性和结合表位的能力的抗原结合片段 (表位识别位点), 包括本文公开的 WNT 替代分子。不打算限制抗体的来源或其制备方式 (例如, 通过杂交瘤、噬菌体选择、重

组表达、转基因动物等)。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上述“抗体”定义下的片段等。

[0126] 在某些实施方案中,本公开的抗体可以采取单域抗体(sdAb)的形式。sdAb技术最初是在发现和识别骆驼科(例如,骆驼、羊驼和美洲驼)具有仅由重链组成并因此缺乏轻链的完全功能抗体之后发展的。这些仅有重链的抗体含有单一可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2、CH3)。克隆和分离的单一可变结构域具有完全抗原结合能力并且非常稳定。这些具有独特结构和功能特性的单一可变结构域形成了sdAb的基础。sdAb由单个基因编码,并且在几乎所有原核和真核宿主(例如,大肠杆菌(参见,例如,美国专利号6,765,087)、霉菌(例如曲霉属或木霉属)和酵母(例如酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属或毕赤酵母属(参见,例如,美国专利号6,838,254))中高效产生。生产过程是可扩展的,并且已经生产了多千克量的sdAb。sdAb可以被配制成具有长保存期的即用型溶液。**Nanoclone®**方法(参见,例如,WO 06/079372)是基于B细胞的自动化的高通量筛选产生针对所需靶的sdAb的专有方法。sdAb是骆驼科动物特异性仅有重链的抗体的单结构域抗原结合片段。sdAb,也称为VHH抗体,通常具有约15kDa的小尺寸。参见C.Bever et al.,*Anal Bioanal Chem.* 2016Sept;408(22);5985-6002。

[0127] 考虑的另一个抗体片段是双可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig或Fv-Ig),是在一个分子实体中结合两种单克隆抗体的功能和特异性的工程化的蛋白。Fv-IgG被设计为IgG样分子,不同之处在于每条轻链和重链含有通过短肽键串联的两个可变结构域,而不是IgG中的一个可变结构域。两个可变结构域的融合方向和接头序列的选择对于分子的功能活性和有效表达是至关重要的。Fv-Ig可以通过常规哺乳动物表达系统作为用于生产和纯化的单一物种产生。Fv-Ig具有亲代抗体的特异性,在体内是稳定的,并表现出IgG样物理化学和药代动力学特性。在Wu,C.,et al.,*Nat Biotech*,25:1290-1297(2007))中描述了Fv-Ig及其制备方法。

[0128] 在某些实施方案中,本文公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。这是指通常使用重组技术制备的嵌合分子,其具有来源于来自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的分子的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可以包含融合到恒定区上的完整可变结构域或仅移植到可变结构域中适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型或通过一个或多个氨基酸取代修饰。这在人个体中消除了作为免疫原的恒定区,但是对外源可变区的免疫应答的可能性仍然存在(LoBuglio,A.F.et al.,(1989)*Proc Natl Acad Sci USA* 86:4220-4224;Queen et al.,*PNAS*(1988)86:10029-10033;Riechmann et al.,*Nature*(1988)332:323-327)。用于本文公开的抗Fzd或LRP抗体的人源化的说明性方法包括在美国专利号7,462,697中描述的方法。

[0129] 另一种方法不仅关注于提供人来源的恒定区,而且还关注于修饰可变区,以便使它们尽可能地与人的形式相接近地重塑。已知重链和轻链的可变区都含有三个互补决定区(CDR),所述互补决定区响应于所讨论的表位而变化并确定结合能力,两侧为四个框架区(FR),所述框架区在给定物种中相对保守并推定为CDR提供支架。当针对特定表位制备非人抗体时,通过将来源于非人抗体的CDR移植到待修饰的人抗体中存在的FR上,可变区可被“重塑”或“人源化”。Sato,K.,et al.,(1993)*Cancer Res* 53:851-856;Riechmann,L.,et al.,(1988)*Nature* 332:323-327;Verhoeyen,M.,et al.,(1988)*Science* 239:1534-1536;Kettleborough,C.A.,et al.,(1991)*Protein Engineering* 4:773-3783;Maeda,H.,et

al., (1991) Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S.D., et al., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:4181-4185; Tempest, P.R., et al., (1991) Bio/Technology 9: 266-271; Co, M.S., et al., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Carter, P., et al., (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289; 以及 Co, M.S. et al., (1992) J Immunol 148:1149-1154 报道了这种方法对各种抗体的应用。在一些实施方案中, 人源化抗体保留所有 CDR 序列 (例如, 含有来自小鼠抗体的所有六个 CDR 的人源化小鼠抗体)。在其它实施方案中, 人源化抗体具有相对于原始抗体改变的一个或多个 CDR (一个、两个、三个、四个、五个、六个), 所述原始抗体也称为“来源于”来自原始抗体的一个或多个 CDR 的一个或多个 CDR。

[0130] 在某些实施方案中, 本公开的抗体可以是嵌合抗体。在这方面, 嵌合抗体包含可操作地连接或以其它方式融合到不同抗体的异源 Fc 部分的抗体的抗原结合片段。在某些实施方案中, 异源 Fc 结构域是人来源的。在其它实施方案中, 异源 Fc 结构域可以来自与亲本抗体不同的 Ig 类别, 包括 IgA (包括 IgA1 和 IgA2 亚型)、IgD、IgE、IgG (包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型) 和 IgM。在进一步的实施方案中, 异源 Fc 结构域可以包含来自一种或多种不同 Ig 类别的 CH2 和 CH3 结构域。如上文关于人源化抗体所述, 嵌合抗体的抗原结合片段可以仅包含本文所述抗体的一个或多个 CDR (例如本文所述抗体的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个 CDR), 或可以包含完整的可变结构域 (VL、VH 或两者)。

[0131] 免疫球蛋白 CDR 和可变结构域的结构和位置的确定可以参考 Kabat, E.A. et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, 1987, 及其更新, 现在可在因特网上获得 (immuno.bme.nwu.edu)。

[0132] 在某些实施方案中, 拮抗剂或激动剂结合剂以约 1 μ M 或更低、约 100 nM 或更低、约 40 nM 或更低、约 20 nM 或更低, 或约 10 nM 或更低的解离常数 (KD) 结合。例如, 在某些实施方案中, 结合多于一种 FZD 的本文所述的 FZD 结合剂或抗体以约 100 nM 或更低、约 20 nM 或更低, 或约 10 nM 或更低的 KD 结合那些 FZD。在某些实施方案中, 结合剂以约 1 μ M 或更低、约 100 nM 或更低、约 40 nM 或更低、约 20 nM 或更低、约 10 nM 或更低、或约 1 nM 或更低的 EC50 结合一种或多种其靶抗原。

[0133] 本发明的抗体或其它剂可以通过本领域已知的任何方法测定特异性结合。可以使用的免疫测定包括但不限于使用例如生物层干涉 (BLI) 分析、FACS 分析、免疫荧光、免疫细胞化学、Western 印迹、放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定, 补体固定测定, 免疫放射测定, 荧光免疫测定和蛋白 A 免疫测定的技术的竞争性和非竞争性测定系统。这样的测定是常规的和本领域熟知的 (参见, 例如, Ausubel et al, eds, 1994, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 其全文以引用的方式整体并入本文)。

[0134] 例如, 抗体与靶抗原的特异性结合可以使用 ELISA 来确定。ELISA 测定包括制备抗原, 用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔, 向孔中加入与可检测化合物 (例如酶底物 (例如, 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)) 缀合的抗体或其它结合剂, 孵育一段时间并检测抗原的存在。在一些实施方案中, 抗体或剂不与可检测化合物缀合, 而是将识别第一抗体或剂的第二缀合抗体添加到孔中。在一些实施方案中, 代替用抗原包被孔, 可以将抗体或剂包被到孔中,

并且可以在将抗原添加到包被的孔中之后添加与可检测化合物缀合的第二抗体。本领域技术人员将了解可以经修改以增加检测到的信号的参数以及本领域已知的ELISA的其它变体(参见例如Ausubel et al, eds, 1994, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 于 11.2.1)。

[0135] 抗体或其它剂与靶抗原的结合亲和力和抗体-抗原相互作用的解离速率可以通过竞争性结合测定来确定。竞争性结合测定的一个示例是放射免疫测定,其包括将标记的抗原(例如,Fzd、LRP)或其片段或变体与感兴趣的抗体在存在增加量的未标记抗原的情况下孵育,随后检测与标记的抗原结合的抗体。抗体的亲和力和结合解离速率可以通过散点图分析从数据确定。在一些实施方案中,BLI分析用于确定抗体或剂的结合速率和解离速率。BLI动力学分析包括分析抗体与芯片的结合和解离,所述芯片在其表面上具有固定的抗原。

IV. Wnt激动剂的用途的方法的组合物

[0136] 本说明书提供了治疗泪腺疾病和障碍的方法,包括但不限于干眼障碍,例如通过泪腺腺泡细胞的激活和/或再生,及该方法的组合物。

[0137] 本领域技术人员容易理解,泪腺与睑板腺和副泪腺是同源的,并且本文所述的方法和组合物可用于治疗水缺乏或蒸发性干眼中的睑板腺和/或副泪腺。睑板腺是排列在眼睑边缘的油腺。这些腺体引起眼睑分泌与天然泪液混合的油,防止天然泪液的过度蒸发。患有眼酒渣鼻的患者经常患有睑板腺功能异常(MGD),其中眼睑分泌较少的油,导致干眼。MGD被认为是干眼病的主要原因。WNT激动剂分子也可以用于治疗睑板腺障碍。特别地,活跃的WNT信号传导可以潜在地向基底祖细胞提供维持信号,并且在调节骨髓细胞的再生中起关键作用(参见,例如,Parfitt et al (2016) Stem Cell Rep. 7:399-410)。在一方面,本发明包括在受试者中再生泪腺腺泡细胞的方法,包括向受试者施用WNT信号传导调节剂。在实施方案中,WNT信号传导调节剂可以是工程化的WNT信号传导调节剂,例如SWAPTM化合物。在另一个实施方案中,WNT信号传导调节剂是工程化的WNT激动剂或工程化的WNT拮抗剂。在又进一步的实施方式中,WNT信号传导调节剂是组织特异性WNT信号增强分子,例如SWEETSTTM分子。WNT信号传导调节剂也可以是WNT激动剂和组织特异性WNT信号增强剂的组合。

[0138] 在本文公开的任何方法的特定的实施方案中,WNT激动剂选自在以下任一项中公开的那些:PCT申请公开号WO 2016/040895;美国申请公开号US2017-0306029;美国申请公开号US2017-0349659;PCT申请公开号WO 2019/126398;PCT申请公开号WO 2020/01030,PCT申请公开号WO 2021/173726或美国申请号17/806,624,其全部内容通过引用整体并入本文。在本文公开的任何方法的特定的实施方案中,组织特异性WNT信号增强分子选自在以下任一项中公开的那些:PCT申请公开号WO 2018/140821;美国申请公开号US2020-0048324;或者PCT申请公开号WO 2020/14271,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0139] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的一个实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体,其直接激活经典WNT信号传导通路。在任意实施方案中,工程化的WNT激动剂可以选自:(i) WNT3a;(ii) WNT模拟物;或(iii) R-脊椎蛋白模拟物。WNT模拟物可以是SWAPTM化合物。R-脊椎蛋白模拟物可以是SWEETSTM化合物。WNT模拟物可以包含一个或多个多肽,所述多肽包含或具有SEQ ID No:1至SEQ ID No 14异构体及其同系物中任一个所示的多肽序列,及其合适的表达载体。WNT模拟物可以包含一个或多个多肽,所述多肽与SEQ ID No 1至SEQ ID No 14中所示的任何多肽序列具有80%至100%的同

源性。在某些实施方案中,WNT模拟物包含两个多肽序列,所述多肽序列与SEQ ID No 1至SEQ ID No 14中所示的任何多肽序列具有80%至100%的同源性。在某些实施方案中,WNT模拟物包含两个重链和两个轻链多肽序列,每个序列与SEQ ID No 1至SEQ ID No 14中所示的任何多肽序列具有80%至100%的同源性。在特定的实施方案中,存在于WNT模拟物中的重链和轻链多肽与以下组合中的任一个具有至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或100%同一性:SEQ ID NO 1和SEQ ID No 2;SEQ ID NO:3和SEQ ID No:4;SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;或SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10,或SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:14,或SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14,或SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14。在特定的实施方案中,WNT模拟物具有包含两条重链和两条轻链的IgG抗体结构,其中两条重链彼此结合,且每条轻链与两条重链中不同的一条结合。

[0140] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8,以及Lrp6和/或Lrp5。例如,WNT信号传导调节剂可以靶向以下任一个或多个:Fzd1、Fzd2和Fzd7;或Fzd5和Fzd8中的任何一个或多个,同时也靶向Lrp6和/或Lrp5。对于另一个示例,WNT信号传导调节剂可以影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2和Fzd7。

[0141] 在再生泪腺腺泡细胞的方法的一个实施方案中,方法进一步包括施用以下至少一步骤:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

[0142] 在一些实施方案中,WNT信号传导调节剂可以是WNT平台的超激动剂。用LRP、FZD和RSP0融合的WNT分子作为WNT信号传导通路的强激活剂观察到这种超激动剂活性。WNT超激动剂选自以下公开的那些:PCT申请公开号WO 2021/173726。

[0143] 在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 $\geq 1\text{nM}$ 。例如,WNT信号传导调节剂的浓度可以是1nM、1.1nM、1.5nM、2.0nM、2.5nM、3.0nM、3.5nM、4.0nM、4.5nM、5.0nM。在某些实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 $\geq 5\text{nM}$ 。在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以以治疗有效量施用。

[0144] 在任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。例如,受试者可以是小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛。在任何实施方案中,受试者可以是人患者。

[0145] 在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以全身或局部施用。例如,WNT信号传导调节剂可以通过水状眼药水溶液或局部泪腺内注射局部施用。

[0146] 在另一方面,本发明包括治疗受试者的泪腺障碍的方法,所述方法包括向受试者施用WNT信号传导调节剂。在实施方案中,WNT信号传导调节剂可以是工程化的WNT信号传导调节剂。在另一个实施方案中,WNT信号传导调节剂是工程化的WNT激动剂或工程化的WNT拮抗剂。

[0147] 在治疗泪腺障碍的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体,所述工程化的双特异性全长IgG抗体直接激活经典WNT信号传导通路。在任何实施方案中,工程化的WNT激动剂可以选自:(i)WNT3a;(ii)WNT模拟物;或(iii)R-脊椎蛋白模拟物。WNT模拟物可以是SWAPTM化合物。R-脊椎蛋白模拟物可以是SWEETSTM化合物。

[0148] 在治疗泪腺障碍的方法的实施方案中,WNT信号传导调节剂可影响以下任一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8,以及Lrp6和/或Lrp5。例如,WNT信号传导调节剂

可以靶向以下任一个或多个:Fzd1、Fzd2和Fzd7;或Fzd5和Fzd8中的任一个或多个,同时也靶向Lrp6和/或Lrp5。对于另一个示例,WNT信号传导调节剂可以影响以下任何一个或多个的表达:Fzd1、Fzd2和Fzd7。

[0149] 在治疗泪腺障碍的方法的一个实施方案中,方法进一步包括施用以下至少一种的步骤:RSP02、RSP02片段和工程化的RSP02模拟物。

[0150] 在治疗泪腺障碍的方法的任何实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 ≥ 1 nM。例如,WNT信号传导调节剂的浓度可以是1nM、1.1nM、1.5nM、2.0nM、2.5nM、3.0nM、3.5nM、4.0nM、4.5nM、5.0nM。在某些实施方案中,WNT信号传导调节剂的浓度可以是 ≥ 5 nM。在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以以治疗有效量施用。

[0151] 在任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。例如,受试者可以是小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛。在任何实施方案中,受试者可以是人患者。

[0152] 在任何实施方案中,WNT信号传导调节剂可以全身或局部施用。例如,WNT信号传导调节剂可以通过水状眼药水溶液或局部泪腺内注射局部施用。

[0153] 在另一方面,本发明包括用于治疗受试者的干眼障碍的组合物,组合物包含WNT信号传导调节剂。在组合物的任何实施方案中,干眼障碍可以是干燥综合征障碍。

[0154] 在组合物的实施方案中,WNT信号传导调节剂可以包含至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体,所述工程化的双特异性全长IgG抗体直接激活经典WNT信号传导通路。至少一种工程化的双特异性全长IgG抗体可以对以下任一个或多个具有特异性:Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8,以及Lrp6或Lrp5。

[0155] 在实施方案中,组合物可以进一步包含至少一种另外的药剂,包括抗炎剂、人工泪液剂或泪腺促分泌素。特别地,抗炎剂可以是抗生素或类固醇,包括环孢菌素A(例如,Restasis®)和立他司特滴眼液(lifitegrast ophthalmic solution)(例如,Xiidra®)。人造泪液剂可以包括模拟泪液的非处方眼药水,例如,羟丙基纤维素(Lacrisert®)插入物。泪腺促分泌素剂可以包括选择性激动烟碱乙酰胆碱受体的伐尼克兰鼻喷雾剂(varenicline nasal spray)。此外,还考虑了自体血清眼药水。

[0156] 在组合物的任何实施方案中,组合物可以包含治疗有效量的每种组分。

[0157] 在组合物的任何实施方案中,受试者可以是活的哺乳动物。例如,受试者可以是小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛。在组合物的任何实施方案中,受试者可以是人患者。

[0158] 在进一步的实施方案中,还公开了包含表达载体(例如,病毒载体)的药物组合物,所述表达载体包含多核苷酸和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂,所述多核苷酸包含本文所述的编码WNT拮抗剂/激动剂分子的核酸序列。在某些实施方案中,编码WNT拮抗剂分子的核酸序列和编码WNT激动剂的核酸序列在同一多核苷酸(例如,表达盒)中。

[0159] 本公开进一步考虑了药物组合物,所述药物组合物包含细胞,所述细胞包含表达载体和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂,所述表达载体包含多核苷酸,所述多核苷酸包含与编码WNT拮抗剂/激动剂分子的核酸可操作地连接的启动子。在特定的实施方案中,药物组合物进一步包含细胞,所述细胞包含表达载体,所述表达载体包含多核苷酸,所述多核苷酸包含与编码WNT拮抗剂和WNT激动剂的核酸序列可操作地连接的启动子。在某些实施方案中,编码WNT拮抗剂分子的核酸序列和编码WNT激动剂分子的核酸序列存在

于相同的多核苷酸(例如,表达盒和/或相同的细胞)中。在特定的实施方案中,细胞是异源细胞或从待治疗的受试者获得的自体细胞。

[0160] 在特定的实施方案中,细胞是干细胞,例如,脂肪来源的干细胞或造血干细胞。本公开考虑了药物组合物,所述药物组合物包含用于递送作为第一活性剂的WNT拮抗剂分子的第一分子和作为第二分子的WNT激动剂。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施方案中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、小有机分子、编码第一活性剂或第二活性剂的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,修饰RNA)、包含编码第一活性剂或第二活性剂的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体),和包含编码第一活性剂或第二活性剂的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0161] 主题分子可以单独或组合地与可以用于制备制剂的药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和试剂组合,所述制剂通常是安全的、无毒的和合乎需要的,并且包括可以用于哺乳动物(例如,人或灵长类)使用的赋形剂。这样的赋形剂可以是固体、液体、半固体,或者在气溶胶组合物的情况下,可以是气态的。这样的载体、稀释剂和赋形剂的示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充的活性化合物也可掺入制剂中。用于制剂的溶液或悬浮液可以包括无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌化合物,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;洗涤剂,例如Tween 20,以防止聚集;以及用于调节张力的化合物,例如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH。在特定的实施方案中,药物组合物是无菌的。

[0162] 药物组合物可以进一步包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些情况下,组合物是无菌的并且应该是流体,使得它可以被吸入注射器或从注射器递送至受试者。在某些实施方案中,组合物在制造和储存条件下是稳定的,并且被保存以防微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是例如溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,通过使用包被(例如卵磷脂),通过在分散的情况下维持所需的颗粒尺寸以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等),可以实现对微生物作用的预防。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如,糖、多元醇(例如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的剂(例如,单硬脂酸铝和明胶),可以实现内服组合物的延长吸收。

[0163] 无菌溶液的制备可以通过将所需量的WNT拮抗剂/激动剂抗体或其抗原结合片段(或编码包含所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸或细胞)掺入适当的溶剂,根据需要加入上述列举的成分中的一种或组合,然后过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其它成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上任何额外的来自其先前无菌过滤的溶液的所需成分的粉末。

[0164] 在一个实施方案中,药物组合物用载体制备,所述载体将保护抗体或其抗原结合片段免于从体内快速清除,例如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐,聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。这些材料也可以商业获得。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备。

[0165] 将药物组合物配制成剂量单位形式可能是有利的,以便于施用和剂量的均一性。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性抗体或其抗原结合片段,经计算可产生所需的治疗效果以及所需的药物载体。剂量单位形式的规格取决于和直接依赖于抗体或其抗原结合片段的独特特征和待实现的特定治疗效果以及在配制用于治疗个体的这样的活性抗体或其抗原结合片段的领域中固有的限制。

[0166] 药物组合物可以包含在容器、包装或分配器(例如眼滴管,例如预填充的眼滴管)中,以及施用说明书。

[0167] 本公开的药物组合物可以以药片、胶囊、乳膏、软膏、糖浆、皮肤贴片、栓剂、静脉滴注、局部注射水溶液、非水溶液、洗眼液或其任何组合的形式递送至受试者。

[0168] 本公开的药物组合物可通过直接眼科应用、肌肉注射、泪腺内注射、结膜下注射、睑板腺注射、静脉内注射、腹膜注射、经鼻、经口、经直肠或其任何组合递送至受试者。

[0169] 本公开的药物组合物包括任何药学上可接受的盐、酯或这样的酯的盐,或任何其它化合物,所述化合物在施用于包括人的动物时能够(直接或间接)提供生物活性抗体或其抗原结合片段。

[0170] 本公开包括本文所述的WNT拮抗剂/激动剂分子的药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指本公开的化合物的生理学上和药学上可接受的盐:即,保留母体化合物的期望的生物活性并且不赋予其不期望的毒理学效应的盐。各种药学上可接受的盐是本领域已知的,并且描述于例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (及其更新版)、“Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, 以及 J. Pharm. Sci. 66:2 (1977)。此外,对于合适的盐的综述,参见 Stahl 和 Wermuth 的“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” (Wiley-VCH, 2002)。药学上可接受的碱加成盐是与金属或胺(例如碱金属和碱土金属或有机胺)形成的。

[0171] 用作阳离子的金属包括钠、钾、镁、钙等。胺包括 N-N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺和普鲁卡因(参见,例如, Berge et al., “Pharmaceutical Salts,” J. Pharma Sci., 1977, 66, 119)。所述酸性化合物的碱加成盐通过使游离酸形式与足够量的所需碱接触以常规方式产生盐来制备。游离酸形式可通过使盐形式与酸接触并以常规方式分离游离酸来再生。游离酸形式与它们各自的盐形式在某些物理性质(例如在极性溶剂中的溶解度)方面有些不同,但除此之外出于本公开的目的,盐等同于它们各自的游离酸。

[0172] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含治疗有效量的WNT拮抗剂/激动剂

分子或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂,例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂和/或其它蛋白质。示例性的氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露糖醇、右旋糖酐、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、醋酸盐、林格氏和Hank溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,该制剂在4℃下稳定至少6个月。

[0173] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和普通技术人员已知的其它缓冲液,例如Good et al. (1966) *Biochemistry* 5:467描述的那些。缓冲液的pH的范围可以为6.5至7.75,优选7至7.5,最优选7.2至7.4。

[0174] 从上文可以理解,尽管出于说明的目的本文描述了本公开的具体实施例,但是可以在不脱离本公开的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,除了所附权利要求之外,本公开不受限制。

[0175] 参考以下实施例可以最好地理解本发明的广泛范围,所述实施例不是要将本发明限制于具体实施方案。

实施例

I. 方法。

[0176] 使用分子生物学中的标准方法,包括在以下中描述的方法:例如,Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif. 标准方法也出现在Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y. 中,其描述了在细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷),在哺乳动物细胞和酵母中克隆(第2卷),糖缀合物和蛋白质表达(第3卷),以及生物信息学(第4卷)。

[0177] 用于蛋白质纯化的方法包括免疫沉淀、色谱法、电泳、离心和结晶,描述于例如Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. 化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生、蛋白质的糖基化描述于例如Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, N.Y., pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, Mo.; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391. 多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和断裂描述于例如Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane, 同上。用于表征配体/受体相互作用的标准技术可获得于例如Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley,

Inc., New York。

[0178] 用于流式细胞术的方法,包括荧光活化细胞分选检测系统(**FACS®**),可获得于例如 Owens et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, N.J.; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.。适用于修饰核酸的荧光试剂(包括核酸引物和探针)、多肽和抗体,例如用作诊断试剂,可获得于例如 Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, Mo.。

[0179] 免疫系统组织学的标准方法描述于例如 Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, N.Y.; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, Pa.; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, N.Y.。

[0180] 用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库可获得于例如 GenBank, Vector **NTI®** Suite (Informax, Inc., Bethesda, Md.); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, Calif.); **DeCypher®** (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nev.); Menne et al. (2000) *Bioinformatics* 16:741-742; Menne et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690。

II. 类器官的建立和扩增。

[0181] 将来自野生型 C57BL/6 小鼠的泪腺和唾液腺解剖并储存在冰上的 Advanced DMEM/F12 (GIBCO) 中。将多个小鼠泪腺或唾液腺合并并在陪替氏 (petri) 培养皿中,并尽可能多地取出和丢弃肌肉、导管和结缔组织。使用手术刀将剩余的腺上皮切成大约 1mm 的碎块。将组织块在含有 10 μ M ROCK 抑制剂 Y-27632 (Abmole, M1817) 的胶原酶 (Sigma-Aldrich, C9407, 1mg/mL) 溶液中进行消化,在 37 $^{\circ}$ C 下振荡约 15 分钟。将均匀的细胞悬浮液沉淀 (1200rpm, 5 分钟),并在铺板前用 Advanced DMEM/F12 洗涤两次。将相同的方案应用于人死后泪腺材料。将细胞铺板在 20 μ L 的 Cultrex Pathclean 还原生长因子基底膜提取物 (BME) (3533-001, Amsbio) 或 MatrigelTM GFR 膜基质 (Corning CB40230C) 的液滴中。15 分钟固化后,加入含有各种哺乳动物生长因子和细胞因子、RSP01 和替代 WNT (L-F12578; L-F127; L-F58; L-F4; 或 5nM 的 L-F10)。如图 1 所示,用 L-F12578, L-F127 或 L-F58 处理的细胞以实体出芽形态快速扩增,而用对照和其它替代 WNT 处理的细胞几乎没有生长或具有导管形态(参见,例如, Bannier-Helaouet, et al. (2021) *Cell Stem Cell* 28:1221-1232)。

III. 腺泡细胞中的替代 WNT 筛选。

[0182] 对于替代 WNT (即, WNT 模拟物) 的生长活性筛选,使用 TrypLE (Thermo Fisher) 在 37 $^{\circ}$ C 下将小鼠泪腺或唾液腺原代细胞或类器官细胞 (<5 传代) 消化成接近单细胞的悬浮液 10 分钟。用于活性测定的基础培养基由不含 RSP01 或任何替代 WNT 且补充有 1 μ M porcupine 抑制剂 Wnt-C59 (#5148Tocris) 和 10 μ M Y-27632 (#5092280001 MilliporeSigma) 的膨胀培养基组成。除非另有说明,实验条件由 500ng/mL 重组 RSP01 和 5nM 替代 WNT (L-F12578、L-F127、L-

F58、L-F4或L-F10)中的一种或组合组成。将所有条件下的所有细胞铺在96孔板中的15 μ L Matrigel液滴中,并浸没在圆底96孔板中的120 μ L实验培养基中。在定量之前,细胞作为类器官生长7天。使用细胞活力测定CellTiter-Glo® (G9683 Promega),在SpectraMax Paradigm微孔板检测仪(Molecular Devices)上根据制造方案测量,定量生长效率,并且结果示于图4和图5中。对于RSP0依赖性测定,在含有或不含有500ng/mL RSP01的替代WNT (0.05nM、0.5nM、5nM、50nM)的剂量范围内培养类器官,且结果示于图6中。

[0183] 对于在替代WNT刺激时的WNT靶基因表达筛选,在撤除RSP01、替代WNT和加入1 μ M porcupine抑制剂Wnt-C59(#5148Tocris)48小时之前,小鼠腺泡细胞类器官在完全扩增天中生长5天,如图7所示。在WNT撤除期后,将RSP01和/或5nM替代WNT (L-F12578、L-F127、L-F58、L-F4或L-F10)重新引指定的时间以评估WNT靶基因诱导,如图8所示。根据制造商的方案,使用QIAprep miniprep试剂盒(#27104QIAGEN)提取RNA。根据制造商的方案,使用SYBR Green(#K0243 Thermo Scientific)通过qPCR测定Axin2的表达,且结果示于图9中。

[0184] 在完全扩增培养基中,在来源于新鲜人泪腺组织(如图10所示)的人泪腺外植体培养物中,在替代WNT筛选中进行人AXIN2诱导。如上所述将细胞铺在Matrigel中(参见图11A至图11B),并暴露于不同的替代WNT (L-F12578、L-F127、L-F58、L-F4,或L-F10)与RSP01的组合。暴露24小时后,使用QIAGEN miniprep试剂盒根据制造商的方案提取RNA。使用SYBR Green(Thermo Fisher)根据制造商的方案通过qPCR测定AXIN2的表达(引物序列下文提供),且结果示于图12中。

IV. 免疫荧光染色和原位杂交。

[0185] 在细胞回收溶液(354253,Corning)中收集类器官并在4%甲醛(R37814 Sigma-Aldrich)中在室温下固定至少2小时,并使用0.2% Triton X-100在PBS(#ICN19485450 Fisher Scientific)中透化。使用兔抗MIST1(#14896CST)和DAPI(#EN62248 Fisher Scientific)在2%驴血清中进行整体标本染色过夜,二抗是Alexa Fluor 568驴抗兔IgG (Life Technologies,A10042)。类器官在Leica THUNDER成像系统上成像(图2)。在石蜡包埋的组织切片上进行小鼠泪腺的免疫荧光染色。简言之,将切片脱蜡、加热抗原修复、透化、封闭并染色Ki67(#ab15580Abcam)和DAPI(#EN62248 Fisher Scientific)。使用二抗Alexa Fluor 568驴抗兔IgG(Life Technologies,A10042)进行二级染色,并在Leica DM18系统上进行成像(图15)。根据制造方案(ACDBio)施用用于指示的WNT受体的人或小鼠特异性探针进行原位杂交,并在Leica DM18系统上成像。结果示于图13至图14中。

V. 动物和处理。

[0186] 在第0天、第3天、第7天和第10天以10mpk向雌性C57BL/6小鼠(8至10周龄)腹膜内给药各种Wnt模拟物。在第14天,通过Ki67信号在L-F12578、L-F127和L-F58处理组中检测增殖细胞(图15)。与对照和单独的RSP0相比,用WNT模拟物与RSP0联合给药的类似时间导致L-F12578和L-F127处理组在两周后泪腺重量增加(图16)。

[0187] 雌性C57BL/6小鼠(8至10周龄)购自Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME)。根据IACUC委员会的规定进行所有动物程序。将小鼠麻醉,并且左眼眶外泪腺未经处理,而右泪腺注射IL-1 α 或IL-1 α 和SWAP™的混合物(即,WNT模拟物),如图17所示。

[0188] 除了Surrozen, Inc的实验动物管理和使用委员会(IACUC)的指导和批准之外,所有动物实验根据国家伦理准则进行。12周龄MRL-1pr(储存000485)雌性小鼠获自Jackson

Laboratories (Bar Harbor, ME, 美国), 每笼饲养4只。在C57B1/6J小鼠和MRL-1pr以及MRL/MpJ小鼠中, 在第0天、第3天、第7天和第10天分别腹膜内给药3mg/kg和10mg/kg的蛋白质处理。在C57B1/6J小鼠中, 在第0天、第3天、第7天和第10天腹膜内给药0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg和3mg/kg的RSP02-nFcFc处理。在第0天、第7天和第13天使用Faxitron UltraFocus (Faxitron Bioptics, 图森, 亚利桑那) 通过体内DEXA方法测量动物的骨矿物质密度 (BMD) 和脂肪含量。通过异氟烷在成像期间麻醉动物, 并且由于颅骨的放射照相术强度增加, 样品ROI包括除颈椎上方的材料之外的整个小鼠骨骼。使用附随的Vision DXA软件计算BMD和脂肪含量。在第14天终止动物, 收集唾液腺用于组织学。

VI. 泪腺内注射。

[0189] 如前所述进行泪腺内注射, 与Zoukhri et al. A Single Injection of Interleukin-1 Induces a Reversible Aqueous-tear Deficiency, Lacrimal Gland Inflammation, and Acinar and Ductal Cell Proliferation, 84EXP. EYE RES. 894-904 (2007) 有微小改变。简言之, 在异氟醚麻醉的动物耳前做一个小切口以暴露眼眶外泪腺。将1 μ L的体积注射到暴露的泪腺3次 (3 μ L的总体积)。

[0190] 改编自Liu et al. 2017, 建立了用于泪腺管结扎的下列方法。用异氟烷麻醉动物。在小鼠不再对两个不同身体象限中的两个四肢上的夹钳作出反应之后, 将其移动到解剖镜的台, 并用制作鼻锥罩以通过异氟醚继续麻醉。在耳前做一个小切口以暴露眼眶外泪腺, 所述泪腺被抬起以暴露主排泄导管。然后使用尺寸为4至0的棉线结扎导管。在导管结扎后, 闭合皮肤切口, 缝合, 然后将抗生素软膏施加于皮肤。对侧泪腺是不手术的, 而是作为对照。三天后, 重新打开皮肤缝线以暴露泪腺。然后通过用微型剪刀切割丝线缝线而释放导管结扎。在同一手术中, 处理组在结扎的同侧泪腺中注射2mL测试物。注射后, 闭合皮肤切口, 缝合, 然后施加抗生素软膏。释放结扎后24h、3天或14天后处死动物, 并收集同侧和对侧泪腺。

VII. 干眼的诱导和SWAP™处理。

[0191] 为了诱导干眼, 将3 μ L的2 μ g/ μ L的重组人IL-1 α (Peprotech) 注射到泪腺中。对于局部SWAP™处理, 将SWAP™ (3.5 μ g/ μ L) 与IL-1 α (2 μ g/ μ L) 混合, 总体积为3 μ L, 然后注射到泪腺中。对于全身性SWAP™处理, SWAP™以10mg/kg每周两次腹膜内注射2周, 如图19至图20所示。

VIII. 水性泪液分泌的测量。

[0192] 使用苯酚浸渍的棉线 (Zone-Quick, Menicon) 在限制的未麻醉的小鼠上测量水性泪液分泌。用镊子夹住棉线, 并将其施加到两只眼睛的外侧上30秒。与泪液接触后从黄色变为红色的棉线的湿润程度以毫米为单位进行测量, 且结果示于图19中。

IX. Wnt模拟物分子诱导唾液腺肥大。

[0193] 检查了全身WNT模拟物施用对体内唾液腺重量和组织学的影响。与溶媒组相比, L-F12578、L-F127、L-F4和L-F10在第14天给药组的唾液腺重量分别显著增加101% ($P < 0.001$)、114% ($P < 0.001$)、29% ($P < 0.01$) 和22% ($P < 0.05$)。L-F12578和L-F127的作用是最显著的 (图22)。没有靶向不同FZD受体的WNT模拟物分子在体内通过H&E染色对颌下腺的组织学具有任何可观察到的影响 (图23的A列)。通过Ki67对增殖细胞的染色在处理组之间显示出很小的差异, 表明细胞分裂的潜在早期峰值推动器官重量的差异 (图23的B列)。给药相同分子但10mpk (持续14天, 两周全身治疗) 的动物确实具有清楚的组织病理学表型。由独立的病理学家测定, L-F12578和L-F127处理的动物在血清粘液腺腺泡中显示出染色的差异, 且

细胞质嗜碱性细胞数量的增加(图24A)。通过Image J自动定量唾液腺的粘液的和浆液的部分显示在L-F12578和L-127处理的动物中粘液腺泡面积显著减少(图24B)。而且,全身RSP02施用在唾液腺中引起肥大反应。在RSP02-nFc剂量范围的两周治疗中,1mpk和3mpk剂量在第14天显著增加唾液腺重量(图25)。

[0194] 为了理解WNT激活对唾液腺细胞的影响,小鼠唾液腺类器官作为实验平台(参见,例如,Maimets et al. (2016) *Stem Cell* 6:150-162)。与单独的RSP01相比,用L-F12578 (5nM) 与重组RSP01联合处理增加了增殖,导致较大的类器官的快速扩增(图26A)。这种促增殖表型的FZD特异性由WNT模拟物在生长测定中检验,并将其与抗GFP抗体比较。在剂量依赖性方式中,L-F12578和L-F127显著增加了在第10天作为细胞活力测量的生长效率,并且在高浓度下观察到L-F58的适度效应(图26B)。显示Fzd7、Fzd1和Fzd2在小鼠唾液腺类器官中表达最高的卷曲蛋白,这与对唾液腺的体外和体内作用一致(图27)。

[0195] 干燥综合征是特别影响外分泌腺(例如唾液腺)的全身性自身免疫性疾病。伴随免疫细胞浸润的腺体中的慢性炎症导致腺泡细胞萎缩,导致口腔干燥(参见,例如,Jensen and Vissink(2014) *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 26:35-53)。MRL-lpr小鼠品系(也称为狼疮小鼠)在表现出具有类似人中干燥综合征中唾液腺异常的全身性自身免疫,例如唾液产生减少和淋巴细胞浸润(参见,例如,Ma et al. (2014) *Diag. Pathol.* 9:5)。为了测试L-F12578 WNT模拟物在持续存在的损伤环境中是否能够增加和恢复唾液腺重量,对老年狼疮和MRL/MpJ对照小鼠给药两周。用L-F12578处理显著增加了两个遗传品系中的唾液腺重量,而对组织学没有任何可观察到的副作用(图28A和图28B)。狼疮小鼠和对照品系在用L-F12578处理时都表现出潮湿毛皮,并具有轻微的颜色变化。

X. 试剂和材料。

[0196] Wnt模拟物如WO 2020/010308A1中所述构建,在此整体并入本文。除非另有说明,否则所有重组蛋白均通过瞬时转染在Expi293FTM细胞(Thermo Fisher Scientific)中产生。所有基于IgG和含有Fc的构建体首先用蛋白A树脂纯化并用pH 3.5 0.1M甘氨酸洗脱。然后通过尺寸排阻柱在HBS缓冲液(10mM HEPES pH 7.2,150mM NaCl)中抛光所有蛋白质。将蛋白质补充甘油至10%,用于在-80°C长期储存。

[0197] 用于泪腺再生实验的试剂包括(但不限于):

试剂列表	
成分	目录编号
Advanced DMEM/F-12	Thermo Scientific 12634-010
HEPES	Thermo Scientific 15630080
GlutaMAX	Thermo Scientific 35050061
青霉素-链霉素	Thermo Scientific 15140122
B27	Thermo Scientific 17504044
N2	Thermo Scientific 17502048
人生长因子	Peptrotech
重组人 R-脊椎蛋白 1	R&D 4645RS
替代 WNT	In-house production
Matrigel™ GFR 膜基质	Corning CB40230C
Y-27632	MilliporeSigma 5092280001

[0198] 实验中使用的引物包括：

引物名称	引物序列	SEQ ID No.
小鼠正向 <i>Axin2</i>	CAGCCCAAGAACCGGGAAAT	17
小鼠反向 <i>Axin2</i>	GAGCCTCCTCTCTTTTACAGCA	18
小鼠正向 <i>Actb</i>	ACCTTCTACAATGAGCTGCGT	19
小鼠反向 <i>Actb</i>	AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	20
小鼠正向 <i>Rnf43</i>	CGGAGCCGTACTGGGTAAAG	21
小鼠反向 <i>Rnf43</i>	GGCACGGGGATGAAACAAAT	22
小鼠正向 <i>Mist1</i>	CCAAGATCGAGACCCTCACG	23
小鼠反向 <i>Mist1</i>	GCGGCTGCTGGACATAGTAA	24
小鼠正向 <i>Krt7</i>	GCGGAGATGAACCGCTCTAT	25
小鼠反向 <i>Krt7</i>	TCTAACTTGGCACGCTGGTT	26
人正向 <i>AXIN2</i>	TCATTTCCTGAGAACCCACC	27
人反向 <i>AXIN2</i>	AGCTTCAGCTTTTCCAGCCT	28

人正向 <i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	29
人反向 <i>ACTB</i>	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	30
小鼠正向 Fzd1	CATCGAGGCCAACTCACAGT	31
小鼠反向 Fzd1	TGAGCCCCACAAAACACACT	32
小鼠正向 Fzd2	AGCGATTTCGCTACCCAGAG	33
小鼠反向 Fzd2	AGAACGAAGCCCGCAATGTA	34
小鼠正向 Fzd3	GCCCTTTGTGAGACCAGGTT	35
小鼠反向 Fzd3	ATATGCCTGCAGGTCTCAGC	36
小鼠正向 Fzd4	CCTGAGCGCCCCATCATATT	37
小鼠反向 Fzd4	CTTTCCCGGCCTACAGTCAG	38
小鼠正向 Fzd5	CCGCCACAGGTACCTAGCTT	39
小鼠反向 Fzd5	AAGGACAGAACTCTCGGAGGA	40
小鼠正向 Fzd6	CCCGAGGTGAGGCGTCC	41
小鼠反向 Fzd6	TGAATTCTGGGGCAACTGCT	42
小鼠正向 Fzd7	ATGCTCTATGTACGCACCCG	43
小鼠反向 Fzd7	CGAACTTGTTTCATGAGCGCC	44
小鼠正向 Fzd8	TGTTGGAAGTGACCTCGCTC	45
小鼠反向 Fzd8	AACCGATGCCTTTGCACAAC	46
小鼠正向 Fzd9	TAAGGACTTCGCGCTGGTTT	47
小鼠反向 Fzd9	AAGATAATCGGGCGCTCTGG	48
小鼠正向 Fzd10	CCTTCCTCATCGACCCATCG	49
小鼠反向 Fzd10	TAGCCCACCGAATAAACGCA	50
小鼠正向 Lrp5	CCATTGTGTTGCACCCTGTG	51
小鼠反向 Lrp5	CAGGACATGCCGATCTCTCC	52
小鼠正向 Lrp6	TGCAAACAGACGGGACTTGA	53
小鼠反向 Lrp6	CCAAACACAAAGTCCACCGC	54

[0199] 实验中使用的Wnt模拟物构建体包含以下氨基酸序列(粗体=LRP结合可变结构域;下划线=接头;斜体=FZD结合可变结构域;简单(非粗体、非下划线和非斜体)=Fc结构域)。

L- F12578 (Fv-IgG)	重链 SEQ ID: 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS <i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLWVRQ APGKGLEWVSVISGDGSYTTYADSVKGRFTISSDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i> 轻链 SEQ ID: 2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKG <u>GGGSGGGGSGGGGS</u><i>DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGD NIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</i>
--------------------------	--

L-F127 (Fv-Ig)	重链 SEQ ID: 3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS <i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSSYIHWVRQA PGKGLEWVAIYSSYGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARASWYALDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i> 轻链 SEQ ID: 4 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGGTKVEIKG <u>GGGSGGGGSGGGGS</u><i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSVSSAWAYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWGVPITFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
-------------------	--

L-F58 (Fv-IgG)	重链 SEQ ID: 5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGQGTLVTVSS<u>GGGGSGGGGSGGGGS</u> <i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSYIHWVRQA PGKGLEWVASIYSSSGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARGAIDYWGQGTLVTVSS</i>ASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 轻链 SEQ ID: 6 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG<u>GTKVEIKG</u> <u>GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA</u> <i>SQSVSSAWAYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWYSSGHVLITFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</i>DSTYLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
-------------------	--

L-F4 (Fv-IgG)	重链 SEQ ID: 7 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS <i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYYYIHWVRQA PGKGLEWVASIYPSSGYTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARSSFYWAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i> 轻链 SEQ ID: 8 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGGTKVEIKG <i>GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRA SQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYAAYLFTFGQGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
------------------	--

L-F10 (Fv-IgG)	重链 SEQ ID: 9 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS <i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFNMFWRQ APGKGLEWVAGIDDDGSYPNYGSAVKGRATISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGYGGSWGGYIADDIDAWG QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK</i> 轻链 SEQ ID: 10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKG <u>GGGSGGGGSGGGGSEL</u><i>TQPPSVSVSPGQTARITCSGDG SYAGSYYYGWYQQKPGQAPVTLIYYNNKRPSGIPERFSGS LSGSTNTLTISGVQAEDEADYYCGSADNSGAAFGGGTKL TVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL</i>
-------------------	---

	TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
1SH1-03	轻链 SEQ ID: 11 DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGW YRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTM STESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDD YVYRGQGTQVTVSSGGSGSDVVMTQSPLSLPVTGP <i>EPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSK</i> <i>RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL</i> <i>QIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS</i> <i>VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</i> <i>DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</i> <i>PVTKSFNRGEC</i>
1SH1-26	轻链 SEQ ID: 12 DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIA WYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTIS RNNAMKTVYLMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGS RDEYWGQGTQVTVSSGGSGSDVVMTQSPLSLPVTGP <i>EPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSK</i> <i>KRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQA</i> <i>LQIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS</i> <i>VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</i> <i>DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</i> <i>PVTKSFNRGEC</i>
1SH1-36	轻链 SEQ ID: 13 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMG WFRQAPGKEREFVSGIRWSSGGTSYADSVKGRFTIS KDNAKNTIYLMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQ GTLVTVSSGGSGSDVVMTQSPLSLPVTGP <i>EPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSK</i> <i>RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL</i> <i>QIPPTFG</i>

	<i>QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</i>
1SH1-03 重链 SEQ ID: 14 1SH1-26 1SH1-36	<i>EVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIR QHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLNSVTAADTAVYYCARHAGFYGLADYFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
L-F49	轻链 SEQ ID: 15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR <u>GGGGSGGGGSGGGG</u>SDIQMTQSPSSPSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC 重链 SEQ ID: 16

	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIISW VRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLH PRGSVMDYWGQGTTLVTVSS<u>GGGGSGGGGSGGGGSE</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGWINAGNGNTTYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARHYGSG SYPDWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
--	---

[0200] 本领域技术人员容易理解,上述构建体可以改变并表达为各种同系物和异构体,可以在非结合结构域序列上编辑,并且可以使用各种合适的表达载体系统使用各种同义核苷酸序列表达。

参考文献

以下参考文献通过引用整体并入本文:

Marie Bannier-**Hélaouët** et al.,Exploring the human lacrimal gland using organoids and single-cell sequencing,Cell Stem Cell(2021);

Liana Basova et al.,Origin and Lineage Plasticity of Endogenous Lacrimal Gland Epithelial Stem/Progenitor Cells,Iscience 23.6(2020):101230;

Darlene A.Dartt,Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion:A review,8Current Eye Res.619(1989);

Charlotte H.Dean et al.,Canonical Wnt signaling negatively regulates branching morphogenesis of the lung and lacrimal gland,286Developmental Bio.270(2005);

T Farmer D’Juan et al.,Defining epithelial cell dynamics and lineage relationships in the developing lacrimal gland,Development 144.13(2017):2517-28;

Galina Dvorianchikova et al.,Molecular Profiling of the Developing Lacrimal Gland Reveals Putative Role of Notch Signaling in Branching Morphogenesis,58Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.1098(2017);

Ankur Garg&Xin Zhang,Lacrimal Gland Development:From Signaling Interactions to Regenerative Medicine,246Developmental Dynamics 970(2017);

Hodges,Robin R.,and Darlene A.Dartt."Regulatory pathways in lacrimal gland epithelium."International review of cytology 231(2003):129-196;

John A.MacMillan,Diseases of the Lacrimal Gland and Ocular Complications,138JAMA 801(1948);Shubha Tiwari,Human lacrimal gland regeneration:Perspective and review of literature,28Saudi J.Ophthalmol.12(2014);

Yupeng Yao&Yan Zhang,The lacrimal gland:development,wound repair and regeneration,39Biotech.Letters 939(2017);

Driss Zoukhri et al.A Single Injection of Interleukin-1 Induces a Reversible Aqueous-tear Deficiency,Lacrimal Gland Inflammation,and Acinar and Ductal Cell Proliferation,84 Exp.Eye Res.894-904(2007);

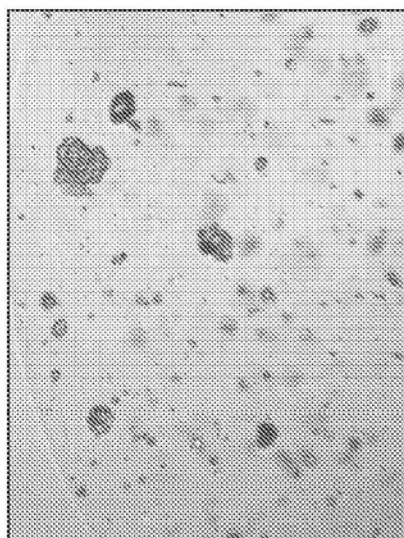
Darlene A.Dartt,Ocular Disease:Mechanisms and Management 105-13 (Leonard A.Levin&Daniel M.Albert eds.,2010);

Liu,Y.,Hirayama,M.,Kawakita,T.and Tsubota,K.,2017.A ligation of the lacrimal excretory duct in mouse induces lacrimal gland inflammation with proliferative cells.Stem Cells International,2017.;

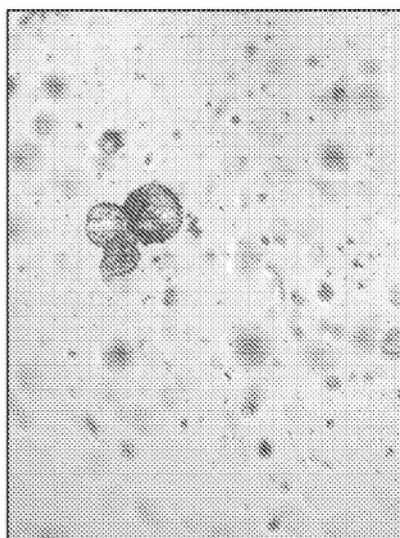
Zhang,Z.,Broderick,C.,Nishimoto,M.,Yamaguchi,T.,Lee,S.J.,Zhang,H.,Chen,H.,Patel,M.,Ye,J.,Ponce,A.,et al.(2020).Tissue-targeted R-spondin mimetics for liver regeneration.Sci Rep 10,13951;

Xie,Y.,Zamponi,R.,Charlat,O.,Ramones,M.,Swalley,S.,Jiang,X.,Rivera,D.,Tschantz,W.,Lu,B.,Quinn,L.,et al.(2013).Interaction with both ZNRF3 and LGR4 is required for the signalling activity of R-spondin.EMBO Rep 14,1120-1126.10.1038/embor.2013.167.

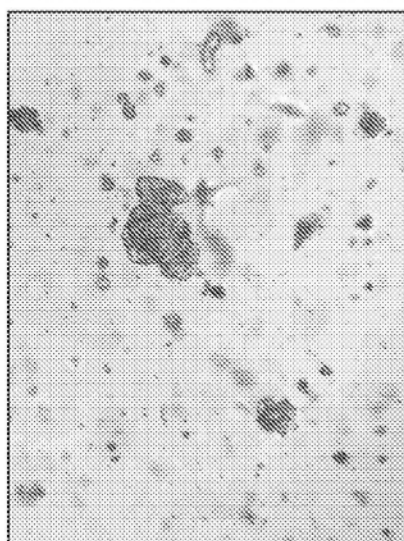
基底 + L-F127



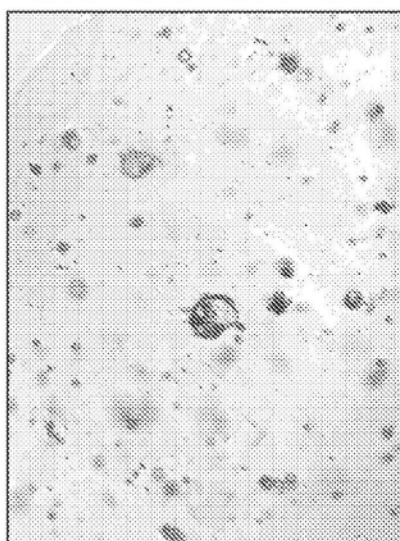
基底 + L-F10



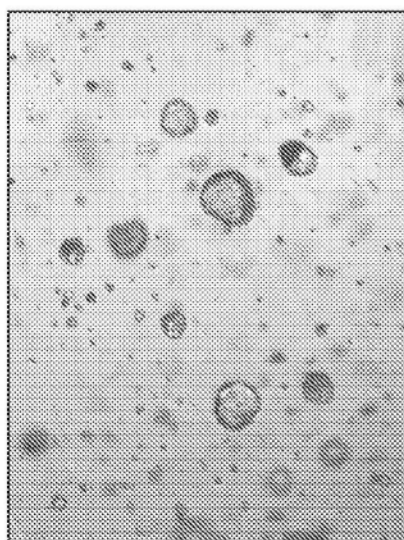
基底 + L-F12578



基底 + L-F4



基底 (对照)



基底 + L-F58

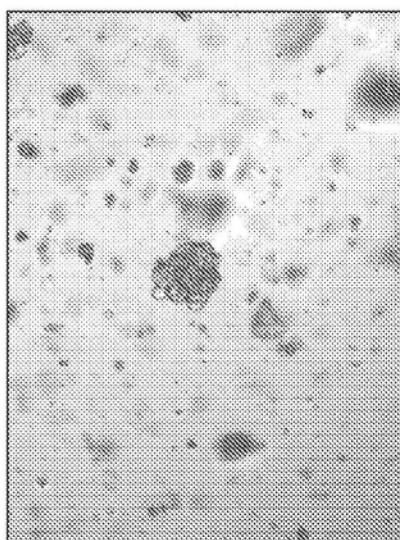


图1

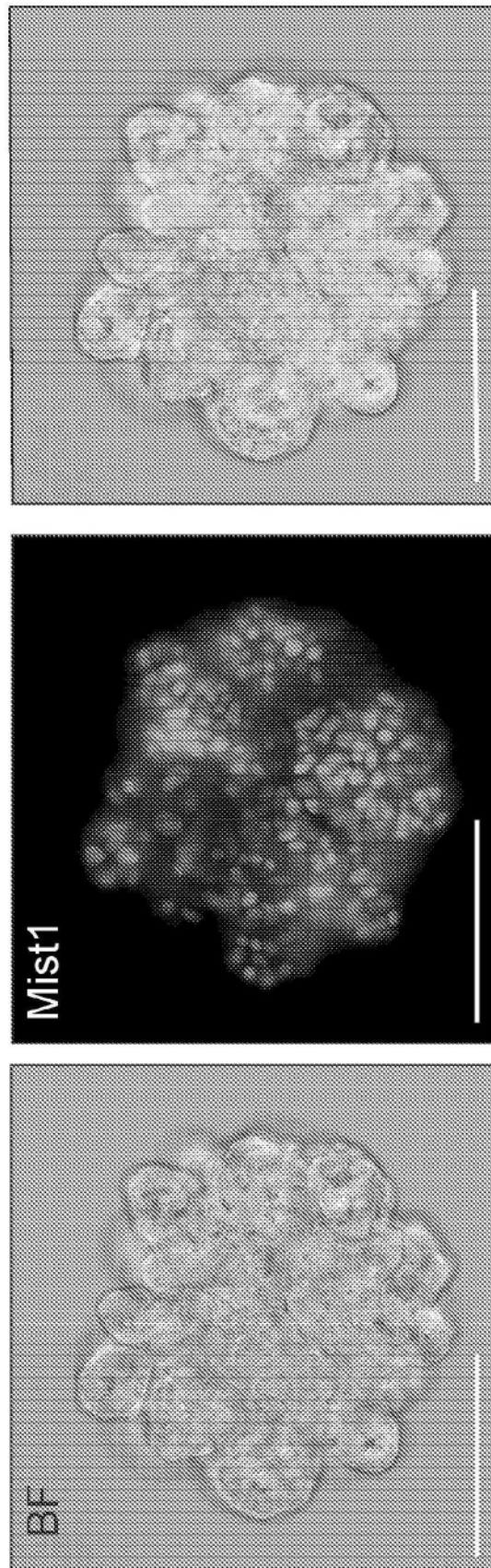


图2

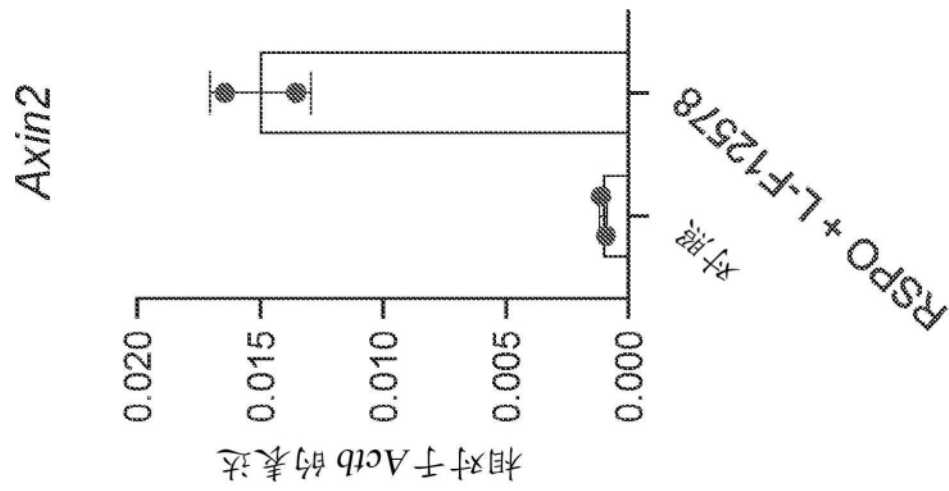


图3A

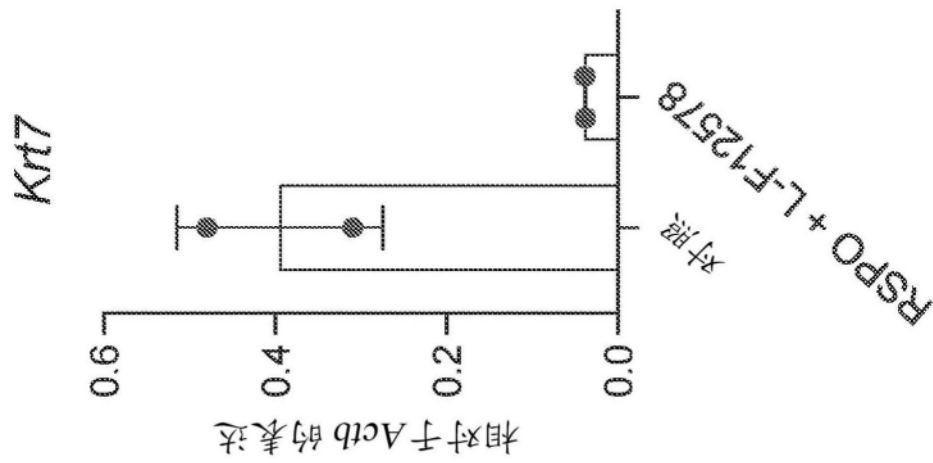


图3B

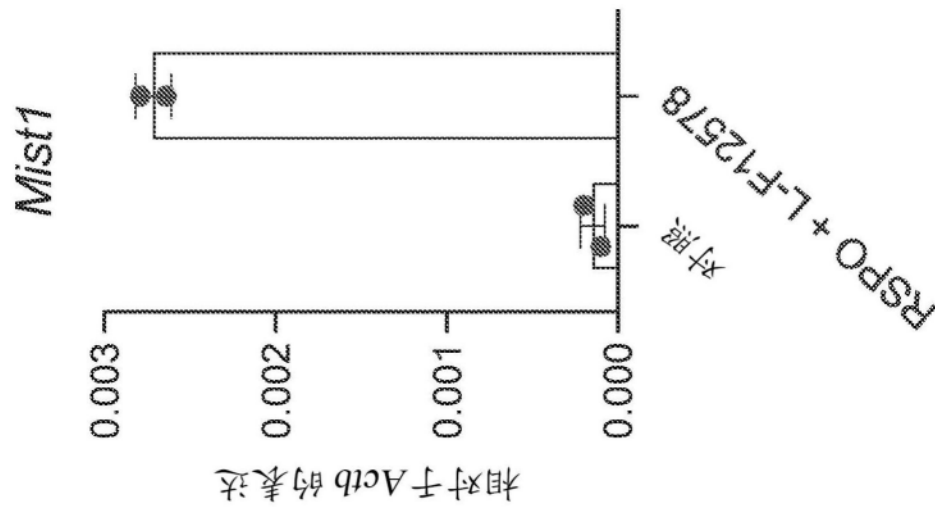


图3C

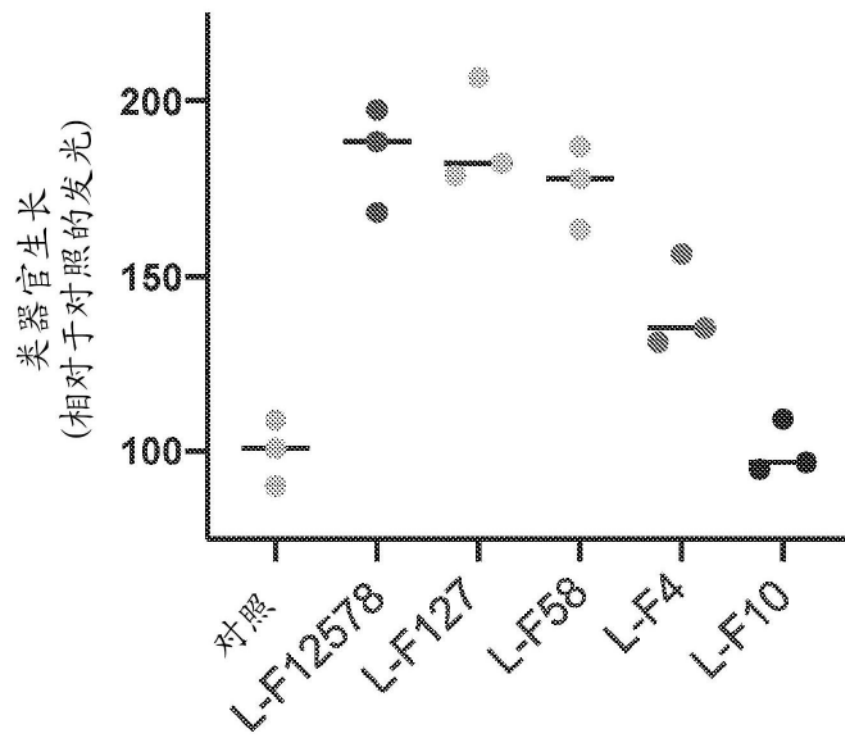


图4

生长7天后

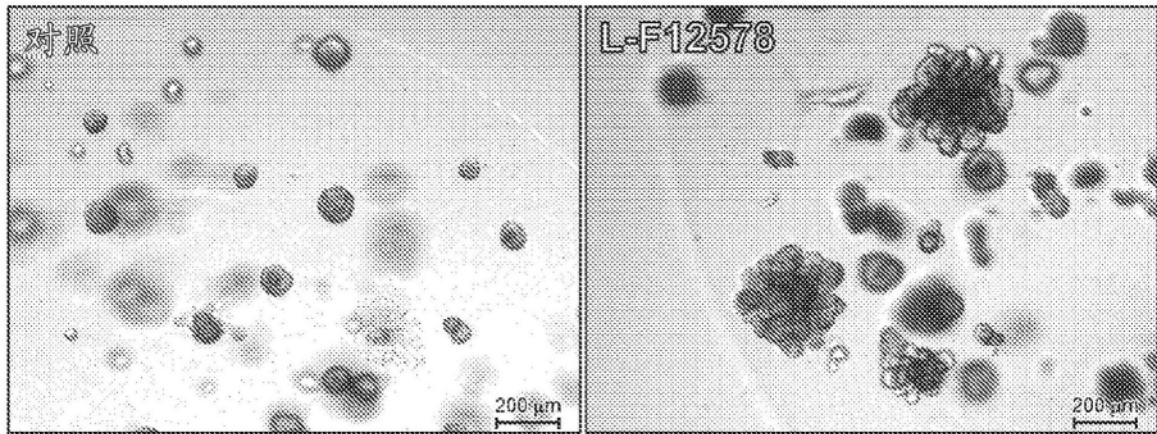


图5

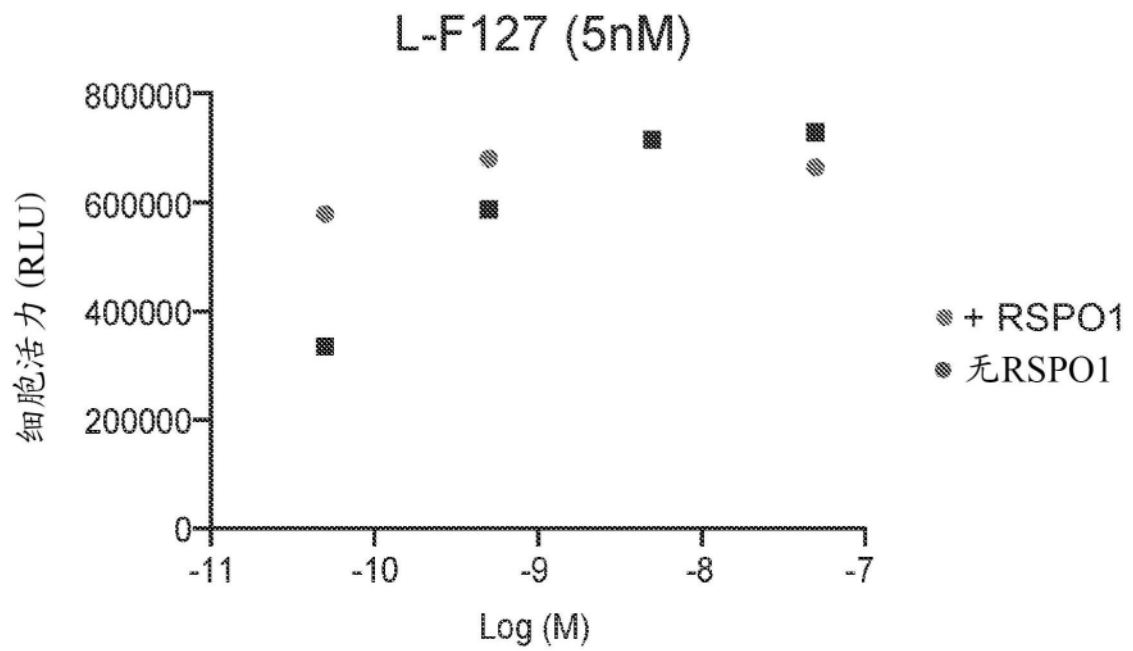


图6

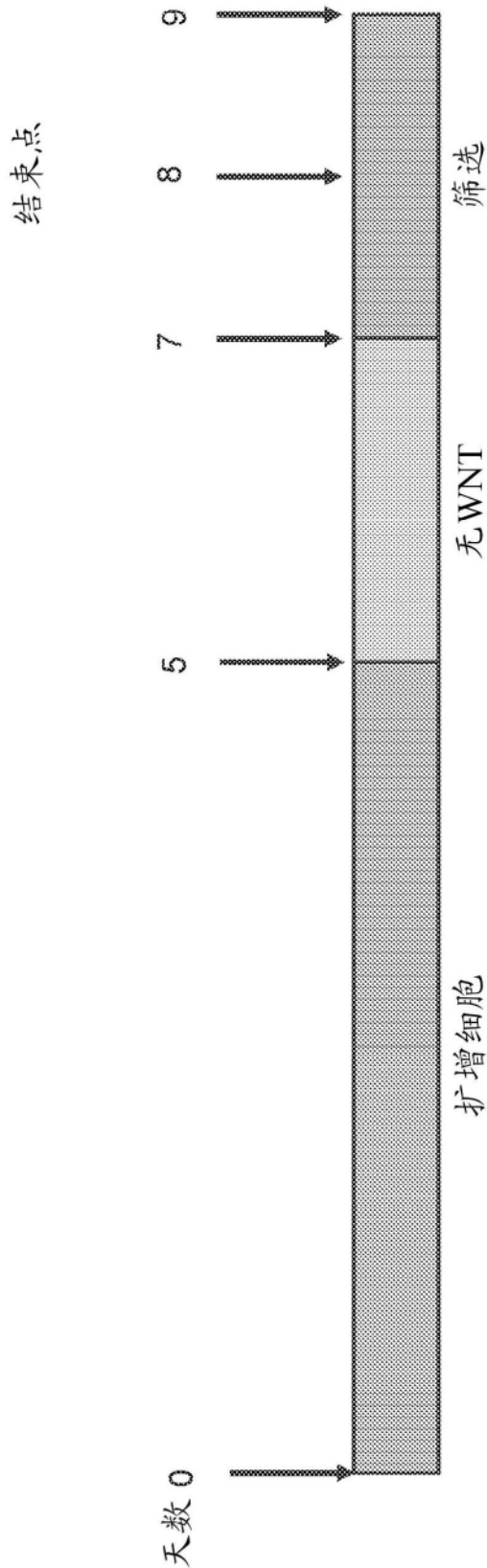


图7

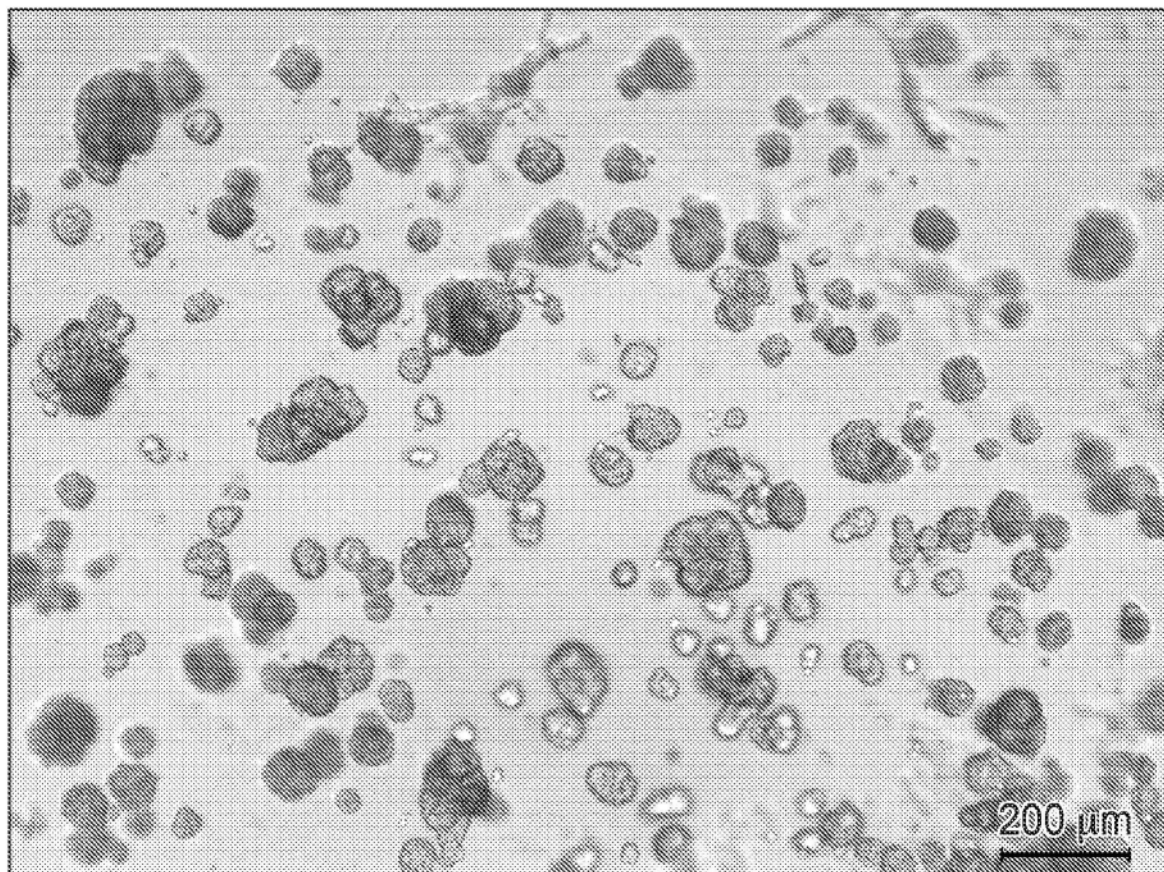


图8

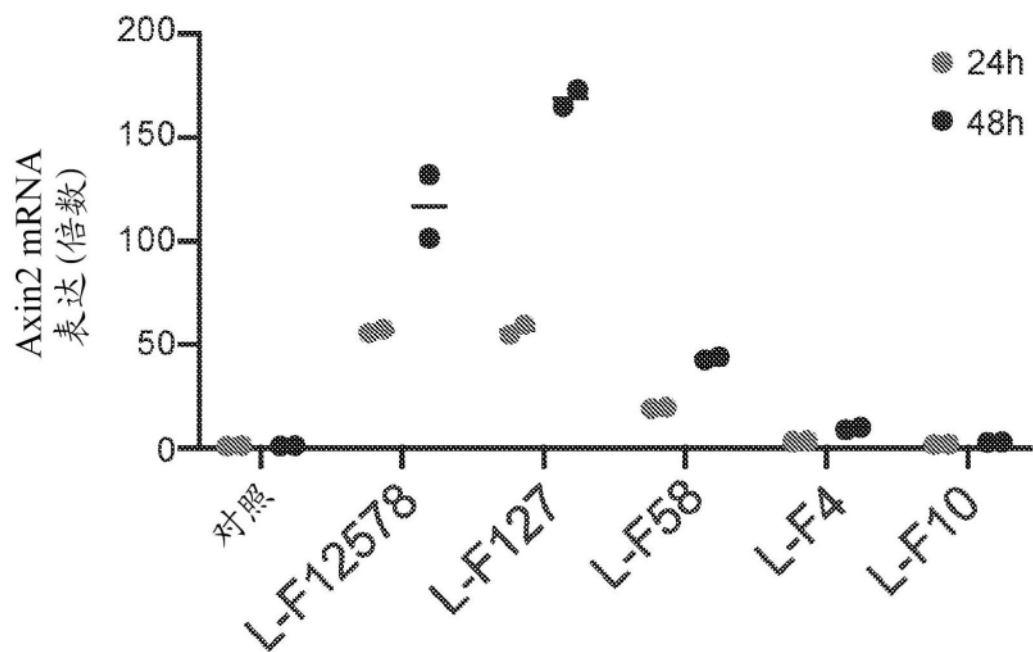


图9

人泪腺组织

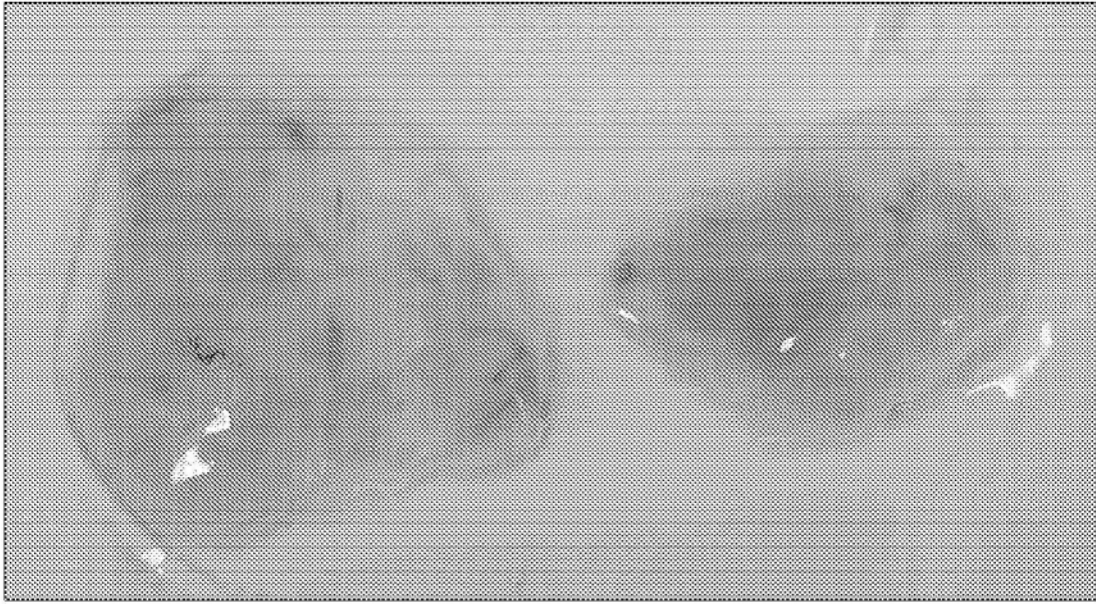


图10

人外植体培养(24小时)

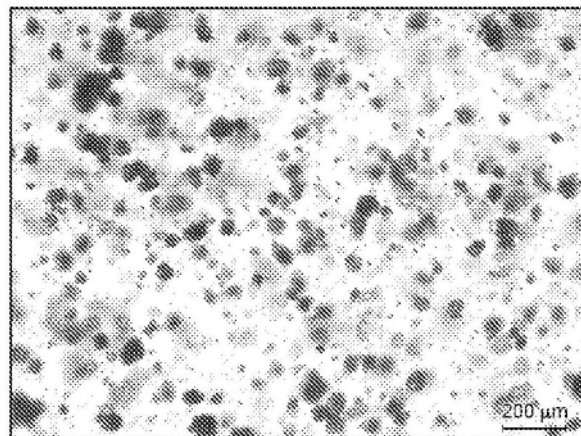


图11A

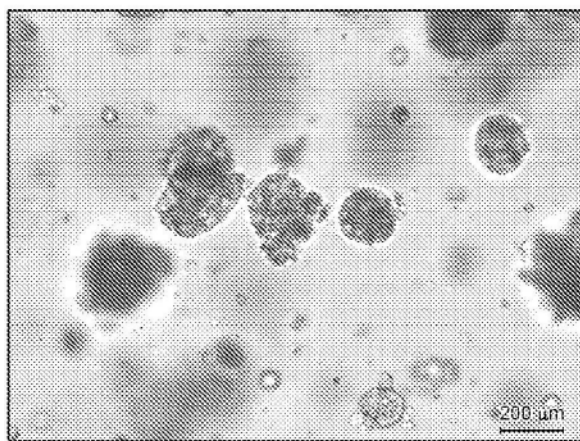


图11B

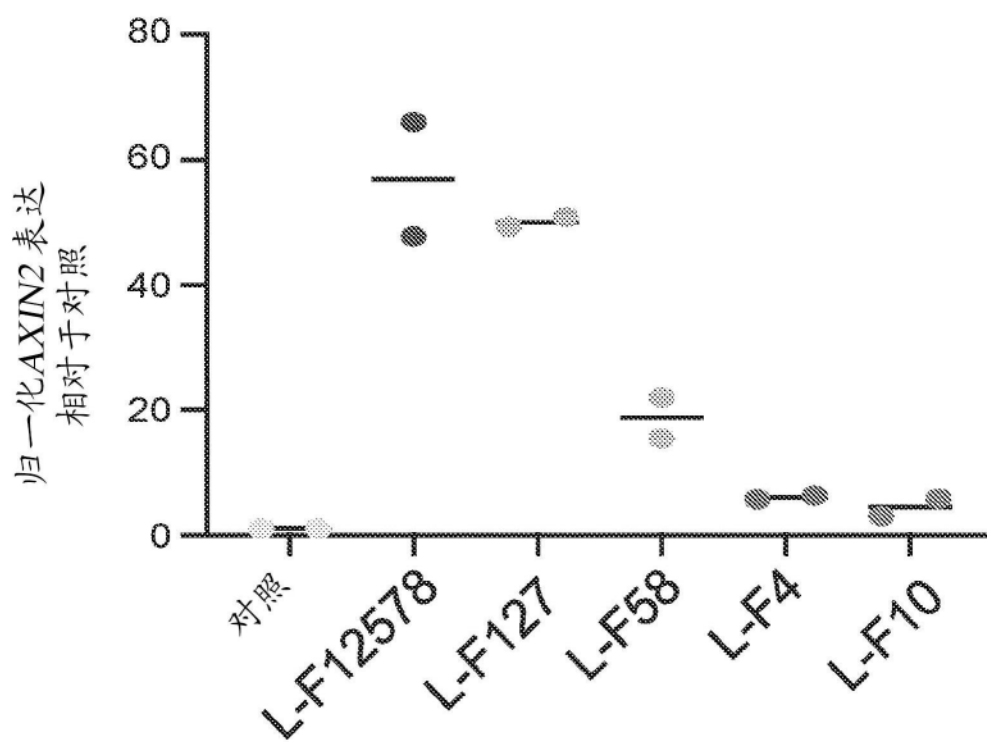


图12

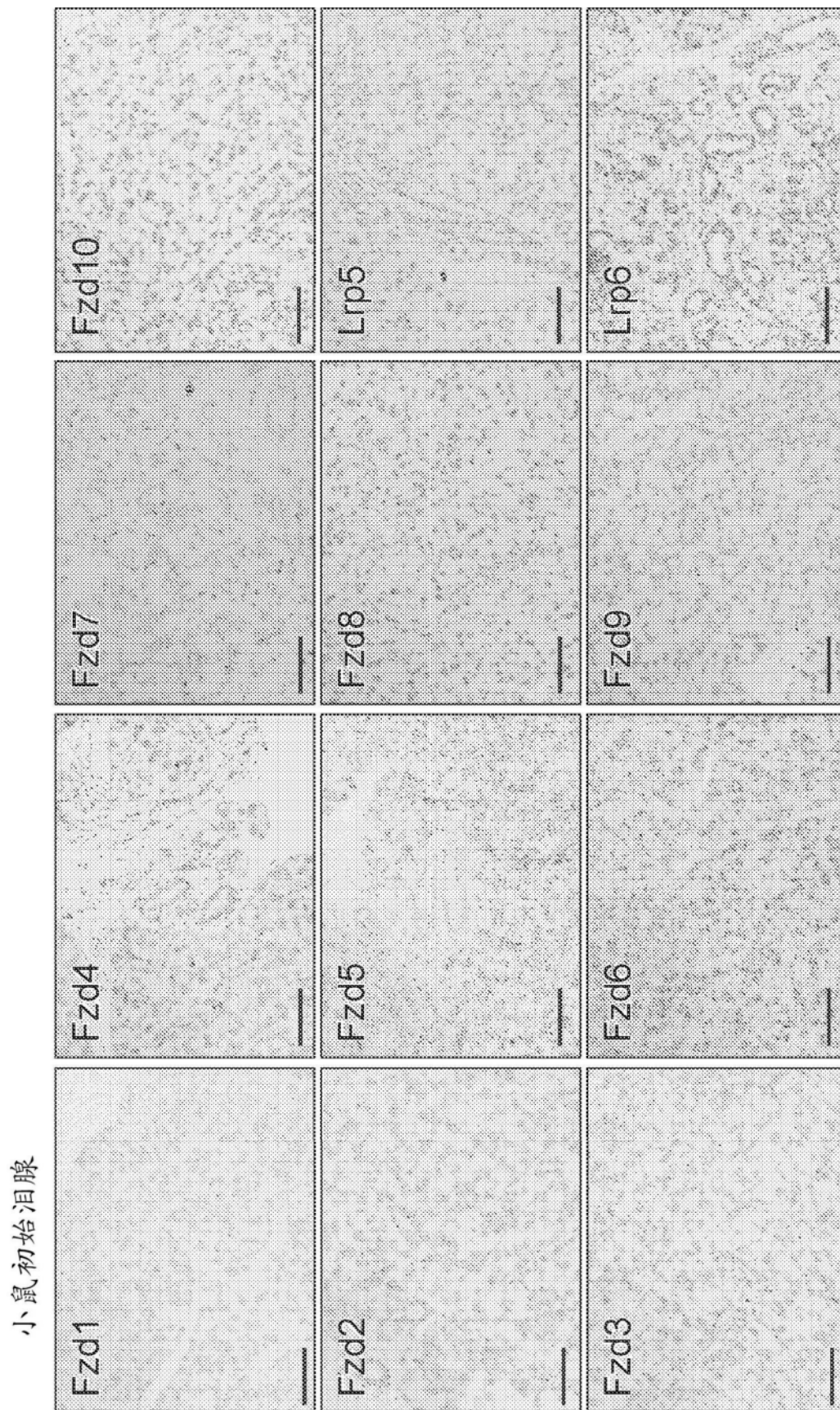


图13

人健康泪腺

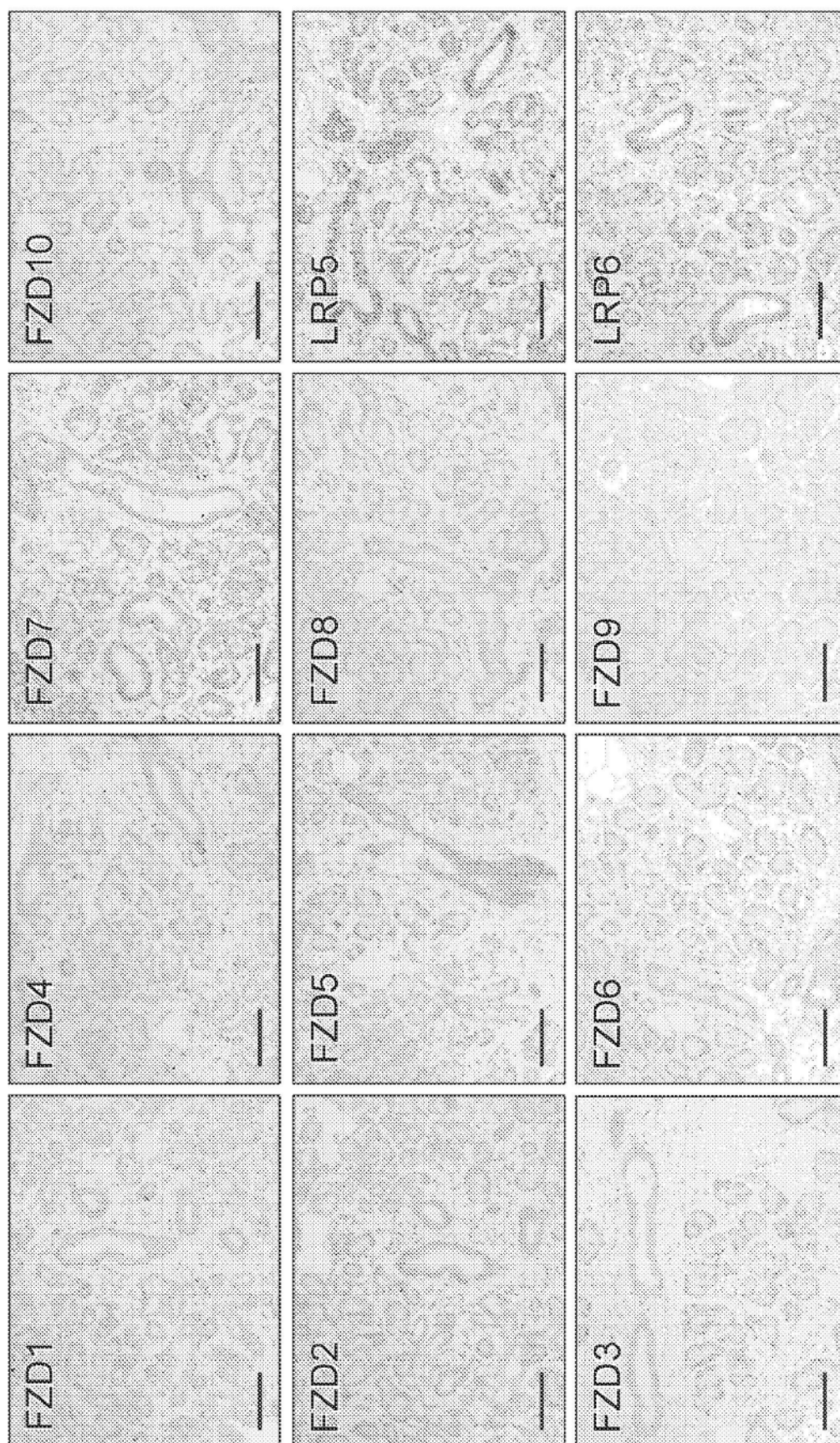


图14

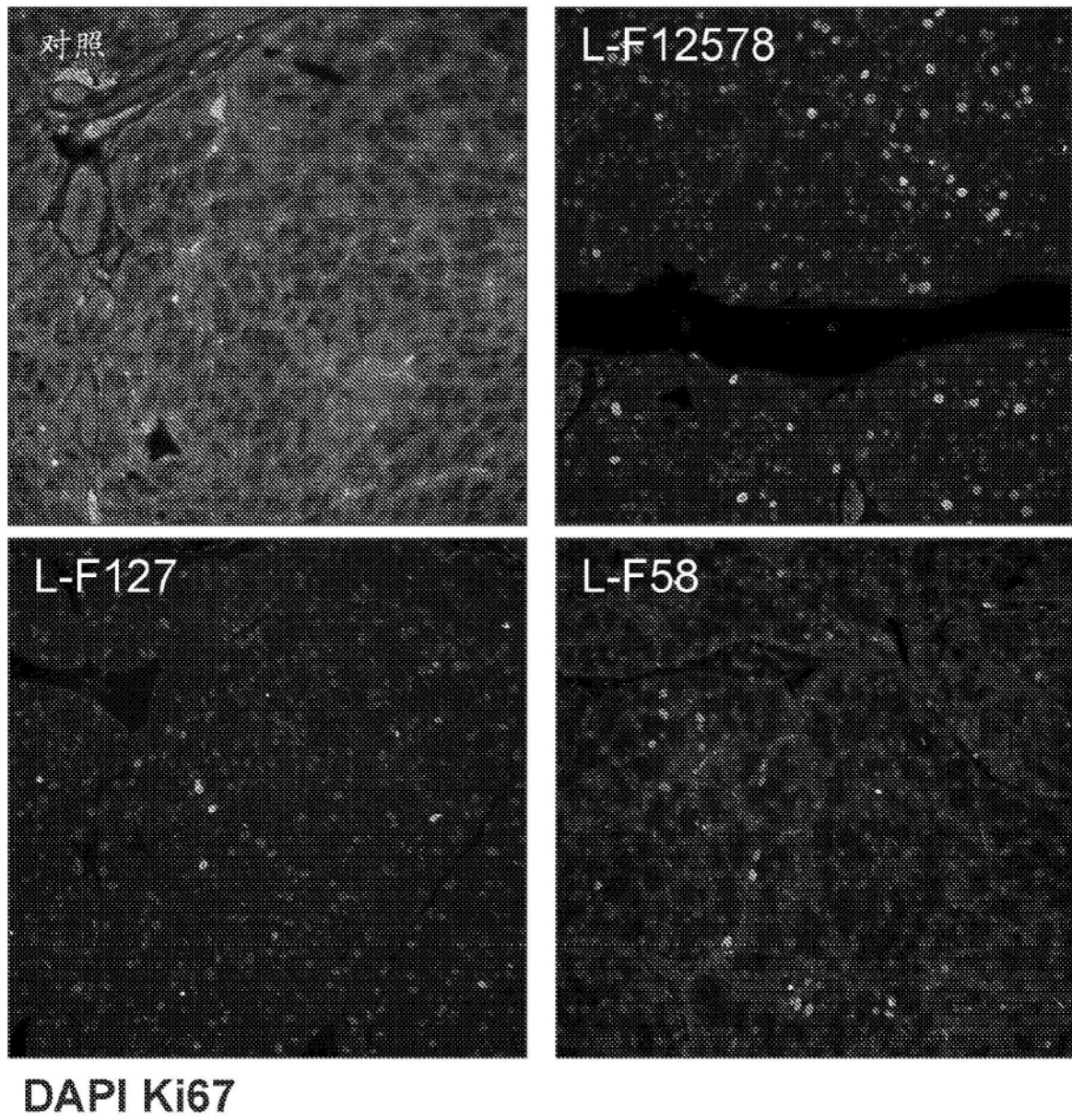


图15

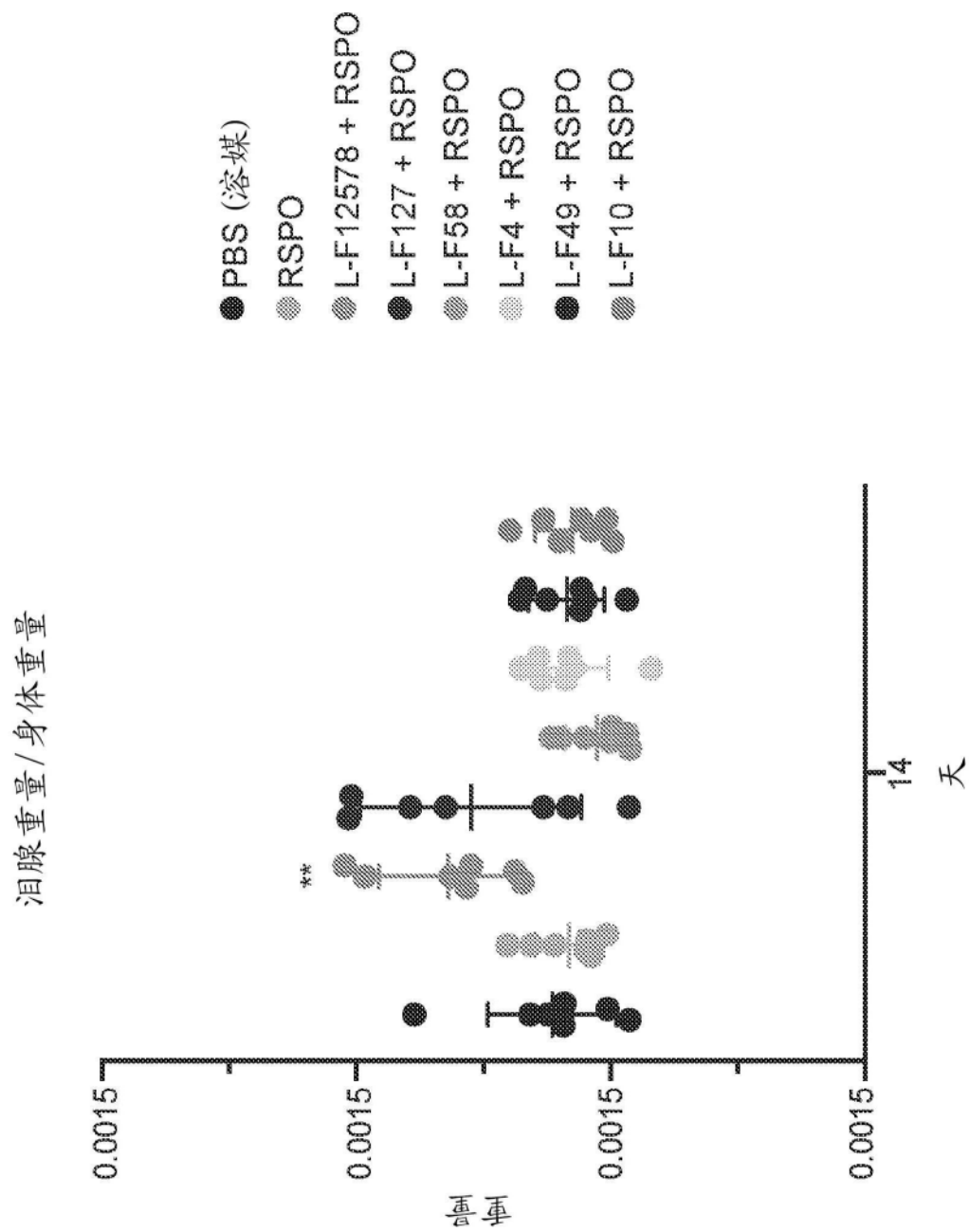


图16

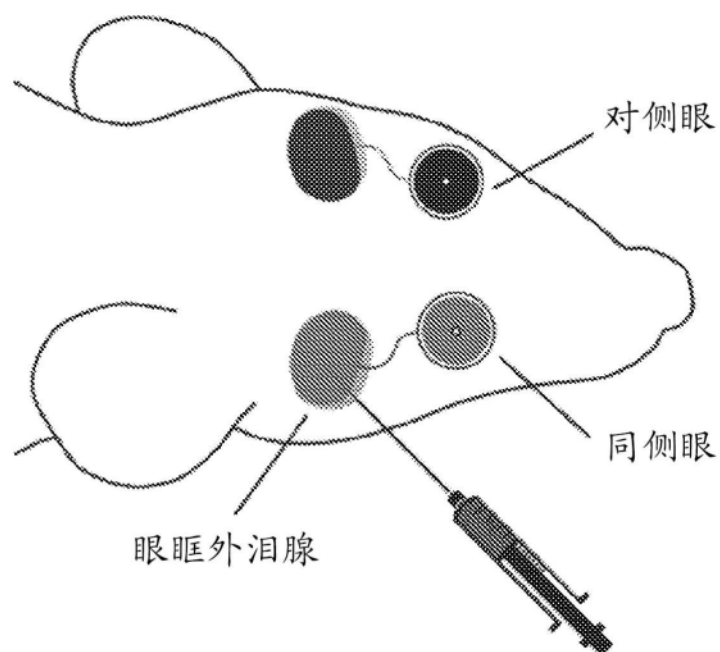


图17

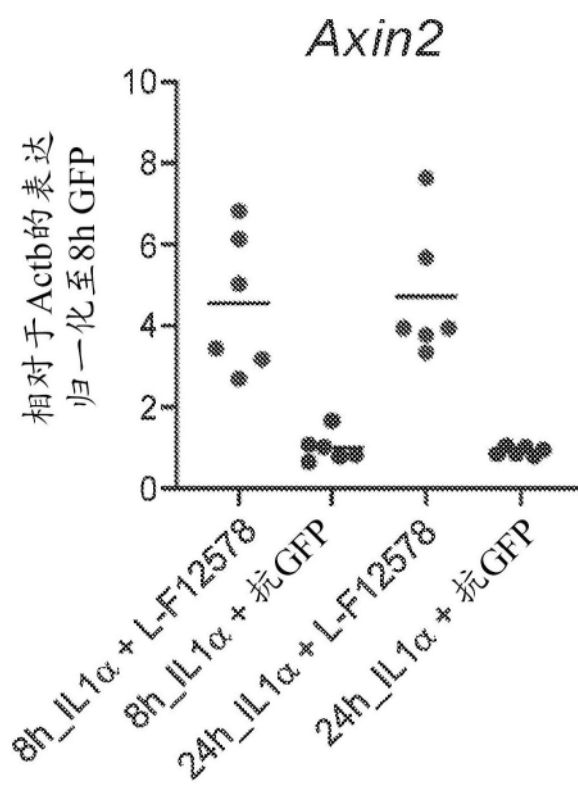


图18A

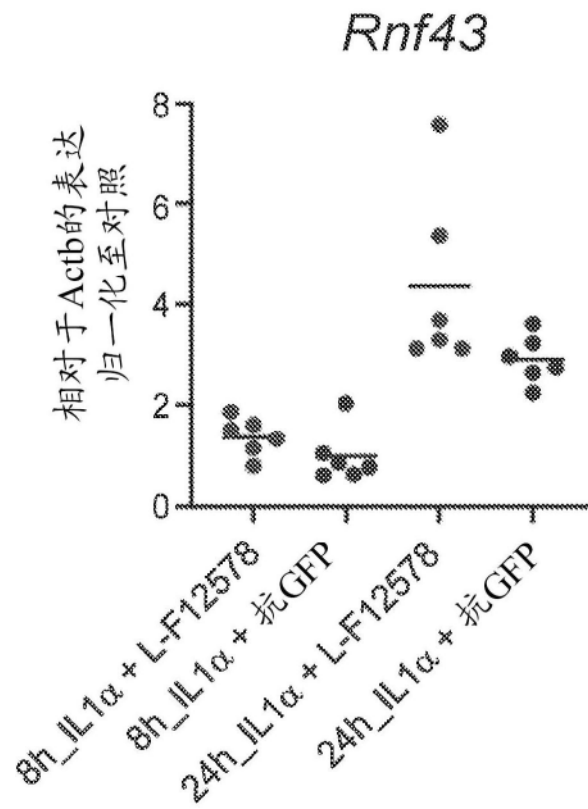


图18B

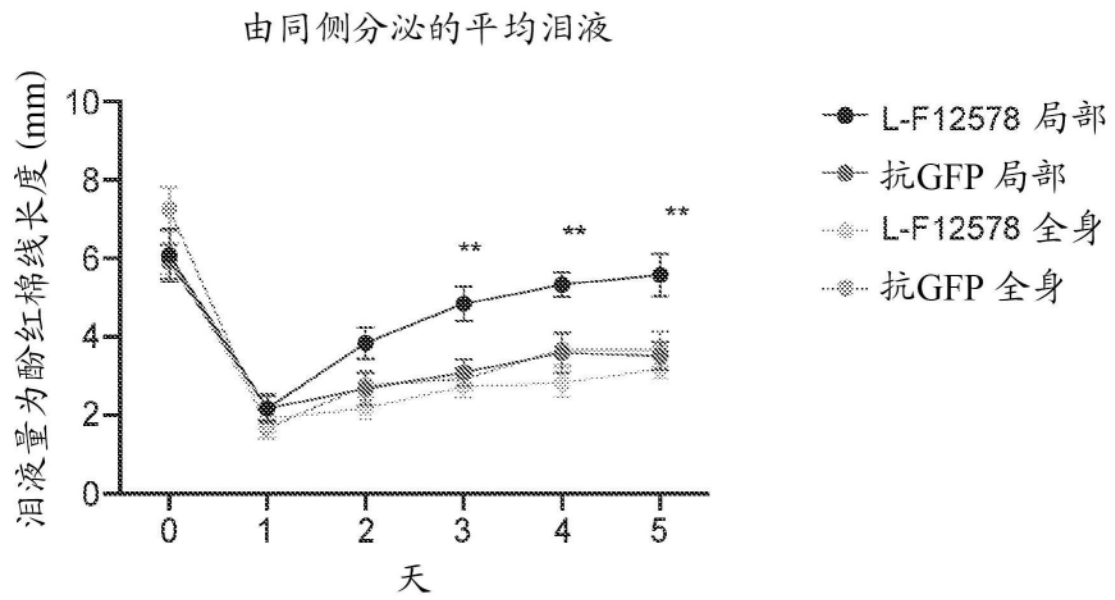


图19

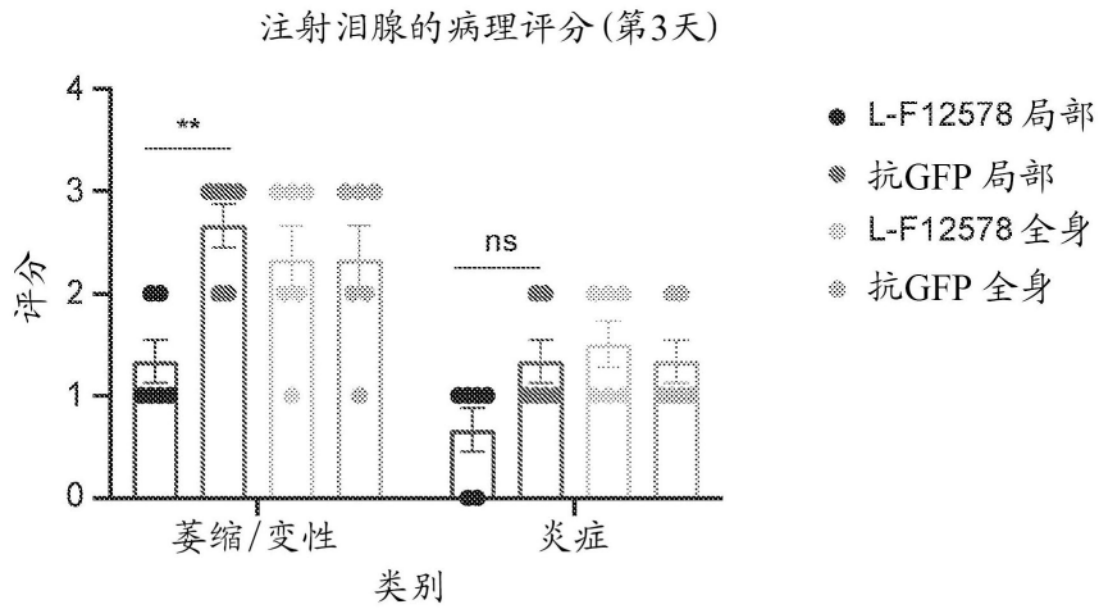


图20

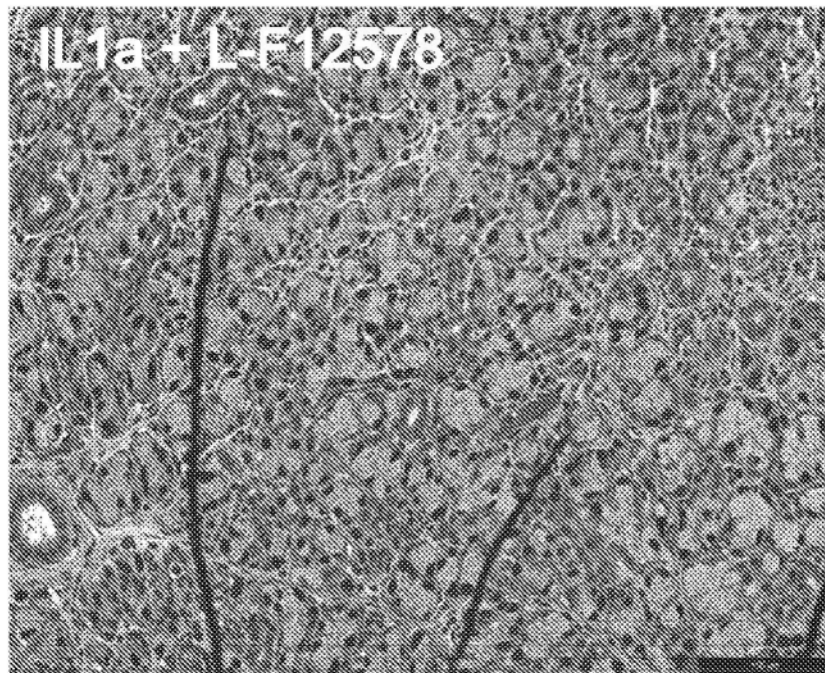


图21A

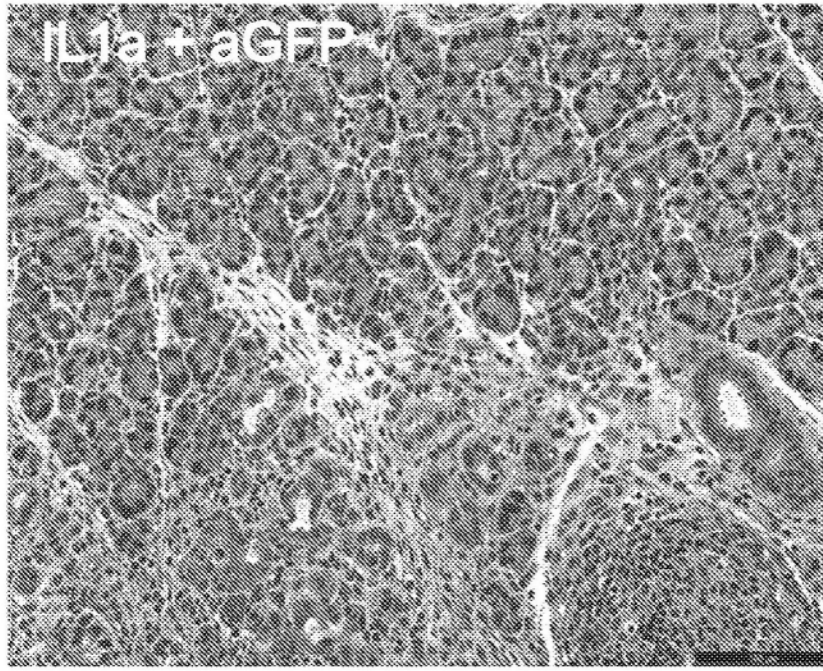


图21B

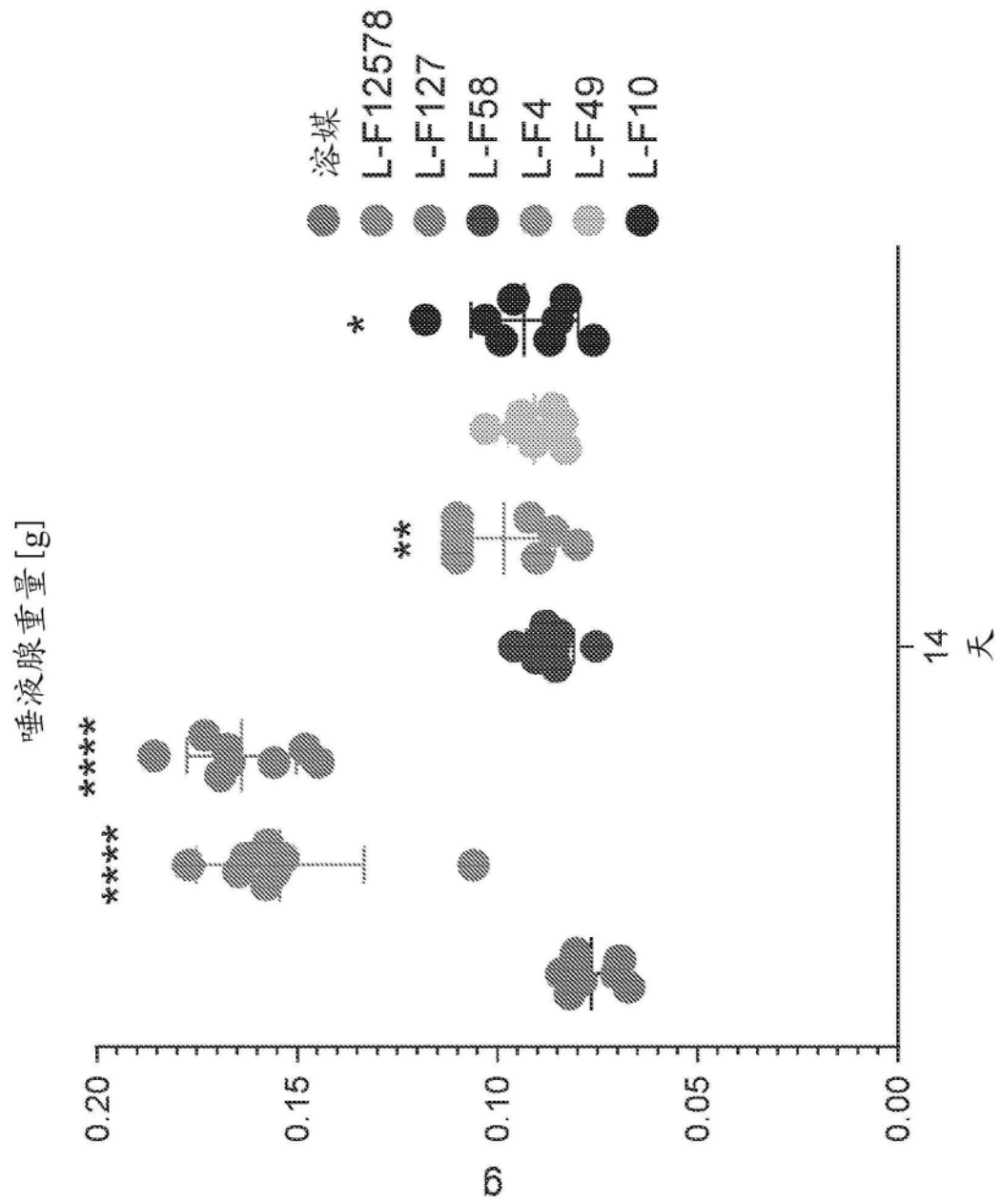


图22

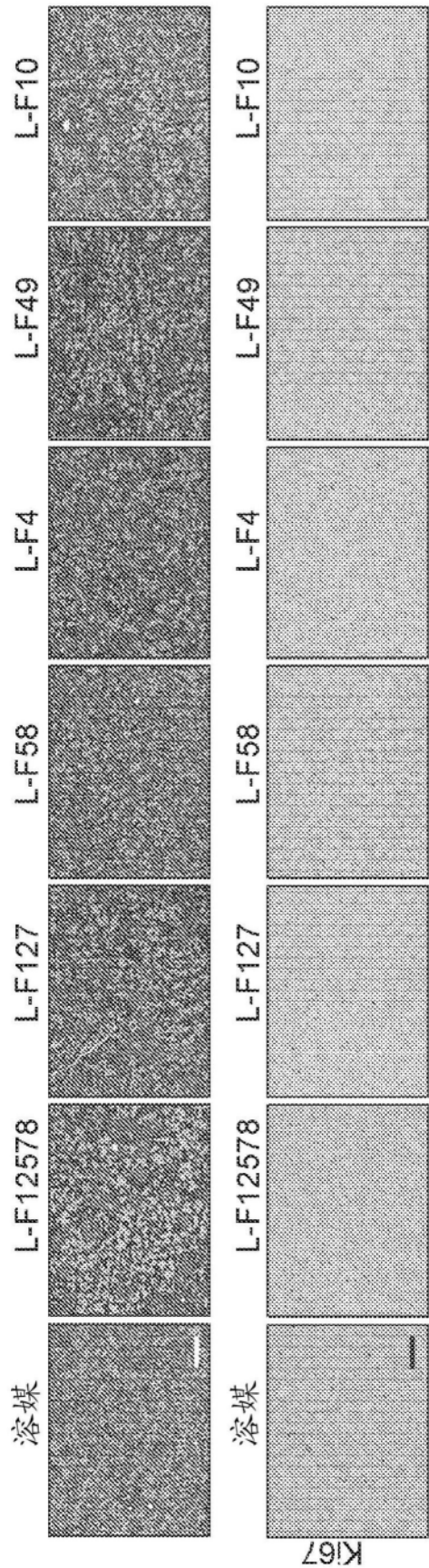


图23

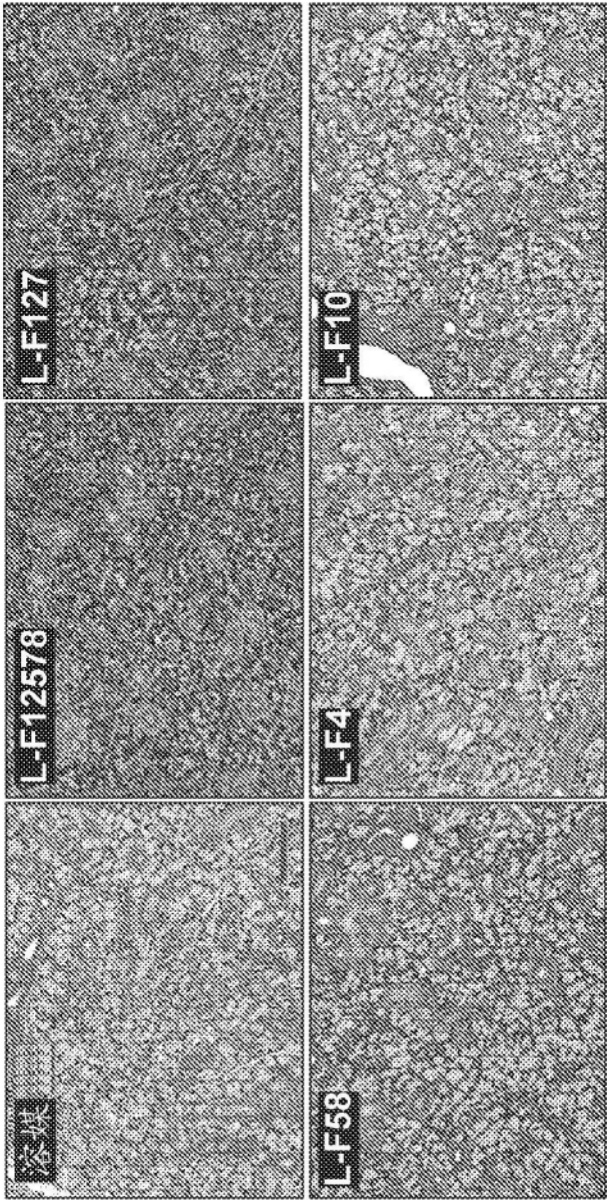


图24A

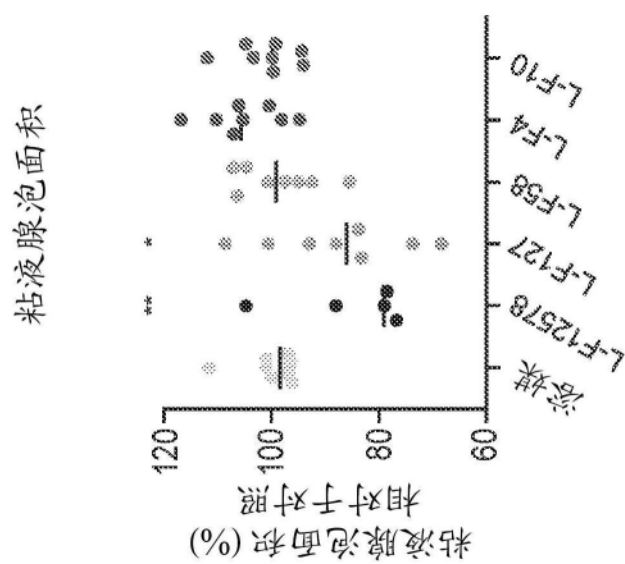


图24B

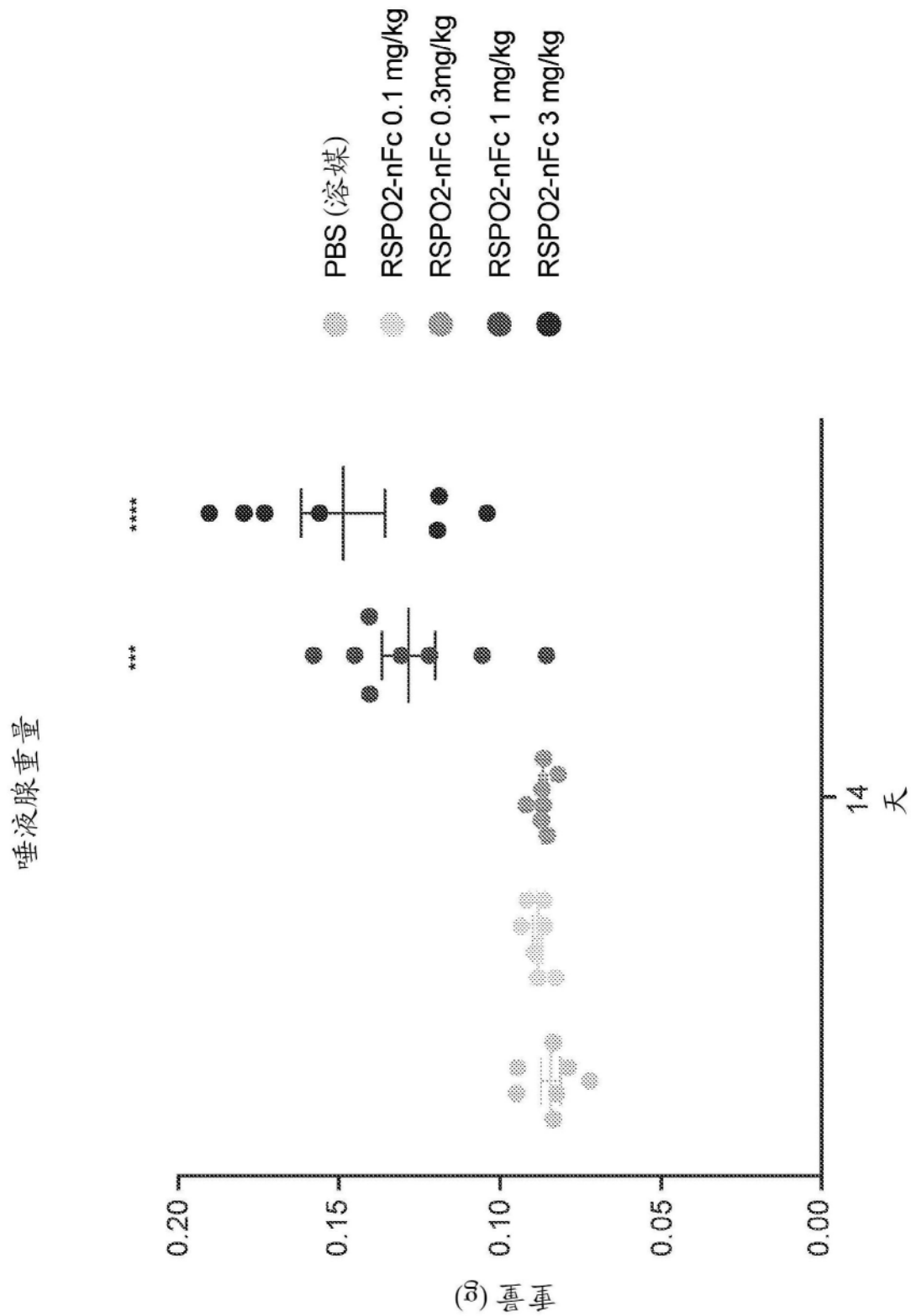


图25

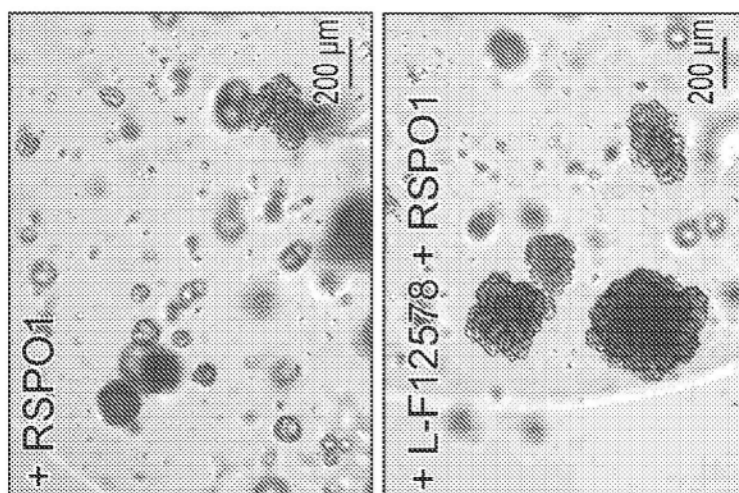


图26A

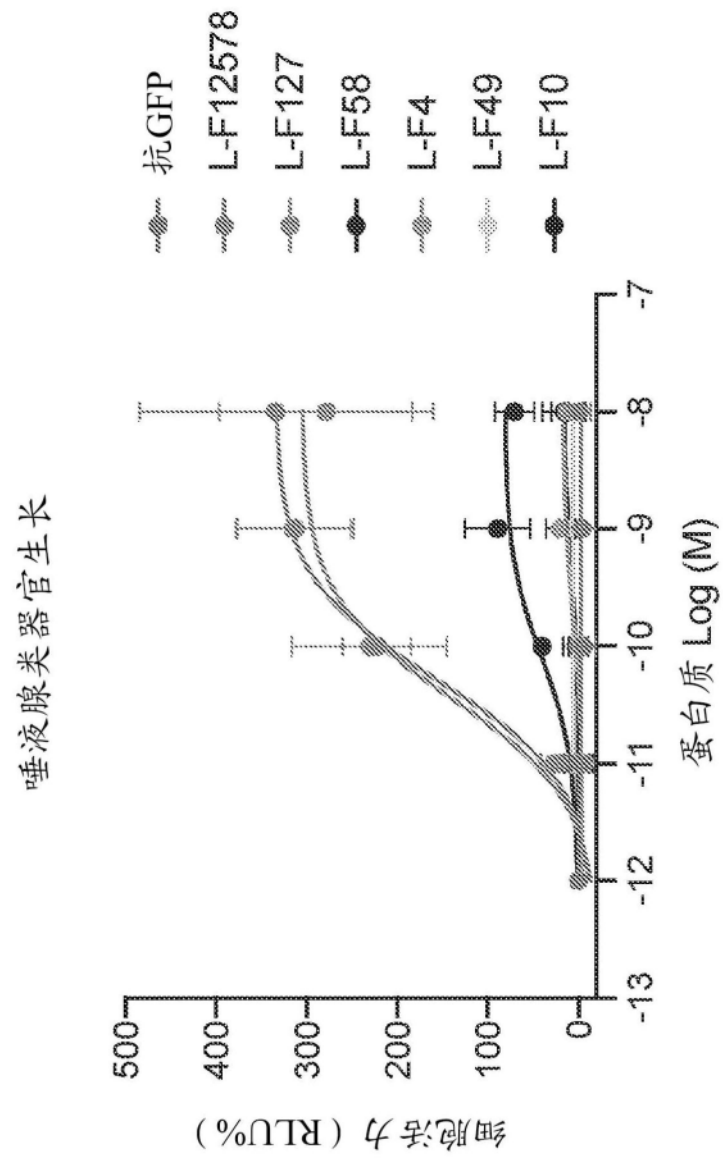


图26B

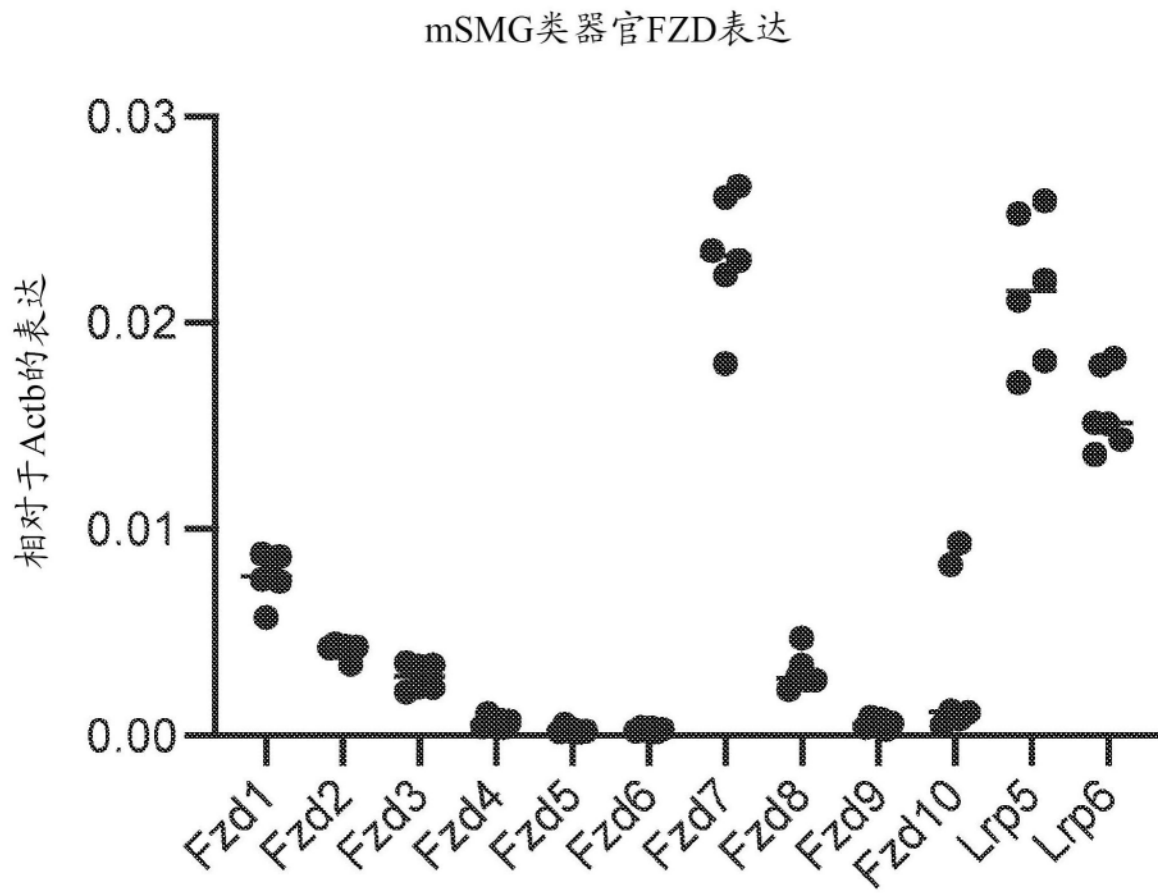


图27

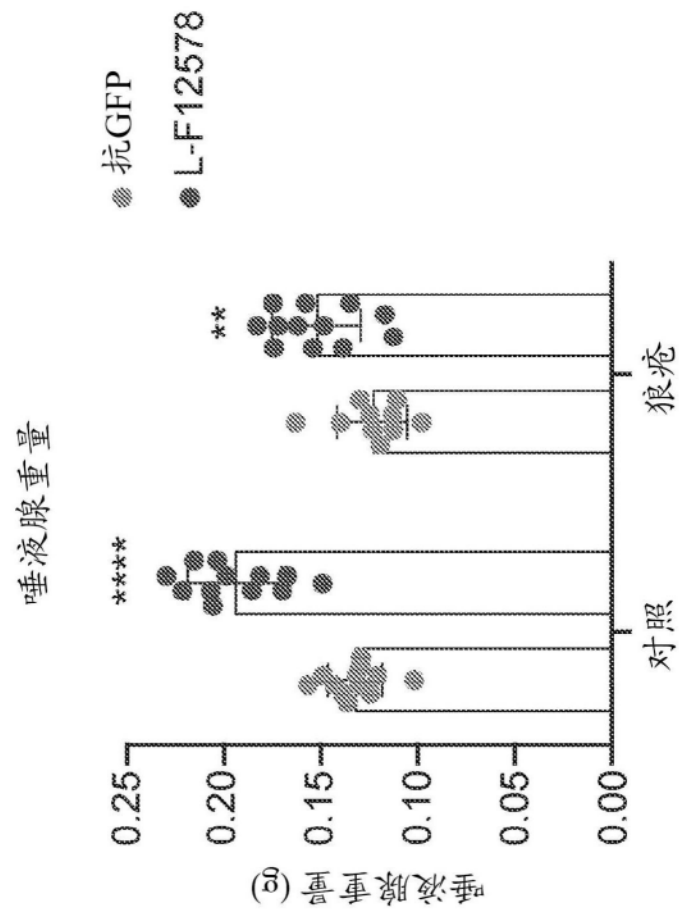


图28A

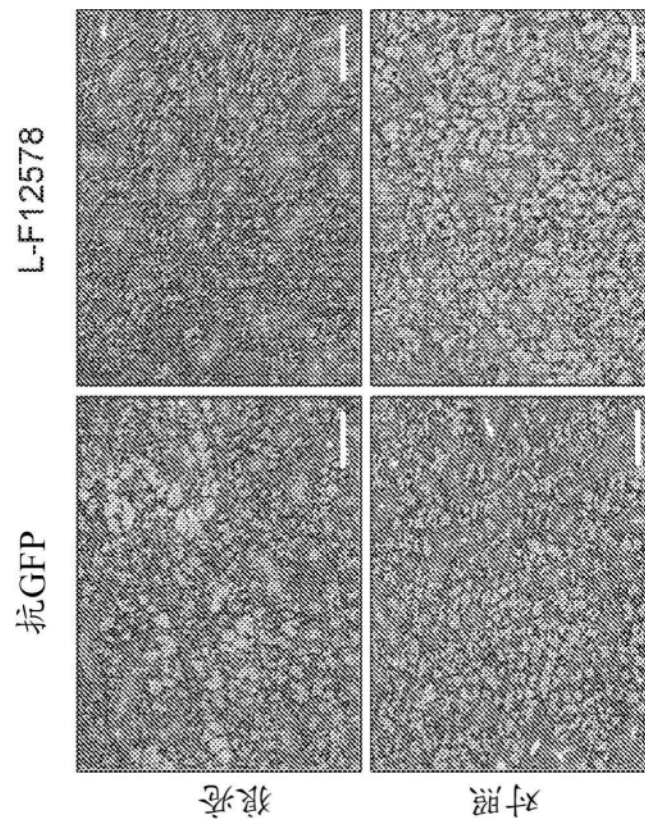


图28B

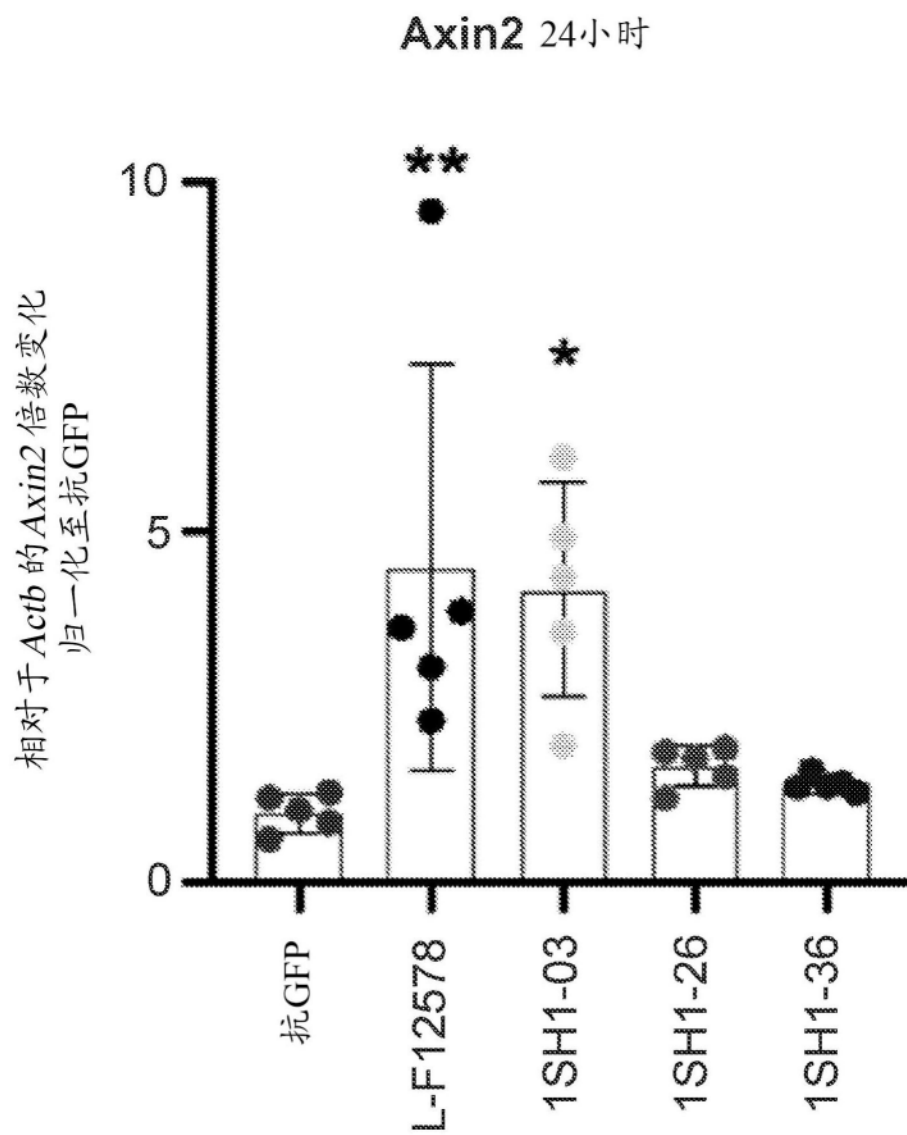


图29

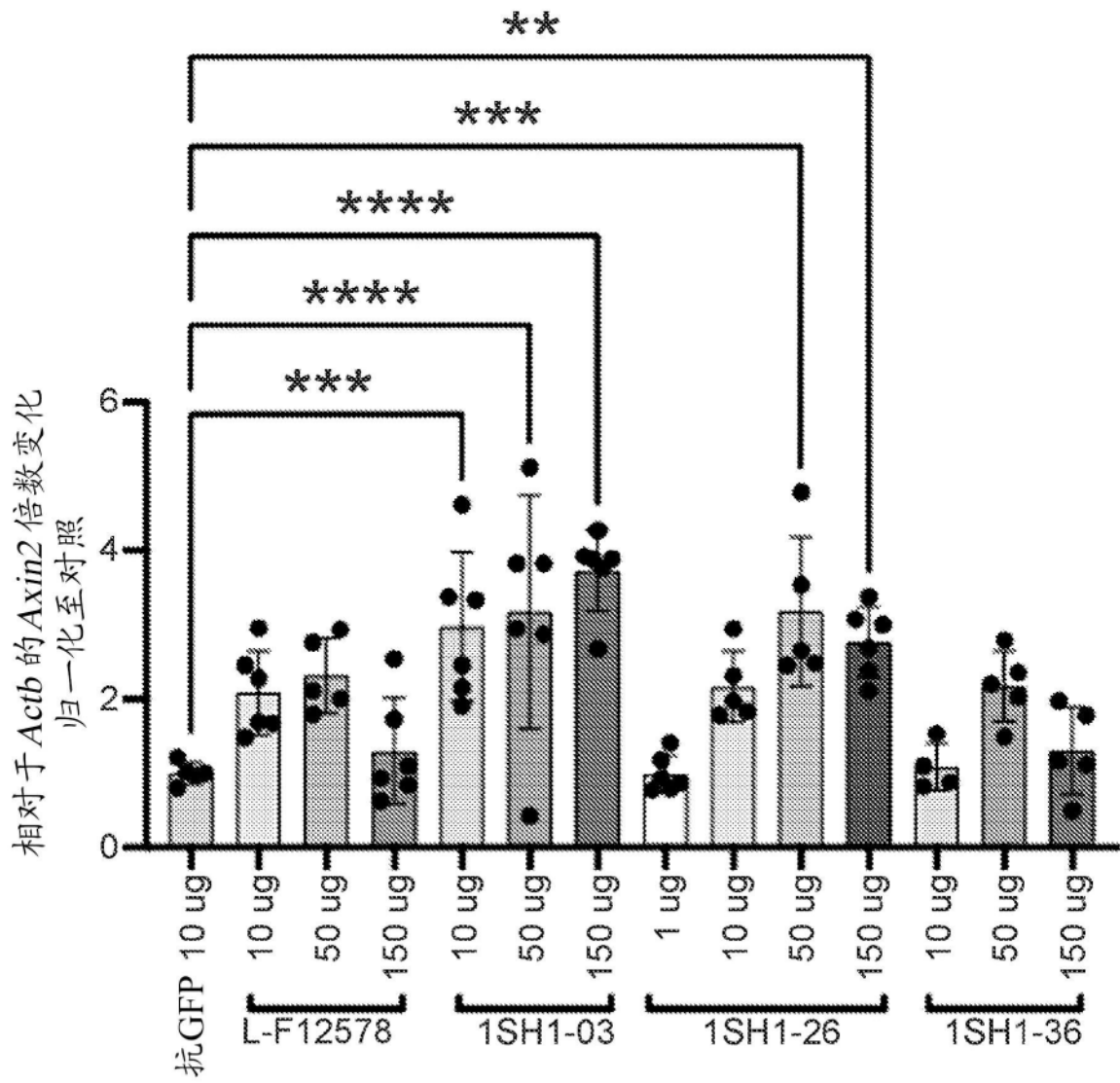
Axin2 24小时

图30

泪液分泌

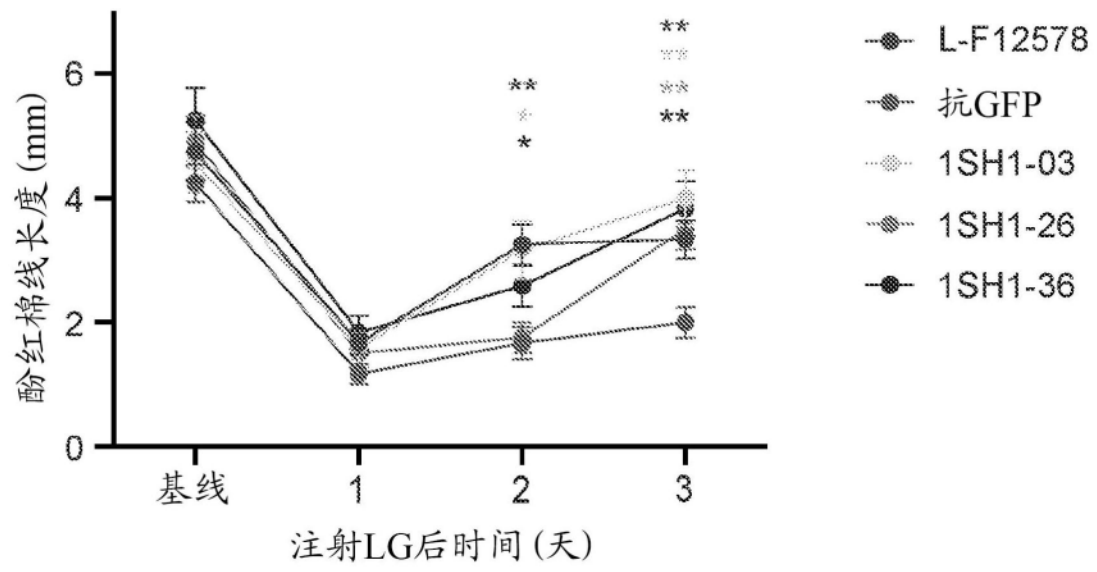


图31

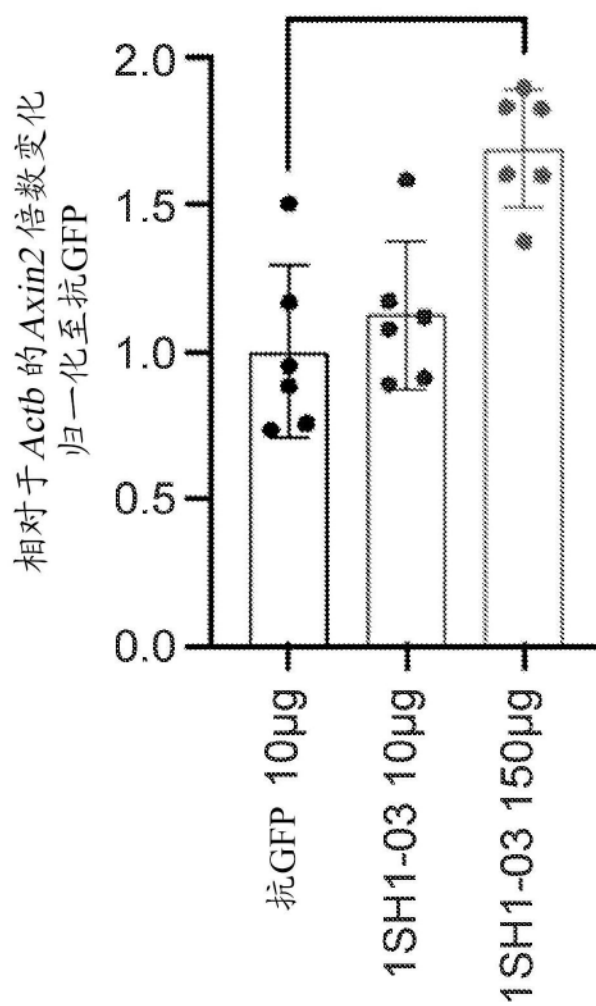
Axin2 第3天

图32

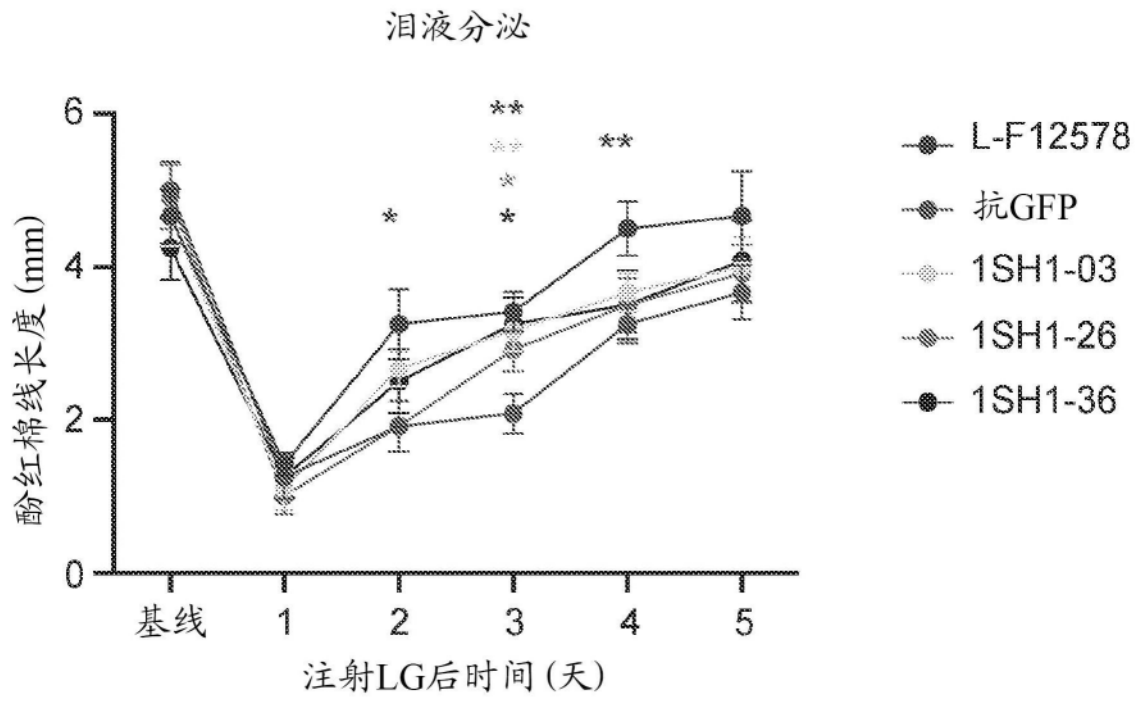


图33

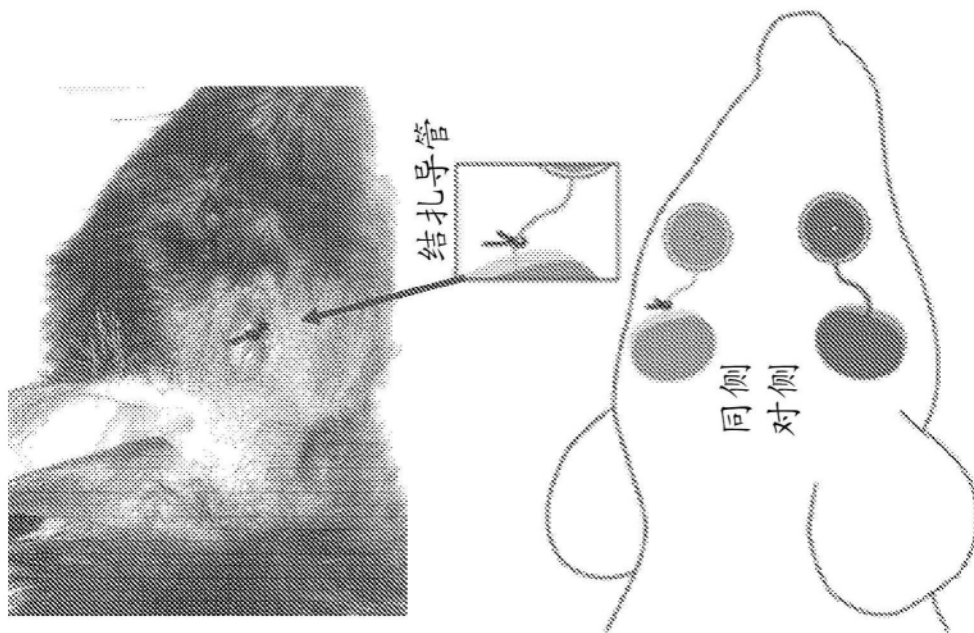


图34A

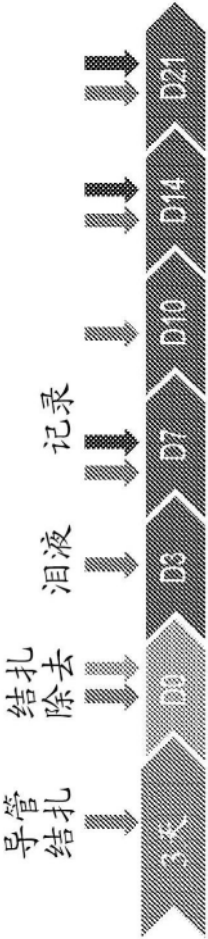


图34B

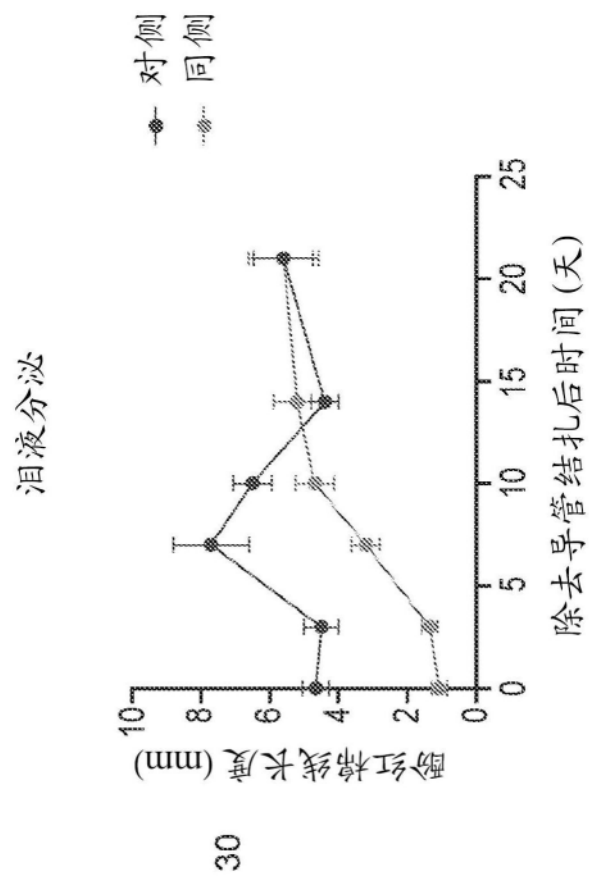


图35A



图35B

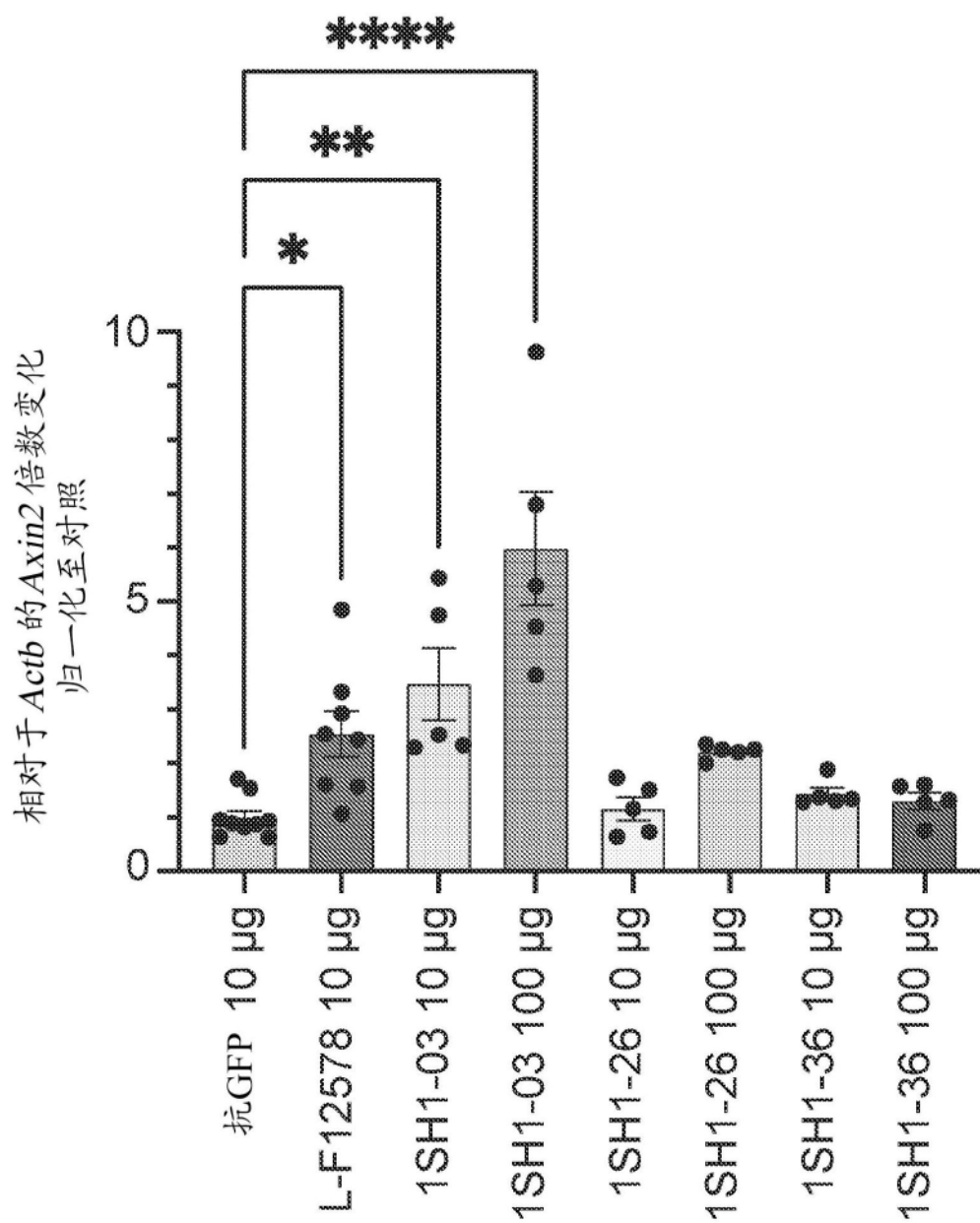
24小时 *Axin2*

图36

泪液分泌

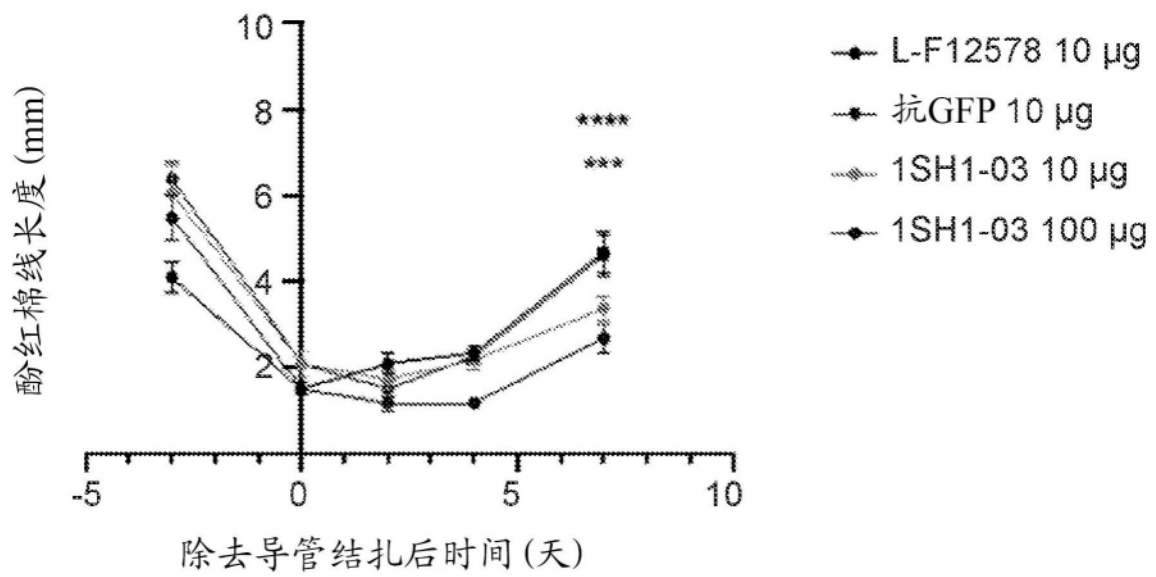


图37

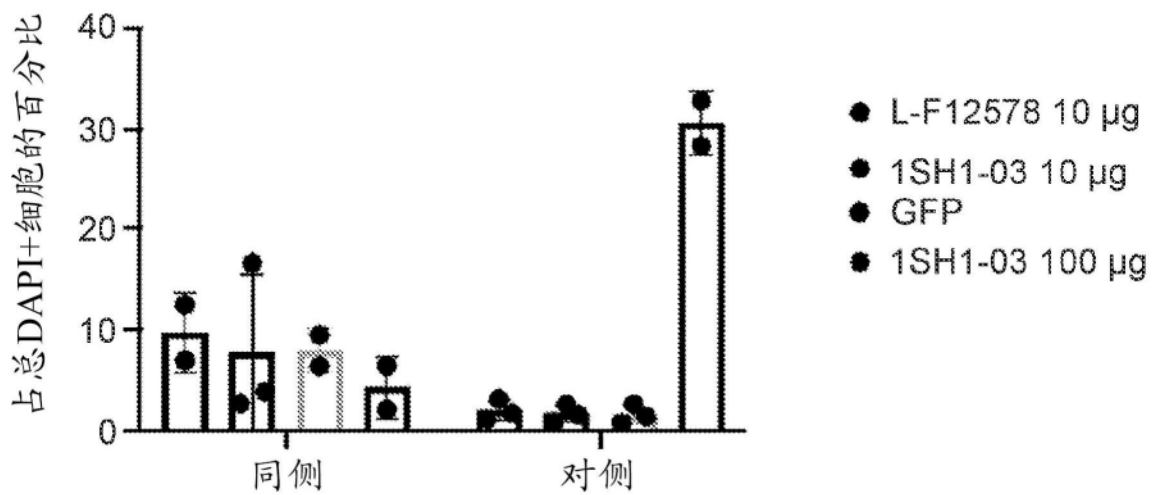
Mist1+Ki67+百分比
(腺泡细胞的增殖)

图38

泪液分泌

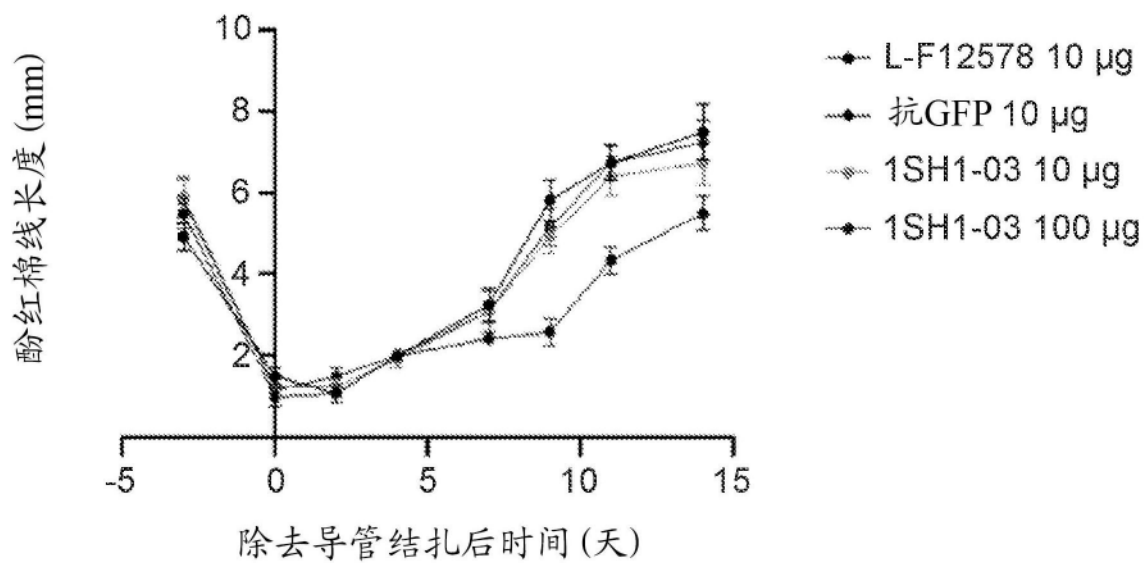


图39

Mist1+Ki67+百分比
(增殖腺泡细胞的百分比)

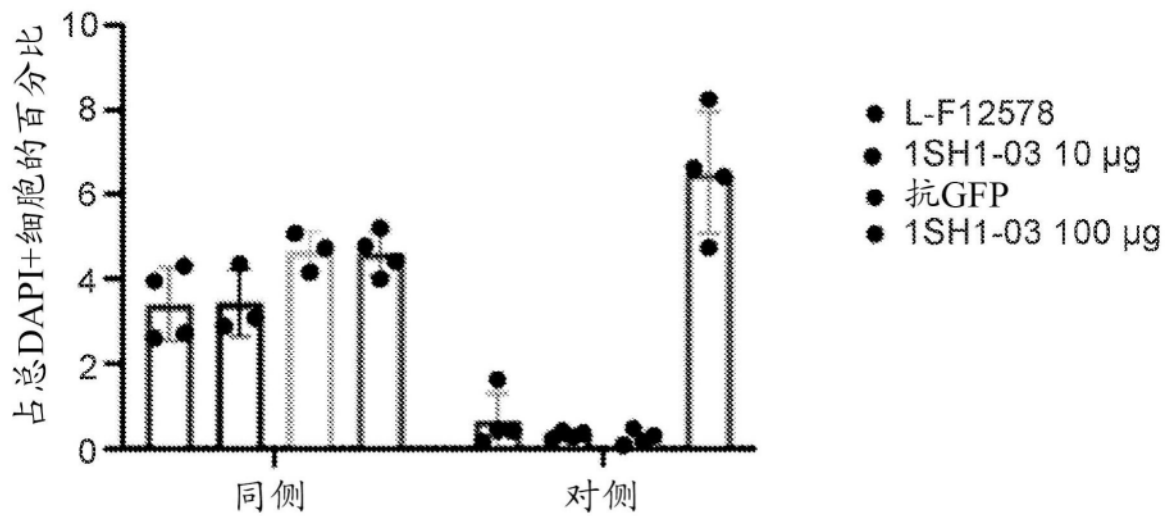


图40

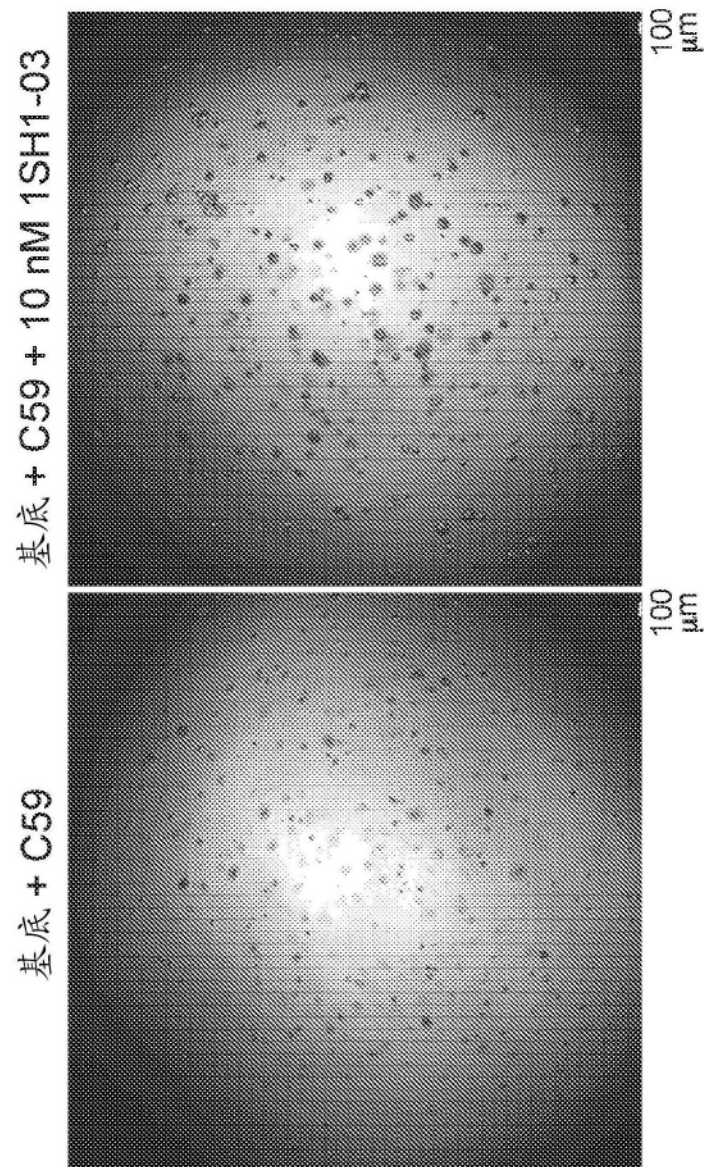


图41A

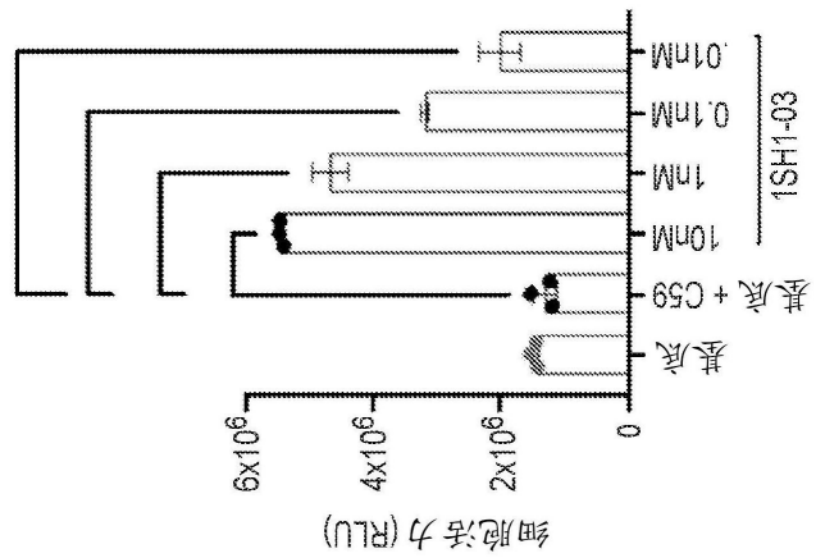


图41B

唾液腺上皮增殖

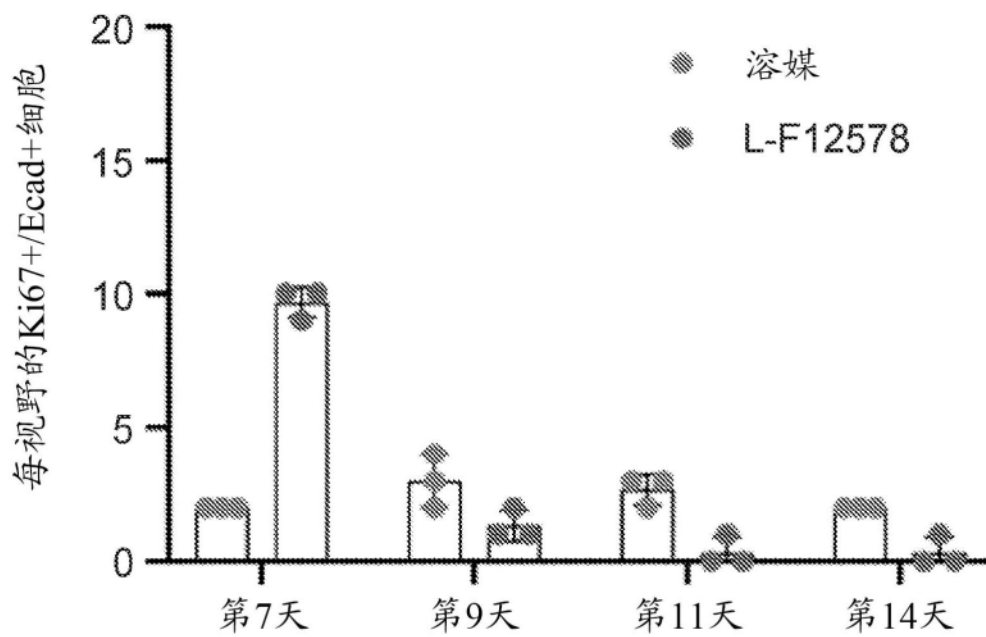


图42

唾液腺组织重量

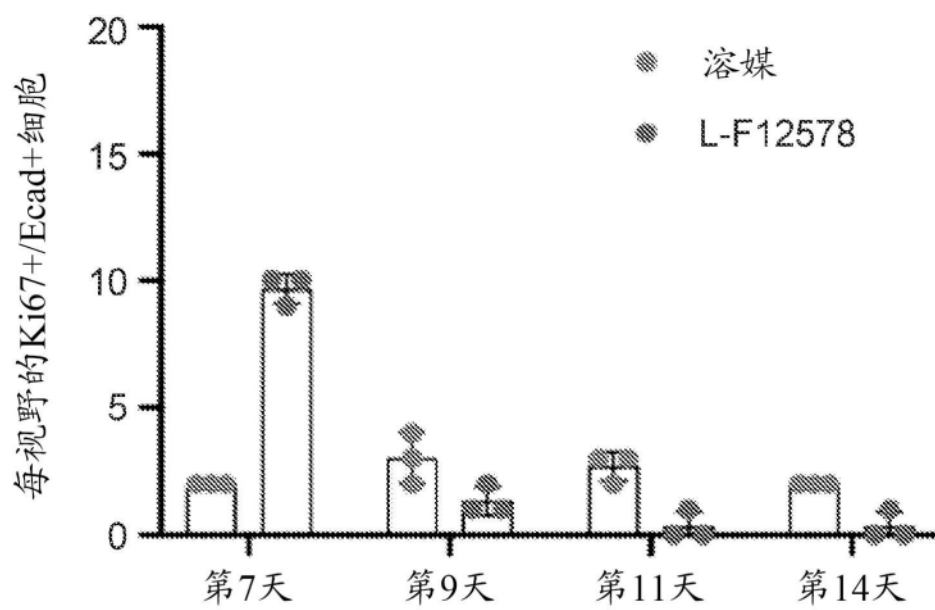


图43