



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115551530 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202080071768.1

(22) 申请日 2020.08.27

(30) 优先权数据

62/892,520 2019.08.27 US

62/943,803 2019.12.04 US

63/041,097 2020.06.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2020/000699 2020.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/038296 EN 2021.03.04

(71) 申请人 通尼克斯制药有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 S·莱德elman B·道格赫缇

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 陈晓娜

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

权利要求书5页 说明书38页

序列表20页 附图16页

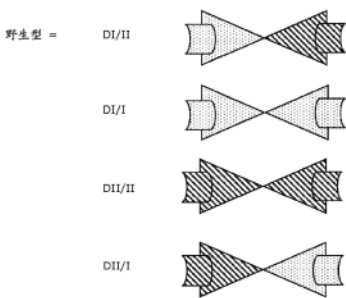
(54) 发明名称

经修饰的TFF2多肽

(57) 摘要

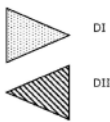
本文描述了经修饰的TFF2多肽、包含这些多肽的组合物和它们用于治疗癌症和炎症的用途。

野生型和嵌合 rTFF2



图例

TFF2 结构域 (D)



TFF2 配体结合结构域 (LBD)



1. 一种包含经修饰的TFF2多肽的组合物,其中所述TFF2多肽通过以下一种或多种进行修饰:聚乙二醇化、聚唾液酸化、聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)-缀合和/或包含人绒毛膜促性腺激素β亚基的C端肽(CTP)、PAS化、XTEN化、ELP化或HAP化的融合蛋白。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽具有与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的多肽序列。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的多肽序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽用低分子量直链PEG聚乙二醇化。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽用高分子量支链PEG聚乙二醇化。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽是选自以下的同质群体:聚乙二醇化,聚唾液酸化,PLGA缀合和具有人绒毛膜促性腺激素β亚基的CTP、PAS化、XTEN化、ELP化和HAP化的融合蛋白或它们的组合。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽与未修饰的人TFF2多肽相比在血液中具有增加的半衰期。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽在一个或多个特定位点处聚乙二醇化。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2肽在其N-端处聚乙二醇化。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽通过醛-PEG化学使用N-端的聚乙二醇化进行聚乙二醇化。

13. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2多肽在其C-端处聚乙二醇化。

14. 根据权利要求10所述的组合物,其中聚乙二醇化涉及通过NHS-PEG化学对游离溶剂暴露的胺。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TFF2聚乙二醇化的多肽是同质组合物。

16. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括给所述受试者施用有效量的权利要求1-15中任一项所述的组合物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述癌症是消化系统的癌症。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述消化系统的癌症选自口腔癌、咽癌、口咽癌、食管癌、胃癌、胃部癌症、小肠癌、大肠癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、肝癌、胰腺癌和胆囊癌中的一种或多种。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是结肠癌。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是口咽癌。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是食管癌。

22. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是胃癌。
23. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。
24. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是直肠癌。
25. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是肝癌。
26. 根据权利要求16-25中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症。
27. 根据权利要求16-26中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述癌症。
28. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其中所述癌症对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗没有应答;其中用权利要求1-15中任一项所述的组合物治疗所述受试者,其中在用所述经修饰的TFF2多肽组合物治疗以后,所述受试者的癌症变得对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗敏感;且其中随后在用所述经修饰的TFF2多肽治疗后约1至约60天内用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述受试者。
29. 一种经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2多肽包含融合蛋白。
30. 根据权利要求29所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述融合蛋白选自TFF2-白蛋白蛋白、TFF2-IgG1融合蛋白和TFF2-多组氨酸-标签中的一种或多种。
31. 根据权利要求30所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述融合蛋白是多组氨酸标签。
32. 根据权利要求31所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述组氨酸标签含有氨基酸切割位点。
33. 根据权利要求32所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述氨基酸切割位点选自SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23。
34. 根据权利要求32-33中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中在切割后形成天然的TFF2多肽。
35. 根据权利要求31-34中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述组氨酸标签是在TFF2的N-端或C-端。
36. 根据权利要求29-35中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,所述多肽进一步包含:1) 纯化所述TFF2肽;和2) 制备纯化的经修饰的TFF2的聚乙二醇化形式、纯化的经修饰的TFF2的聚唾液酸化形式和/或纯化的经修饰的TFF2与聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)的缀合物。
37. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的一种或多种权利要求29-36中任一项所述的经修饰的TFF2多肽。
38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述癌症是消化系统的癌症。
39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述消化系统的癌症选自口腔癌、咽癌、口咽癌、食管癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌、胃部癌症、直肠癌、肛门癌、肝癌、胰腺癌和胆囊癌中的一种或多种。
40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是结肠癌。
41. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是口咽癌。
42. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是食管癌。
43. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是胃癌。
44. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

45. 根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是直肠癌。
46. 根据权利要求39所述的方法,其中治疗的癌症是肝癌。
47. 根据权利要求37-46中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症。
48. 根据权利要求37-47中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述癌症。
49. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其中所述癌症对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗没有应答;其中用权利要求29-36中任一项所述的经修饰的TFF2多肽治疗所述受试者,其中在用经修饰的TFF2多肽治疗以后,所述受试者的癌症变得对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗敏感;且其中随后在用经修饰的TFF2多肽治疗后约1至约60天内用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述受试者。
50. 一种用于在有需要的受试者中治疗炎性肠病 (IBD) 的方法,其中用一种或多种权利要求1-15中任一项所述的组合物或一种或多种权利要求29-36中任一项所述的经修饰的TFF2多肽治疗所述受试者。
51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述IBD是克罗恩病或溃疡性结肠炎。
52. 根据权利要求50或51所述的方法,其中口服地、静脉内地或肌肉内地施用所述组合物或经修饰的TFF2多肽。
53. 一种包含一个或多个结构域I结合结构域的经修饰的TFF2多肽,其中所述一个或多个结构域I结合结构域包含SEQ ID NO:24,其中所述多肽不含结构域II结合结构域。
54. 一种包含一个或多个结构域II结合结构域的经修饰的TFF2多肽,其中所述一个或多个结构域II结合结构域包含SEQ ID NO:25,且其中所述多肽不含结构域I结合结构域。
55. 一种包含两个结构域I结合结构域的经修饰的TFF2多肽,如SEQ ID NO:26所示。
56. 一种包含两个结构域II结合结构域的经修饰的TFF2多肽,如SEQ ID NO:27所示。
57. 一种经修饰的TFF2多肽,其包含彼此互换的结构域I结合结构域和结构域II结合结构域且包含SEQ ID NO:28所示的序列。
58. 一种经修饰的TFF2多肽,其含有在受体结合位点残基中的氨基酸置换且具有序列SEQ ID NO:29。
59. 一种经修饰的TFF2多肽,其含有在受体结合位点残基中的氨基酸置换且具有序列SEQ ID NO:30。
60. 一种经修饰的TFF2多肽,其含有在受体结合位点残基中的氨基酸置换且具有序列SEQ ID NO:31。
61. 根据权利要求53-60中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述TFF2结合结构域进一步通过以下一种或多种进行修饰:聚乙二醇化、聚唾液酸化、与聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)缀合和/或表达为融合蛋白,包括选自由人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的C端肽(CTP)、PAS化的融合多肽、XTEN化的融合多肽、ELP化的融合多肽和HAP化的融合多肽组成的组的融合多肽。
62. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域用低分子量直链PEG聚乙二醇化。
63. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域用高分子量支链PEG聚乙二醇化。

64. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域在一个或多个特定位点处聚乙二醇化。

65. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域在其N-端处聚乙二醇化。

66. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域通过醛-PEG化学使用N-端的聚乙二醇化进行聚乙二醇化。

67. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2结合结构域在其C-端处聚乙二醇化。

68. 根据权利要求61所述的经修饰的TFF2多肽,其中聚乙二醇化涉及通过NHS-PEG化学对游离溶剂暴露的胺。

69. 根据权利要求53-68中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2多肽是同质组合物的一部分。

70. 根据权利要求53-69中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2多肽是药物组合物的一部分。

71. 根据权利要求53-70中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2多肽与SEQ ID NO:6的人野生型TFF2多肽相比在血液中具有增加的半衰期。

72. 根据权利要求53-68中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中使用人绒毛膜促性腺激素的C端肽(CTP)来改善经修饰的TFF2多肽的药代动力学(PK)和药效动力学(PD)性质。

73. 根据权利要求53-72中任一项所述的经修饰的TFF2多肽,其中所述经修饰的TFF2多肽被糖基化。

74. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的一种或多种权利要求53-73中任一项所述的经修饰的TFF2多肽。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述癌症是消化系统的癌症。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述消化系统的癌症选自口腔癌、咽癌、口咽癌、食管癌、胃部癌症、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、肝癌、胰腺癌和胆囊癌中的一种或多种。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是结肠癌。

78. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是口咽癌。

79. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是食管癌。

80. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是胃癌。

81. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

82. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是直肠癌。

83. 根据权利要求76所述的方法,其中治疗的癌症是肝癌。

84. 根据权利要求74-83中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症。

85. 根据权利要求74-84中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述癌症。

86. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其中所述癌症对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗没有应答;其中用一种或多种权利要求53-73中任一项所述的经修饰的TFF2多肽治疗所述受试者,其中在用经修饰的TFF2多肽治疗以后,所述受试者的

癌症变得对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗敏感；且其中随后在用经修饰的TFF2多肽治疗以后约1至约60天内用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述受试者。

87. 一种用于在需要治疗的受试者中治疗炎性肠病 (IBD) 的方法，其中用一种或多种权利要求53-73中任一项所述的经修饰的TFF2多肽治疗所述受试者。

88. 根据权利要求87所述的方法，其中所述IBD是克罗恩病或溃疡性结肠炎。

89. 根据权利要求87或88所述的方法，其中口服地、静脉内地或肌肉内地施用所述经修饰的TFF2多肽。

90. 一种用于在有需要的受试者中治疗COVID-19的方法，所述方法包括给所述受试者施用一种或多种权利要求1-15中任一项所述的组合物、一种或多种权利要求29-36中任一项所述的经修饰的TFF2多肽或一种或多种权利要求53-73中的任一项所述的经修饰的TFF2多肽。

91. 根据权利要求90所述的方法，其中口服地、静脉内地或肌肉内地施用所述经修饰的TFF2多肽。

92. 根据权利要求90或91所述的方法，所述方法进一步包括施用抑制或减少SARS-CoV-2复制的药剂。

93. 根据权利要求90-92中的任一项所述的方法，所述方法进一步包括施用选自以下组成的组的抗病毒剂：利巴韦林、干扰素 (alfacon-1)、氯喹、羟氯喹、EIDD-2801、EIDD-1931、GS-5734、GS-441524、伊维菌素、法匹拉韦、吡啶美辛、氯丙嗪、喷昔洛韦、蔡莫司他、卡莫司他、硝唑尼特、瑞德西韦、法莫替丁和地塞米松。

经修饰的TFF2多肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年8月27日提交的美国临时申请号62/892,520、2019年12月4日提交的美国临时申请号62/943,803和2020年6月18日提交的美国临时申请号63/041,097的优先权,它们的内容特此通过引用整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用整体并入。所述ASCII副本创建于2020年8月27日,命名为104545-0046-W01_SL.txt,大小是37,566字节。

技术领域

[0005] 本公开内容属于使用经修饰的TFF2多肽治疗患有癌症和/或炎症病症的受试者的领域。

背景技术

[0006] 三叶家族因子-2 (TFF2) (也被称作胰腺解痉多肽、PSP,或解痉肽、SP) 是三叶因子肽家族的一个成员。人TFF2是一种106个氨基酸的分泌蛋白。成熟的人TFF2是一种12kDa蛋白,其含有被七个残基隔开的两个三叶结构域,其在包括猪在内的其它物种中是高度保守的。已经解析了猪TFF2的晶体结构(De A等人,(1994)Proc Natl Acad Sci USA 91(3):1084-8)。猪TFF2的溶液结构已通过NMR进行了研究(Carr,MD等人,(1994)Proc Natl Acad Sci USA 91(6):2206-10)。在三叶结构域中有六个保守的半胱氨酸残基,它们形成三个分子内二硫键,从而产生以三环结构堆叠的三个环(May FEB,等人(2000),Gut,46:454-459)。在胃液中的一部分人TFF2通过N-键被糖基化,可能是在Asn(15)上(May FEB等人,Gut 2000 46(4):454-9)。

[0007] TFF2主要在十二指肠的Brunner氏腺中和人胃窦中表达,并已被证明在胃和肠腔中具有功能性作用(Jorgenson,K.H.,和Jacobsen H.E.,(1982)Regul Pept.,3:207-219)。胃泌素已被证明通过胃泌素响应性顺式作用元件和通过信号传导途径调节TFF2启动子(Tu,S.等人,(2007),Am J Physiol.Gastrointest Liver Physiol.,292(6):G1726-37)。在邻近粘膜溃疡的细胞中也发现高浓度的TFF2(Wright N.A.,Poulsom R.,Stamp G.W.(1990)J Pathol.;162:279-284)。

[0008] 敲除(KO)小鼠中的TFF2缺乏会加重葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎(Judd LM等人,Am J.Physiol Gastrointest Liver Physiol.(2015)308(1):G12-24)。有人认为,TFF2通过稳定和增强粘蛋白凝胶、减少炎症和刺激上皮重建来保护胃肠道粘膜免受损伤。Cook等人证实了TFF2由淋巴细胞表达并在淋巴细胞上有活性(Cook等人,(1999),FEBS Lett.,456(1):155-9)。Dubeykovskaya等人证实,TFF2是一种淋巴细胞激活多肽,并充当CXCR4受体(也被称作C-X-C趋化因子受体4型、融合素或CD184)的激活配体(Dubeykovskaya,Z.Dubeykovskaya,A.,Wang,J.,(2009),J Biol Chem.,284(6):3650-62)。TFF2也在脾脏中

表达,并且认为循环中的TFF2具有免疫调节作用(Dubeykovskaya Z,等人.Nat Commun.(2016),7:1-11)。

[0009] 外源性TFF2具有差的药代动力学,并被迅速从血浆中消除。通过将TFF2的C-端与人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的羧基端肽(CTP)进行基因融合,并进一步融合Flag尾,产生了经修饰的TFF2(TFF2-CTP-Flag)。重组TFF2-CTP-Flag蛋白已被证明抑制结肠肿瘤生长(Dubeykovskaya,Z.A.等人,(2019),Cancer Gene Therapy,26:48-57)。还已经报道,重组TFF2对胰腺癌具有免疫抑制作用(Sung,Gi-Ho,等人,(2018),Animal Cells and Systems,22:6,368-381)。

[0010] TFF2是一种有吸引力的癌症生物治疗,原因在于它在胃等恶劣的pH环境中是稳定的。已知肿瘤微环境(TME)是低pH,这可以减少其它癌症药剂(诸如单克隆抗体)的结合。

发明内容

[0011] 本公开内容提供了经修饰的TFF2多肽的组合物,所述经修饰的TFF2多肽具有增强的生物活性和药代动力学性质,诸如增加的稳定性和/或体内效能。

[0012] 在某些实施方案中,使用化学修饰实现所公开的经修饰的TFF2多肽的改进性质,所述化学修饰包括聚乙二醇化或聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)和/或聚唾液酸化(PSA)和/或融合蛋白(包括具有人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的C端肽(CTP)、PAS化、同型氨基酸聚合物(HAP)、弹性蛋白样肽(ELP化)、XTEN化的融合蛋白)和这些修饰的组合。

[0013] 如本文中使用的,通过聚乙二醇化、PAS化、PLGA缀合和/或PSA-缀合或具有HAP、ELP化、XTEN化或人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的CTP的融合蛋白和这些修饰的组合修饰的TFF2多肽被称作经修饰的TFF2多肽。

[0014] 本公开内容提供了经修饰的TFF2多肽的组合物,所述经修饰的TFF2多肽包括聚乙二醇化的TFF2、PAS化的TFF2、PLGA修饰的TFF2和/或PSA修饰的TFF2或TFF2融合蛋白(例如,与CTP-肽的融合蛋白、与HAP的融合蛋白或ELP化的TFF2)和这些修饰的组合,以及这些经修饰的TFF2多肽用于治疗癌症、增生、发育异常、炎症病症、消化系统炎症和/或在COVID-19中发生的任何症状的用途。

[0015] 如本文中定义的,术语“有效量”是指经修饰的TFF2多肽的量,该量是至少部分地获得期望的应答、或延迟发作或抑制进展、或完全停止正在治疗的特定病症的发作或进展所必需的量。

[0016] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽是同质的并且与未修饰的或天然的人TFF2多肽相比具有改善的药代动力学性质。

[0017] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0018] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽具有与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的多肽序列。

[0019] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性。

[0020] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽用低分子量直链PEG聚乙二醇化。

[0021] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽用高分子量支链PEG聚乙二醇化。

[0022] 在某些实施方案中,与未修饰的人TFF2多肽诸如SEQ ID NO:6相比,所述经修饰的TFF2多肽在血液中具有增加的半衰期。

[0023] 在一个实施方案中,与未聚乙二醇化的人TFF2多肽相比,聚乙二醇化的TFF2多肽在血液中具有增加的半衰期。

[0024] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽在一个或多个特定位置处被聚乙二醇化。

[0025] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽在N-端处被聚乙二醇化。

[0026] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽通过醛-PEG化学在N-端处被聚乙二醇化。

[0027] 在其它实施方案中,本文描述的聚乙二醇化的TFF2多肽在C-端处被再次聚乙二醇化。

[0028] 在某些实施方案中,本文描述的TFF2多肽的聚乙二醇化涉及通过NHS-PEG化学对游离溶剂暴露的胺。

[0029] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽包括融合蛋白,诸如人绒毛膜促性腺激素β亚基的C端肽(CTP)。

[0030] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽是缀合物多肽,诸如PLGA的缀合物。

[0031] 在某些实施方案中,本文中公开了TFF2多肽融合多肽,其选自由以下组成的组中的一种或多种:TFF2白蛋白-融合蛋白、TFF2-IgG1融合蛋白和TFF2-亲和标签融合蛋白。

[0032] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽是与多组氨酸标签的融合蛋白。在某些实施方案中,所述组氨酸标签含有氨基酸切割位点。在某些实施方案中,所述组氨酸标签切割位点选自SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23。

[0033] 在某些实施方案中,通过从TFF2的融合蛋白除去多组氨酸标签而形成天然TFF2多肽。

[0034] 在某些实施方案中,所述组氨酸标签是在TFF2多肽的N-端或C-端。

[0035] 在其它实施方案中,在切割组氨酸标签以后,通过下述形成经修饰的TFF2多肽:1) 纯化TFF2肽;和2) 制备聚乙二醇化的TFF2多肽、聚唾液酸化的TFF2多肽和/或纯化的经修饰的TFF2与聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)的缀合物。

[0036] 在本发明的另一个方面是经修饰的TFF2多肽,其具有对由SEQ ID NO:26-28和图1表示的结合结构域的变化。

[0037] 在本发明的另一个方面是经修饰的TFF2多肽,其具有对由SEQ ID NO:29-31和图2表示的受体结合位点残基的变化。

[0038] 在某些实施方案中,由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽通过聚乙二醇化、聚唾液酸化、与PLGA缀合和/或表达为融合蛋白(包括选自由以下组成的组的融合多肽:人绒毛膜促性腺激素β亚基的C端肽(CTP)、PAS化的融合多肽、XTEN化融合多肽、ELP化的融合多肽和HAP化的融合多肽)中的一种或多种进一步修饰。

[0039] 在某些实施方案中,由SEQ ID NO:29-31表示的经修饰的TFF2肽通过聚乙二醇化、聚唾液酸化、与PLGA缀合和/或表达为融合蛋白(包括选自由以下组成的组的融合多肽:人

绒毛膜促性腺激素 β 亚基的C端肽(CTP)、PAS化的融合多肽、XTEN化融合多肽、ELP化的融合多肽和/或HAP化的融合多肽)中的一种或多种进一步修饰。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:6的未修饰的人TFF2相比,这些经修饰的TFF2多肽具有增加的在血液中的半衰期和/或改善的药效动力学性质。

[0040] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽用低分子量直链PEG聚乙二醇化。

[0041] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽用高分子量支链PEG聚乙二醇化。

[0042] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽在一个或多个特定位点处聚乙二醇化。

[0043] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽在其N-端处聚乙二醇化。

[0044] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽通过醛-PEG化学使用N-端的聚乙二醇化进行聚乙二醇化。

[0045] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,经修饰的TFF2结合结构域多肽在其C-端处聚乙二醇化。

[0046] 在某些实施方案中,当由SEQ ID NO:26-31表示的经修饰的TFF2肽被聚乙二醇化时,聚乙二醇化涉及通过NHS-PEG化学对游离溶剂暴露的胺。

[0047] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2肽被糖基化。

[0048] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽是在同质组合物中。

[0049] 在某些实施方案中,本文描述的经修饰的TFF2多肽是在药物组合物中,所述药物组合物可能含有一种或多种赋形剂。

[0050] 在某些实施方案中,所述药物组合物是经修饰的TFF2多肽的同质群体,所述经修饰的TFF2多肽选自如下修饰的TFF2多肽:聚乙二醇化、聚唾液酸化、与PLGA缀合或融合多肽(具有人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的CTP、PAS化、XTEN化、ELP化、HAP化的形式)或这些修饰的组合。

[0051] 本公开内容的一个方面是在需要治疗的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的如在本文中公开的一种或多种经修饰的TFF2多肽,由此治疗所述癌症。

[0052] 在本公开内容的一个实施方案中,所述癌症是消化系统的癌症,例如、但不限于,口腔癌、咽癌、口咽癌、食管癌、胃部癌症、小肠癌、大肠癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌或结肠癌。

[0053] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是口咽癌。

[0054] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是食管癌。

[0055] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是胃癌。

[0056] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是胰腺癌。

[0057] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是结肠癌。

[0058] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是直肠癌。

- [0059] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是肛门癌。
- [0060] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是肝癌。
- [0061] 在某些实施方案中,所治疗的癌症是转移性癌症。
- [0062] 在某些实施方案中,所治疗的癌症还用针对PD-1(程序性细胞死亡蛋白1、CD279)、PD-L1(程序性死亡-配体1、CD274或B7同系物1[B7-H1])和/或CTLA-4的阻断抗体治疗。
- [0063] 在另一个实施方案中,本文公开了一种在需要治疗的受试者中治疗癌症的方法,其中所述癌症对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗没有应答;其中用本文描述的一种或多种经修饰的TFF2多肽治疗所述受试者,其中在用经修饰的TFF2多肽组合物治疗以后,所述受试者的癌症变得对使用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体的治疗敏感;且其中在用经修饰的TFF2多肽组合物治疗后约1至约60天内,随后用针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的阻断抗体治疗所述受试者。
- [0064] 在某些实施方案中,本文中公开的经修饰的TFF2肽可以与用于治疗消化系统的癌症的标准护理组合。在某些实施方案中,在标准护理治疗之前、并行地或之后施用经修饰的TFF2多肽。
- [0065] 在本发明的另一个方面是用于在需要治疗的受试者中治疗炎症病症(诸如消化系统炎症)的方法,其包括给所述受试者施用经修饰的TFF2多肽。
- [0066] 在一个实施方案中,所述消化系统炎症是炎性肠病(IBD),包括、但不限于溃疡性结肠炎和克罗恩病。
- [0067] 在某些用于治疗炎症病症的实施方案中,口服地、静脉内地或肌肉内地施用本文中公开的经修饰的TFF2多肽。
- [0068] 本公开内容的另一个方面提供了一种用于治疗COVID-19或在有需要的受试者中发生的任何并发症的方法,所述方法包括给所述受试者施用本公开内容的一种或多种组合物或本公开内容的一种或多种经修饰的TFF2多肽。
- [0069] 在本公开内容的任何方法的某些实施方案中,可以在用于治疗炎症性疾病的标准护理之前、并行地或之后施用经修饰的TFF2多肽。
- [0070] 优选地将经修饰的TFF2多肽以“治疗有效量”或“期望量”施用给个体,所述量足以显示出对个体的益处。
- [0071] 在用于治疗COVID-19的方法的某些实施方案中,所述方法进一步包括施用抑制或减少SARS-CoV-2复制的药剂。
- [0072] 在用于治疗COVID-19的方法的某些实施方案中,所述方法进一步包括施用选自以下组成的组的抗病毒剂:利巴韦林、干扰素(alfacon-1)、氯喹、羟氯喹、EIDD-2801、EIDD-1931、GS-5734、GS-441524、伊维菌素、法匹拉韦、吡啶美辛、氯丙嗪、喷昔洛韦、蔡莫司他、卡莫司他、硝唑尼特、瑞德西韦、法莫替丁和地塞米松。

附图说明

- [0073] 图1:描绘了在本申请中公开的嵌合的重组的经修饰的TFF2多肽结构域(D)交换肽。
- [0074] 图2:描绘了在本申请中公开的嵌合的重组的经修饰的TFF2多肽配体结合结构域(LBD)交换肽。

[0075] 图3A:小鼠(C57BL/6 WT)接受偶氮甲烷(AOM;10mg/kg腹膜内),然后在一周后接受在饮用水中的2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)持续7天。(SAC=处死)。图3B-D:AOM/DSS处理的小鼠在AOM后10周形成肿瘤并在AOM后17周发生腺癌。图3B:总体图像。比例条为5mm。在远侧结肠中更常见到肿瘤。图3C:对肉眼可见的肿瘤计数,并使用ImageJ Fiji测量肿瘤面积。图3D:苏木精和伊红(H&E)染色。在AOM后10周检测到增加的粘膜内免疫细胞浸润。

[0076] 图4A:来自AOM/DSS处理的C57BL/6WT小鼠的结肠组织上的CD45、CD11b和PD-L1的免疫染色。CD11b+髓样细胞和PD-L1表达随着肿瘤发展而增加。图4B和4C:通过流式细胞术对肿瘤内髓样细胞的免疫表型确定(CD45+的百分比)。CD11b+Gr-1+MDSC以及粒细胞(CD11b+Ly6G+)和单核细胞(CD11b+Ly6G-Ly6C+) MDSC子集在肿瘤中显著增加(参见图4B)。巨噬细胞(MQ;CD11b Ly6C-F4/80+)和树突细胞(DC;CD11c+F4/80-) (参见图4C)。

[0077] 图5A和5B:通过流式细胞术对肿瘤浸润性T细胞的免疫表型确定(CD45+的百分比)。T细胞的比例随着肿瘤发展而下降;该下降由CD8+ T细胞的减少驱动(图5A)。CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞(Treg)在肿瘤的晚期增加,从而导致CD8+ T细胞:Treg比率的更大下降(图5B)。图5C:在CRC发展过程中免疫细胞子集的动态变化。

[0078] 图6A至6C:R26-LSL-Pd11-EGFP小鼠的产生。R26-LSL-Pd11-IRES-EGFP的基因构建体(图6A)。在R26-PD-L1和LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠中,在脾CD11b-和CD11b+细胞中,通过流式细胞术确定的内源性GFP表达(图6B)和通过qPCR确定的Pd11基因表达(图6C)。图6D:描绘AOM/DSS对CRC的诱导的实验方案。图6E:在AOM后10周结直肠肿瘤的总图。比例条为5mm。图6F:对肿瘤数目计数,并测量肿瘤面积。应当指出,用AOM/DSS处理的LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠表现出显著增强的早期结直肠肿瘤发生。

[0079] 图7A和B:TFF2过表达(CD2-Tff2小鼠)(图7A)和与对照Ad-Fc相比用腺病毒Ad-Tff2治疗(图7B)会通过MDSC的抑制赋予对结肠致癌作用的抗性。图7C:融合构建体Tff2-2CTP-3Flag。图7D和7E:TFF2-CTP-Flag延长在血液中的循环时间(图7D),但是保留生物活性(图7E)。Dubeykovskaya等人.2016Nat Commun.(图7A-B);2019Cancer Gene Ther.(图7C-E)。

[0080] 图8:小图A:给R26-PD-L1和LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠施用AOM/DSS,并在指示的时间点开始,用融合重组TFF2-CTP-Flag(300μg腹膜内)和/或抗-PD-1(RMP1-14;200μg腹膜内)每周三次进行治疗。小图B:对肿瘤数目计数并测量肿瘤面积。与对照动物相比具有>50%的肿瘤面积减少的小鼠被定义为应答者。应当指出,与对照动物(2/5;40%)相比,LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠(5/5;100%)对TFF2-CTP和抗-PD-1的组合治疗表现出更高应答率。

[0081] 图9:小图A:在CD45+细胞中CD3+CD8+ T细胞的比例和在肿瘤中CD8+ T细胞与Treg的比率。应当指出,应答者具有更丰富的肿瘤浸润性CD8+ T细胞和更高的CD8+ T细胞与Treg的比率。小图B:在不同治疗后肿瘤内髓样细胞的免疫表型确定。在应答者中观察到MDSC、尤其是M-MDSC的显著减少。应答者也表现出更低的单核细胞与MQ的比率。

[0082] 图10:不同的TFF2-HSA融合蛋白的蛋白A纯化的SDS-PAGE(非还原条件)。泳道1:标志物;泳道2:TFF2-HSA[WT];泳道3:TFF2-HSA[D I/I];泳道4:TFF2-HSA[D II/I];泳道5:TFF2-HSA[D II/II];泳道6:TFF2-HSA[LBD I/I];泳道7:TFF2-HSA[LBD II/I];泳道8:TFF2-HSA[LBD II/II]。

[0083] 图11:在图10中描述的纯化的TFF2-HSA融合蛋白的产率。

具体实施方式

[0084] 除非上下文另外清楚地指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式。在权利要求书和/或说明书中,术语“一个”或“一种”当与术语“包含”结合使用时可以表示“一个/一种”,但它也与“一个或多个/一种或多种”、“至少一个/至少一种”以及“一个或多个/一种或多种”的含义一致。

[0085] 本文中使用的术语“约”在本文中用于表示大约、大致、约或在一定范围内。当术语“约”与数字范围结合使用时,它通过将边界向所述数值的上下延伸来修改该范围。一般而言,术语“约”在本文中用于通过上下(更高或更低)20%的偏差将数值修改为高于和低于所述值的数值。

[0086] 在一个实施方案中,用于聚乙二醇化、聚唾液酸化(PSA)或与PLGA缀合的经修饰的TFF2多肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成。SEQ ID NO:1代表人TFF2多肽。显示的序列被进一步加工成成熟形式(SEQ ID NO:6)。SEQ ID NO:2代表编码TFF2的人核苷酸序列,其中标有下划线的和粗体的“ATG”代表起始密码子。与TFF2有关的序列信息可通过GenBank登录号NP_005414(蛋白)和NM_005423(核酸)在公开数据库中得到。

[0087] MGRRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKPSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD QCFDNGCCFD SSVTGVPWCF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE CASRKCCFSN FIFEVPWCFF PKSVEDCHY (SEQ ID NO:1)

[0088] 除去信号肽后,人TFF2肽具有下述氨基酸序列:

[0089] 天然的-人TFF2(106 AA)

[0090] EKPSPCQCSRLSPHNRTNCGFPGITSDQCFDNGCCFDSSVTGVPWCFHPLPKQESDQCVMEVSDRRNC GYPGISPEECASRKCCFSNFIFEVPWCFFPKSVEDCHY (SEQ ID NO:6)

[0091] SEQ ID NO:2是与TFF2(核苷酸1-717)对应的人野生型核苷酸序列,其中标有下划线的和粗体的“ATG”表示开放读码框的开始:

[0092] 1 cacggtggaa gggctggggc cacggggcag agaagaaagg ttatctctgc ttgttgaca

```
61 aacagagggg agattataaa acatacccg gagtggacac catgcattct gcaagccacc
121 ctggggtgca gctgagctag acatgggacg gcgagacgcc cagctcctgg cagcgtctct
181 cgtcctgggg ctatgtgccc tggcggggag tgagaaaccc tccccctgcc agtgcctccag
241 gctgagcccc cataacagga cgaactgcgg ctccctgga atcaccagt accagtgttt
301 tgacaatgga tgctgtttcg actccagtgt cactggggtc ccttggtgtt tccacccct
[0093] 361 cccaaagcaa gattcggtac agtgcgtcat ggaggtctca gaccgaagaa actgtggcta
421 cccgggcatc agccccgagg aatgcgcctc tcggaagtgc tgcttctcca atttcatctt
481 tgaagtcccc tgggtcttct tccgaagtc tgtggaagac tgccattact aagagaggt
541 ggttccagag gatgcattct gctcaccggg tgttccgaaa ccaagaaga aacttcgct
601 tatcagcttc atacttcatg aaatcctggg ttttcttaac catcttttcc tcattttcaa
661 tggtttaaca tataatttct ttaataaaaa cccttaaaat ctgctaaaaa aaaaaaa (SEQ ID NO: 2)
```

[0094] 在本公开内容的不同方面的上下文中,术语“多肽”表示通过肽键键合在一起的氨基酸的单条直链,优选包含至少约21个氨基酸。多肽可以是由超过一条链组成的蛋白的一条链,或者如果蛋白由一条链组成,多肽可以是蛋白本身。术语“多肽”包括这样的氨基链直链的糖基化(即,糖蛋白)和未糖基化形式以及糖基化和未糖基化形式的混合物。

[0095] 在另一个实施方案中,用于聚乙二醇化、聚唾液酸化或与PLGA缀合的经修饰的TFF2多肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,该序列代表小鼠TFF2多肽(登录号NP_033389)。

[0096] SEQ ID NO:3描绘了小鼠TFF2的氨基酸序列,包括信号肽:

```
[0097] MRPRGAPLLA VVLVLGLHAL VEGEKPSPCR CSRLTPHNRK NCGFPGITSE QCFDLGCCFD
SSVAGVPWCF HPLPNQESEQ CVMEVSARKN CGYPGISPED CASRNCCFSN LIFEVPWCFF PQSVEDCHY
(SEQ ID NO:3)
```

[0098] SEQ ID NO:4代表小家鼠(Mus musculus)TFF2核苷酸序列登记号NM_009363。

```
[0099] ATTCTGCAGGCTGCCAGGTCCAGTGGAGCAGACATGCGACCTCGAGGTGCCCCCTGCTGGCAGTGG
TCCTGGTTTTGGGACTGCATGCTCTGGTAGAGGGCGAGAAACCTTCCCCCTGTCGGTGCTCCAGGCTGACACCCCA
CAACAGAAAGAACTGTGGCTTCCCGGGCATCACCAGTGAGCAGTGCTTTGATCTTGGATGCTGCTTTGACTCTAGC
GTCGCTGGGGTCCCTTGGTGTTCACCCACTTCCAAACCAAGAATCGGAGCAGTGTGTCATGGAAGTGTGAGCTC
GCAAGAATTGTGGGTACCCGGGCATCAGTCCCGAGGACTGTGCCAGTCGAAACTGCTGCTTTTCCAACCTGATCTT
TGAAGTGCCCTGGTGTTCCTTCCACAGTCTGTGGAAGATTGTCACTACTGAGAGTTGCTACTGCCGAGCCACCCG
TTCCCTGGGAGCTGCAAGCCAGAAGAAAGTTTCAACCAGACTTCATCAATCTCTGGGGTTTCTAAAACCATCTTGA
CCCTTAGCAGTGGCTAGACACAGCATTTTCCAAGTAAAGAAAAGTTG (SEQ ID NO:4)
```

[0100] May FEB等人(2000),Gut,46:454-459(其通过引用并入本文)描述了用于收集、制备、分离和测序人TFF2的方法。

[0101] 在某些实施方案中,聚乙二醇化、聚唾液酸化或与PLGA缀合的蛋白/多肽可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的变体,所述变体与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约46%至约50%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约50.1%至约55%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约55.1%至约60%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或

10具有至少约60.1%至约65%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有约65.1%至约70%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约70.1%至约75%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约75.1%至约80%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约80.1%至约85%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约85.1%至约90%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约90.1%至约95%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约95.1%至约97%的同一性,或与SEQ ID NO:1、3或10具有至少约97.1%至约99%的同一性。

[0102] 在某些实施方案中,从密码子优化的DNA生产经修饰的TFF2多肽(参见实施例1-4)。

[0103] 在某些实施方案中,聚乙二醇化的或PAS化的经修饰的TFF2多肽是杂合肽,诸如但不限于:具有His-标签的经修饰的TFF2多肽;TFF2-C-端HULG1 FC-标签,TFF2-HSA,TFF2-CTP,TFF2-CTP-FLAG,TFF2-FLAG。

[0104] 在某些实施方案中,使用人绒毛膜促性腺激素的C端肽(CTP)来改善本文描述的经修饰的TFF2多肽的药代动力学(PK)和药效动力学(PD)性质(Calo,等人,(2015),Precision Medicine,2:e989)。

[0105] 在某些实施方案中,将聚乙二醇化的或PAS化的经修饰的TFF2多肽截短。

[0106] 在其它实施方案中,将聚乙二醇化的或PAS化的经修饰的TFF2多肽糖基化。

[0107] 在某些实施方案中,与野生型相比,人聚乙二醇化的或PAS化的经修饰的TFF2多肽含有保守氨基酸变化。保守的氨基酸突变或保守的氨基酸置换是在多肽中将一种氨基酸变为具有类似生化性质(例如,电荷、疏水性和大小)的不同氨基酸的氨基酸置换。例如,一种脂族氨基酸可以被另一种脂族氨基酸替换,等等(参见表1)。使用基于Dayhoff矩阵的矩阵,也可以确定保守氨基酸变化,例如,参见Altschul,SF,(1991),Journal of Molecular Biology 219(3):555-65。

[0108] 表1

[0109]	类别	氨基酸	I 字母代码
	脂族	甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸	G、A、V、L、I
	含有羟基或硫/硒	丝氨酸、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸	S、C、U、T、M
	环状	脯氨酸	P
	芳族	苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸	F、Y、W
	碱性	组氨酸、赖氨酸、精氨酸	H、K、R
	酸性和它们的酰胺	天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺	D、E、N、Q

[0110] 具有交换结构域(D)和配体结合结构域(LBD)的经修饰的TFF2多肽

[0111] TFF2结构含有两个相对对称的结构域(DI和DII),且每个结构域含有两个推定的配体结合结构域(在DI中的LBDI和在D2中的LBDII)(参见,例如,Carr等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1994),91:2206-2210)。虽然LBDI和LBDII的配体身份未知,但可能各自结合相同的配体,或者它们结合不同的配体。如果它们结合相同的配体,则对该配体

的亲合力可能会不同。TFF2的LBDI和LBDII之一或两者的一种潜在配体是CXCR4受体。如果TFF2在LBDI和LBDII处结合CXCR4受体,那么它将导致在细胞表面上的复合物,具有两个CXCR4受体的有效二聚化。如果LBDI和LBDII结合一种共同的、但与CXCR4不同的受体,那么也预见到这种类型的二聚化。如果LBDI和LBDII各自结合不同的配体,那么预见到导致这样的受体的有效异源二聚化,其中配体之一可以是CXCR4。

[0112] 因此,为了利用TFF2的这些结构特征并制造更有效或超有效的靶配体(包括潜在的CXCR4)的激活剂,已经采用LBD和D交换来制造TFF2蛋白的新版本,如图1和2所示。野生型TFF2被称为LBDI/II。如果LBDI和LBDII与相同的反受体相互作用,但LBDI或LBDII对反受体具有更大的结合亲合力,则LBD交换结构域蛋白LBDI/I或LBDII/II以比野生型LBDI/II更高的亲合力与反受体相互作用,并引起比野生型LBDI/II改进的效果。如果LBDI或LBDII具有与其它LBD(分别为LBDII或LBDI)不同的反配体(例如受体),并且如果LBDI/II诱导反受体的异质复合物,则LBD交换版本(诸如LBDI/I或LBDII/II,见下文和图1和图2)诱导反受体同源二聚化,并引发与野生型LBDI/II不同的和改进的效果。二聚化和寡聚化的LBDI和LBDII的一种可能的反受体是CXCR4(Ge B, 等人, (2017) Sci Rep. 7 (1) :16873),使得LBDI/I或LBDII/II是比野生型TFF2 (LBDI/II) 更有效的CXCR4功能配体。CXCR4也与膜结合的趋化因子受体CCR5和CCR2形成异源二聚体(Gahbauer, S等人 (2018) PLoS Comput Biol. 14 (3) : e1006062)。某些经修饰的TFF2多肽(由LBD交换cDNA构建体编码)、模拟物和其它物质抑制TFF2-反受体(包括CXCR4)的同源和非同源配体的功能。CXCR4的配体的例子包括间质衍生的因子-1 α (SDF-1 α 或CXCL12)、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)和细胞外泛素。SDF-1 α 是结合并激活CXCR4的CXCR4的同源配体。MIF是触发CXCR4信号传导的CXCR4的非同源配体(Bernhagen, J等人 (2007) Nature Medicine 13 (5) :587-96)。细胞外泛素是CXCR4的配体(Saini, V等人 (2010) J Biol Chem 285 (20) 15566; Scofield, SLC等人 (2018) Life Sci. 211:8)。

[0113] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有人TFF2的一个或多个结构域I (DI) 区域。

[0114] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有人TFF2的一个或多个DII区域。

[0115] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有人TFF2的DI和DII区域二者。

[0116] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有具有下述序列的结构域:

[0117] 人TFF2结构域I (残基8-46)

[0118] CSRLSPHNRTNCGFPGITSDQCFDNGCCFDSSVTGVPWC (SEQ ID NO:24)

[0119] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有具有下述序列的结构域(参见,图1):

[0120] 人TFF2结构域II (残基58-95)

[0121] CVMEVSDRRNCGYPGISPEECASRKCCFSNFIFEVPWC (SEQ ID NO:25)

[0122] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽含有两个具有下述序列的DI区域:

[0123] 人TFF2-结构域I/I变体 (DI/I, 107AA) -两个结构域I区域 (参见图1)

[0124] EKPSPCQCSRLSPHNRTNCGFPGITSDQCFDNGCCFDSSVTGVPWCFHPLPKQESDQCSRLSPHNRTNCGFPGITSDQCFDNGCCFDSSVTGVPWCFFPKSVEDCHY (SEQ ID NO:26)

[0125] 在某些实施方案中,经修饰的TFF2多肽含有两个具有下述序列的D II区域:

[0126] 人TFF2-结构域II/II变体(D II/II,105AA)-两个结构域II区域(参见图1)

化、ELP化、人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的CTP和/或和这些修饰的组合而修饰的融合蛋白。

[0145] 在某些实施方案中,使用人绒毛膜促性腺激素的C端肽(CTP)来改善本文描述的经修饰的TFF2多肽(诸如由SEQ ID NO:24-32描述的那些)的药代动力学(PK)和药效动力学(PD)性质。

[0146] 在某些实施方案中,所述经修饰的TFF2多肽(诸如由SEQ ID NO:24-32描述的那些)被糖基化。

[0147] 将通过钙通量、细胞迁移和细胞外信号相关激酶(ERK) ERK1和ERK2的活化来试验具有LBD和/或D交换区域的经修饰的TFF2多肽的效能。将使用CXCR4抑制剂AMD3100或mAb 12G5研究对CXCR4的作用的特异性。将通过它们的阻断mAb 2B11的结合的能力来评估LBD和D交换蛋白的结合(Dubeykovskaya, Z. Dubeykovskaya, A., Wang, J., (2009), J Biol Chem., 284 (6):3650-62)。

[0148] ERK1/2的磷酸化的测定

[0149] 在某些实施方案中,通过使用Perkin Elmer的AlphaLISA SureFire Ultra p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 测定试剂盒,通过Jurkat人急性T细胞白血病细胞中ERK1/ERK2的磷酸化来测量TFF2活性。将ATCC提供的Jurkat细胞按照ATCC提供的说明书进行解冻和扩增。通过离心收获细胞,并以 10^7 个细胞/mL重新悬浮在HBSS中。将细胞以4mL细胞/孔接种到384孔白色不透明培养板(PerkinElmer)中,并在37°C温育1-2小时。将4 μ L重组TFF2的野生型和变体(在含有0.1%BSA的HBSS中,浓度为10-30mg/mL)加入平板以刺激细胞,并在37°C温育5-30分钟。将细胞用2 μ L/孔的裂解缓冲液裂解,随后加入5mL受体混合物(Acceptor Mix)。然后将平板用Topseal-A粘性膜密封,并在室温温育1小时。然后在暗光下向孔中加入5mL供体混合物(Donor Mix),用Topseal-A粘性膜密封,用箔覆盖,并在室温在暗处温育1小时。使用标准的AlphaPlex设置在AlphaPlex相容平板读数器上读出平板。用AMD3100 (Sigma) (一种CXCR4小分子拮抗剂)或抗-CXCR4 mAb 12G5和2B11 (eBioscience) 在37°C进行CXCR4的TFF2刺激的抑制1-2小时,然后加入重组TFF2。

[0150] 聚乙二醇化

[0151] 在某些情况下,基于蛋白的药物作为治疗剂存在问题,因为它们可能迅速降解并从患者排出,从而导致频繁的计量给药,这可能增加分子的免疫原性潜力,且也会增加治疗成本(Dozier, J.K., 和Distefano M.D., (2015), Int, J. Mol. Sci., 16:25831-25864)。由于TFF2蛋白在循环中的差半衰期, TFF2蛋白已被证明具有差的药代动力学(Dubeykovskaya, Z.A.等人, (2019), Cancer Gene Therapy, 26:48-57)。用聚乙二醇(PEG)化学修饰的蛋白已经显示出改善的药理学性质,包括增加的血清半衰期、改善的溶解度、更好的物理和热稳定性、防止酶降解、增加的溶解度、减少的毒性和降低的免疫原性。

[0152] 除了聚乙二醇化对药代动力学参数的有益影响外,聚乙二醇化本身也可能增强活性。例如,PEG-IL-10已被证明比未聚乙二醇化的IL-10对某些癌症更有效(参见,例如,EP 206636A2)。

[0153] 本公开内容涵盖其它聚合物(例如,聚丙二醇或聚氧乙烯)的应用。

[0154] 本公开内容的一个方面是与全长TFF2多肽相比聚乙二醇化的经修饰的TFF2多肽诸如SEQ ID NO:1的多肽或其变体。可以使用任何合适的聚乙二醇化方法。本领域已知多肽的聚乙二醇化,参见,例如,美国专利号6,420,339、7,610,156、5,766,897、7,052,686和7,

947,473。也参见,例如, Fee, C., 和 Damodaran V.B., Protein PEGylation: An overview of chemistry and process consideration, European Pharmaceutical Review, Issue 1 2010。

[0155] 在本公开内容的一个实施方案中,经修饰的TFF2多肽被聚乙二醇化以增加其体内半衰期(这可以通过降低其肾脏清除率以延长其在血浆中的循环来实现)和/或降低其免疫原性。聚乙二醇化还可以增加疏水药物和蛋白的水溶性。

[0156] 迄今为止用于蛋白缀合的所有聚乙二醇化过程可以大致分为两种类型,即溶液相分批过程和柱上补料分批过程(Fee, Conan J.; Van Alstine, James M. (2006), Chemical Engineering Science, 61 (3): 924)。这涉及将试剂在合适的缓冲溶液中混合在一起,优选地在4-6°C的温度,然后基于其物理化学性质使用合适的技术分离和纯化期望的产物,所述技术包括尺寸排阻色谱法(SEC)、离子交换色谱法(IEX)、疏水相互作用色谱法(HIC)和膜或水性双相系统(Veronese, Francesco M. (2009) 编。“Protein conjugates purification and characterization”. PEGylated protein drugs basic science and clinical applications (在线-Ausg版)。Basel: **Birkhäuser**. 第113-125页;和Fee, Conan J. (2003), Biotechnology and Bioengineering, 82 (2): 200-6)。

[0157] PEG衍生物合适官能团的选择是基于将与PEG偶联的分子上可用反应基团的类型。对于蛋白,典型的反应性氨基酸包括赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。N-端氨基和C-端羧酸也可以通过与醛功能性聚合物缀合而用作位点特异性位点(Fee, Conan J.; Damodaran, Vinod B. (2012), Biopharmaceutical Production Technology. 第199页)。

[0158] 在某些实施方案中,聚乙二醇化发生在TFF2多肽的一个或两个末端。在每个末端被相同反应部分激活的PEG被称为“同双功能的”,而如果存在的官能团是不同的,则PEG衍生物被称为“异双功能的”或“异功能的”。制备PEG聚合物的化学活性或活化衍生物,以将PEG连接至期望的分子(Pasut, G.; Veronese, F.M. (2012), Journal of Controlled Release. 161 (2): 461-472)。

[0159] 用于形成第一代PEG衍生物的技术通常是使PEG聚合物与特定基团反应,所述特定基团可与羟基反应,通常是酸酐、酰基氯、氯甲酸酯和碳酸酯。在第二代聚乙二醇化化学中,更有效的官能团诸如醛、酯、酰胺等可用于缀合。

[0160] 异双功能的PEG可用于连接两个实体,其中需要亲水的、柔性的和生物相容的间隔物。异双功能的PEG的优选端基为马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、胺、羧酸和NHS酯(参见, WO2011/008495)。

[0161] 可得到第三代聚乙二醇化试剂,其中聚合物已被支链化、Y形化或梳形化,并显示出降低的粘度和器官积聚的缺乏(Ryan, Sinéad M; Mantovani, Giuseppe; Wang, Xuexuan; Haddleton, David M; Brayden, David J (2008), Expert Opinion on Drug Delivery, 5 (4): 371-83)。

[0162] 在一个实施方案中,共价地连接PEG。在另一个实施方案中,所述PEG在半胱氨酸或赖氨酸残基处连接至TFF2多肽。聚乙二醇化可以使用几种PEG连接部分实现,包括、但不限于N-羟基琥珀酰亚胺活性酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜或硫醇。PEG聚合物可以在预定位置连接至TFF2多肽,或者可以随机连接至TFF2多肽。聚乙二醇化也可以通

过连接至TFF2多肽的肽接头介导。也就是说,PEG部分可以连接至融合到TFF2多肽的肽接头,其中所述接头提供PEG连接位点(例如,游离半胱氨酸或赖氨酸)。

[0163] 聚乙二醇化最常发生在多肽N-端的 α -氨基、赖氨酸残基侧链上的 ϵ -氨基和组氨酸残基侧链上的咪唑基。由于大多数重组多肽具有单个 α 和多个 ϵ 氨基和咪唑基团,根据接头化学性质,可以生成众多位置异构体。在此可以应用本领域已知的一般聚乙二醇化策略。PEG可以通过末端反应基团(“间隔物”)与本公开内容的多肽结合,所述末端反应基团介导一个或多个多肽序列的游离氨基或羧基与聚乙二醇之间的键。具有可以结合到游离氨基的间隔物的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,其可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。另一种可以与游离氨基结合的活化聚乙二醇是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪,其可以通过使聚乙二醇单甲基醚与三聚氯氰(cyanuric chloride)反应来制备。与游离羧基结合的活化聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0164] 可以通过各种常规方法进行本公开内容的一个或多个多肽序列与具有间隔物的PEG的缀合。例如,使用4:1至30:1的试剂与蛋白的摩尔比,可以在4°C至室温的温度在pH5-10的溶液中进行缀合反应30分钟至20小时。可以选择反应条件以引导反应朝向主要产生期望的取代度。一般而言,低温、低pH(例如,约pH 5)和短反应时间倾向于减少连接的PEG的数目,而高温、中性至高pH(例如,约pH 7)和较长反应时间倾向于增加连接的PEG的数目。可以使用本领域已知的各种方法来终止反应。在某些实施方案中,通过酸化反应混合物并在例如-20°C冷冻来终止反应。在例如美国专利号5,252,714、5,643,575、5,919,455、5,932,462和5,985,263中讨论了各种多肽的聚乙二醇化。

[0165] 本公开内容也涵盖PEG模拟物的使用。已开发出重组PEG模拟物,其保留PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予几种额外的有利性质。举例来说,可以重组地生产能够形成类似于PEG的延伸构象的简单多肽链(包含例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr),其已经融合到感兴趣的肽或蛋白药物(例如,Amunix'XTEN technology;Mountain View, Calif.)。这就避免了在制造过程中对额外缀合步骤的需要。此外,已确立的分子生物学技术能够控制多肽链的侧链组成,从而优化免疫原性和制造性能。

[0166] 在某些实施方案中,将亲水聚合物添加到TFF2多肽中。亲水聚合物可以(直接地或间接地)连接至经修饰的TFF2多肽。在一个具体实施方案中,使用接头(例如,1-5、5-10或1-10个氨基酸的接头,诸如甘氨酸接头)将亲水聚合物连接至经修饰的TFF2多肽。亲水聚合物可以共价地或非共价地连接至经修饰的TFF2多肽。亲水聚合物可以是基本非结构化的亲水氨基酸聚合物,其为下述的功能类似物:PEG、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、二乙烯基醚-马来酸酐(DIVEMA)、聚噁唑啉、聚磷酸酯、聚膦腈和常规PEG的衍生物(例如,羟基-PEG)。羟基-PEG公开在美国专利号8,129,330和美国专利申请号20120114742中。在某些实施方案中,将两种、三种或更多亲水聚合物连接至TFF2肽。亲水聚合物可以在经修饰的TFF2多肽的C-端、N-端或在C-端和N-端两端处连接至肽。

[0167] 作为本公开内容的一个方面,经修饰的TFF2多肽可以使用多种方法进行聚乙二醇化,包括:1)通过醛-PEG化学对N-端进行聚乙二醇化;和2)通过NHS-PEG化学对游离溶剂暴露的胺(赖氨酸)进行聚乙二醇化。Tureck P.L., 等人, (2016), Journal of Pharmaceutical Sciences, 105:460-475描述了通过醛化学进行聚乙二醇化。使用NHS活化

的PEG衍生物的聚乙二醇化是基于NHS活性酯对伯胺末端的选择性(参见Fee, C. 和 Damodaran V.B., (2010), European Pharmaceutical Review, 第1期)。

[0168] 本文中使用的术语“N-端修饰的”表示蛋白或肽在其氨基(N)-端进行修饰。例如, 如果修饰是聚乙二醇化, 则在一个或多个氨基酸残基上添加/连接/缀合PEG部分, 所述氨基酸残基在N-端形成经修饰的TFF2多肽的第一个四分之一。氨基酸残基包括、但不限于赖氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、组氨酸、苯丙氨酸或精氨酸。

[0169] N-端修饰的PEG修饰的TFF2多肽缀合物可以如下得到: 在有还原剂存在下, 使经修饰的TFF2多肽的N-端胺与PEG的醛基反应。还原剂可以包括NaCNBH₃和NaBH₄。

[0170] 适于缀合到多肽序列的PEG通常在室温可溶于水, 并且具有通式R(O-CH₂-CH₂)_nO-R, 其中R是氢或保护基诸如烷基或烷醇基, 且其中n是1-1000的整数。当R是保护基时, 它通常具有1-8个碳。与多肽序列缀合的PEG可以是直链的或支链的。本公开内容涵盖支链PEG衍生物、“星形PEG”和多臂PEG。在本公开内容中使用的PEG的分子量不限于任何特定范围, 且在本文其它地方阐述了实例; 举例来说, 某些实施方案具有5kDa至20kDa的分子量, 而其它实施方案具有4kDa至10kDa的分子量。

[0171] 本文中使用的术语“支链”表示聚合物分子的结构, 其中所述聚合物分子是用作骨架或主链的线性聚合物, 具有从所述主链延伸的相同基本聚合物或另一种聚合物的支链。这种结构可以由聚合成线性段的单体和在一端连接至小分子的一个或多个官能团的聚合物分子的两个或更多个线性段来表示, 其中所述小分子具有小于1000道尔顿的分子量。Roberts等人, Advanced Drug Delivery Reviews, 54:459-476 (2002) 介绍了支链聚合物分子的例子, 诸如支链PEG。具有官能团的示例性小分子包括N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺、甘油、季戊四醇或六甘油。

[0172] 本公开内容也涵盖缀合物的组合物, 其中PEG具有不同的n值, 且因而各种不同的PEG以特定比率存在。例如, 一些组合物包含其中n=1、2、3和4的缀合物的混合物。在一些组合物中, 其中n=1的缀合物的百分比为18-25%, 其中n=2的缀合物的百分比为50-66%, 其中n=3的缀合物的百分比为12-16%, 且其中n=4的缀合物的百分比为至多5%。可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法生产这样的组合物。在本说明书中描述了示例性的反应条件。阳离子交换色谱法可以用于分离缀合物, 然后鉴定包含缀合物的级分, 所述缀合物具有例如期望的连接PEG数目, 将其从未修饰的蛋白序列和具有其它连接PEG数目的缀合物中纯化出来。

[0173] 在另一个实施方案中, 所述经修饰的TFF2多肽被甲氧基PEG (mPEG) 聚乙二醇化(参见, 例如, Poovi G. 和 Damodharan, N. (2018) European Journal of Applied Sciences, 10 (1): 01-14)。

[0174] 在另一个实施方案中, 所述经修饰的TFF2多肽被羟基PEG (hPEG) 聚乙二醇化。羟基-PEG描述于美国专利号8,129,330和美国专利申请号20120114742。

[0175] 在某些实施方案中, 通过本领域技术人员已知的技术评估, 与未修饰的TFF多肽相比, 本文描述的经修饰的TFF2多肽的聚乙二醇化或亲水聚合物向本文描述的经修饰的TFF2多肽的添加使肽体内半衰期增加了2-5倍、2-10倍、2-20倍、2-25倍、2-50倍、2-75倍或2-100倍。在某些实施方案中, 通过本领域技术人员已知的技术评估, 与未修饰的TFF多肽相比, 本文描述的经修饰的TFF2多肽的聚乙二醇化或亲水聚合物向本文描述的经修饰的TFF2多肽

的添加使肽体内半衰期增加了5-10倍、5-20倍、5-25倍、5-50倍、5-75倍或5-100倍。在某些实施方案中,通过本领域技术人员已知的技术评估,与未修饰的TFF多肽相比,本文描述的经修饰的TFF2多肽的聚乙二醇化或亲水聚合物向本文描述的经修饰的TFF2多肽的添加使肽体内半衰期增加了10-20倍、10-25倍、10-50倍、10-75倍或10-100倍。在某些实施方案中,通过本领域技术人员已知的技术评估,与未修饰的TFF多肽相比,本文描述的经修饰的TFF2多肽的聚乙二醇化或亲水聚合物向本文描述的经修饰的TFF2多肽的添加使肽体内半衰期增加了25倍-50倍、25-75倍或25-100倍。在某些实施方案中,通过本领域技术人员已知的技术评估,本文描述的经修饰的TFF2多肽的聚乙二醇化或亲水聚合物向本文描述的经修饰的TFF2多肽的添加使肽体内半衰期增加了50-75倍或2-100倍。

[0176] 增加治疗性多肽的稳定性和/或效能的其它方法是本领域已知的,且被包括为本公开内容的实施方案,例如,参见,Strohl,W.R.,(2015),BioDrugs,29(4):215-239。

[0177] CTP肽

[0178] 在某些实施方案中,所述缀合部分是人绒毛膜促性腺激素β亚基的CTP肽。CTP肽包含31氨基酸残基肽FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLPGPS*DTPILPQ(SEQ ID NO:11),其中S*表示O-糖基化位点(参见,例如,Furuhashi等人,(1995)Mol Endocrinol.,9(1):54-63)。

[0179] PAS化®

[0180] 在某些实施方案中,将本文描述的经修饰的TFF2多肽PAS化(参见,Aghaabdollahian,S.等人,(2019)Scientific Reports,9:2978,Payne等人(2010)Pharm.Dev.Technol.,1-18;Pisal等人(2010)J.Pharm.Sci.99(6),2557-2575;Veronese.(2001)Biomaterials 22(5),405-417;Veronese(2009)Milestones in drug therapy (Parnham,M.J.,和Bruinvels,J.,编)Birkhauser,Basel;美国专利号9,221,882;美国专利号9,260,494、9,957,323、10,081,657、10,174,302和9,574,014)。它们中的每一篇通过引用整体并入本文。据报道,PAS化会增加体内和/或体外稳定性(美国专利号9,260,494)。PAS化是编码多肽(诸如本文描述的经修饰的TFF2多肽)的核酸与编码PAS多肽的核酸的遗传融合。PAS多肽是由Pro、Ala和Ser残基组成的亲水的不带电荷的多肽。在某些实施方案中,所述PAS化的经修饰的TFF2多肽由约4个、约10个、约20个、约30个、约40个、约50个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个或约600个氨基酸或介于之间的任何范围(诸如4-600、10-500个等)的氨基酸组成。

[0181] XTEN化

[0182] 在某些实施方案中,将本文描述的经修饰的TFF2多肽XTEN化。术语“XTEN™”(Amunix Operating Inc.)和/或“XTEN化”表示由氨基酸A、E、G、P、S和T组成的主要非结构化重组多肽。XTEN可以具有约864个氨基酸的长度,但也可以更短(例如,根据W02010091122 A1的864个氨基酸长多肽的片段)。术语XTEN化表示XTEN与靶治疗性蛋白(“有效负载”)的融合。XTEN化用于增加治疗性蛋白(即在本文中,本公开内容的融合蛋白)的血清半衰期。术语“XTEN”和/或“XTEN化”也表示包含至少40个连续氨基酸的非结构化的重组多肽(URP),其中(a)在URP中包含的甘氨酸(G)、天冬氨酸(D)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)残基之和占非结构化重组多肽的总氨基酸的至少80%,且剩余部分(当存在时)由精氨酸或赖氨酸组成,并且剩余部分不含甲硫氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。

[0183] ELP化

[0184] 在某些实施方案中,将所述经修饰的TFF2多肽ELP化。缀合部分是弹性蛋白样多肽(ELP)。ELP化使用ELP,其为包含在弹性蛋白中常见的序列的重复肽单元(参见,Yeboah A, 等人, (2016), *Biotechnol Bioeng* 113:1617-1627)。ELP化涉及编码感兴趣的多肽的核酸与编码弹性蛋白样多肽(ELP)的核酸的遗传融合。ELP包含VPGxG重复基序Val Pro Gly Xaa Gly (SEQ ID NO:12),其中x是除脯氨酸外的任何氨基酸(参见,W02018/132768)。

[0185] HAP(同型氨基酸聚合物)

[0186] 在某些实施方案中,将本文描述的经修饰的TFF2多肽HAP化。HAP化是编码感兴趣的多肽的核酸与编码富含甘氨酸的同型氨基酸聚合物(HAP)的核酸的遗传融合。在某些情况下,HAP聚合物包含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ 重复基序(SEQ ID NO:13),并且有时是约50个、100个、150个、200个、250个、300个或更多个残基的长度(Schlapschy,M.等人.*Protein Eng Des Sel* 20,273-284)。

[0187] PSA(聚唾液酸化)

[0188] 在某些实施方案中,可以将本文描述的经修饰的TFF2多肽聚唾液酸化。聚唾液酸(PSA)也被称作多聚乙酰神经氨酸(CA),是一种天然存在的多糖。它是具有 $\alpha(2\rightarrow8)$ 酮苷键或 $\alpha(2\rightarrow9)$ 键或两者混合物的N-乙酰基神经氨酸的同聚物,并在其非还原端含有邻二醇基团。它带负电荷,并且是人体的天然组分。PSA可以在细菌中产生(美国专利号5,846,951;美国专利号9,018,166;美国专利号10,414,793;Zhang等人, (2014), *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*,9(2):75-81)。用于将多肽聚唾液酸化的方法描述于美国公开号US2012/0329127。

[0189] PLGA

[0190] 与聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)的缀合。在一些实施方案中,可以将本文描述的经修饰的TFF2多肽与聚(D,L-乳酸-共-羟乙酸)(PLGA)缀合。PLGA带电荷,并且是人体的天然组分。PLGA会延长例如环状大环内酯药物(包括zilucoplan)的血浆半衰期(Ra Pharmaceuticals technology)。

[0191] 药物组合物和施用方法

[0192] 可以以多种方式施用本公开内容的经修饰的TFF2多肽。例如,可以使用静脉内注射、肌肉内施用、可植入渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它施用模式施用经修饰的TFF2多肽。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Sefton(1987) *Biomed.Eng.*14:201;Buchwald等人(1980) *Surgery* 88:507;Saudek等人(1989) *N.Engl.J.Med.*321:574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编),Wiley,New York(1984);Ranger和Peppas, (1983) *J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.*23:61;也参见Levy等人(1985) *Science* 228:190;During等人(1989) *Ann.Neurol.*25:351;Howard等人(1989) *J.Neurosurg.*71:105)。在另一个实施方案中,可以将控释系统放置在治疗靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见,例如,Goodson,Medical Applications of Controlled Release,第2卷,第115-138页(1984))。Langer(*Science* (1990) 249:1527-1533)的综述讨论了其它控释系统。尽管蛋白/肽通过口服施用吸收差,但用于口服施用的递送系统是本领域已知的,例如,Wu S.等人, (2019), *Journal of Pharmaceutical Sciences*,108(6):2143-

2152;和Renukunita,J.等人,(2013),Int.J.Pharm.,447:75-93。

[0193] 在某些实施方案中,可以以药物组合物的形式提供经修饰的TFF2多肽,所述药物组合物包含在充分无菌条件下制备的用于人施用的等渗赋形剂。包含聚乙二醇化的TFF2的组合物的赋形剂和任何伴随要素的选择将根据用于施用的途径和装置进行调整。在某些实施方案中,包含聚乙二醇化的TFF2多肽的组合物还可以包含或伴有一种或多种其它成分,其促进TFF2肽的递送或功能动员。

[0194] 本文所述的这些方法并非包罗万象,且普通技术人员理解适合特定应用的其它方法。此外,通过类比已知能发挥期望效果的化合物,可以进一步近似地计算组合物的有效量。

[0195] 本公开内容的一个方面提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括给所述受试者施用有效量的本公开内容的组合物中的任一种或本公开内容的经修饰的TFF2多肽中的任一种。

[0196] 本公开内容的另一个方面提供了一种在有需要的受试者中治疗炎性肠病的方法,其包括给所述受试者施用有效量的本公开内容的组合物中的任一种或本公开内容的经修饰的TFF2多肽中的任一种。

[0197] 本公开内容的另一个方面提供了一种在有需要的受试者中治疗COVID-19的方法,其包括给所述受试者施用有效量的本公开内容的组合物中的任一种或本公开内容的经修饰的TFF2多肽中的任一种。

[0198] 在某些实施方案中,通过本公开内容的组合物或多肽治疗的COVID-19并发症或病状包括、但不限于疲劳、发热、呼吸短促、肌肉痛、急性呼吸窘迫综合征、急性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征(ARD)、肺炎、肝损伤、心血管并发症、神经学的和神经精神病学的并发症、肾损伤等。

[0199] 在一个实施方案中,经修饰的TFF2多肽可以与抑制或减少SARS-CoV-2复制的药剂联合施用。在另一个实施方案中,经修饰的TFF2多肽可以与选自由以下组成的组的抗病毒剂联合施用:利巴韦林、干扰素(alfacon-1)、氯喹、羟氯喹、EIDD-2801、EIDD-1931、GS-5734、GS-441524、伊维菌素、法匹拉韦、吡喹酮、氯丙嗪、喷昔洛韦、奈莫司他、卡莫司他、硝唑尼特、瑞德西韦、法莫替丁和地塞米松。

[0200] 在某些实施方案中,可以在抑制或减少SARS-CoV-2复制的药剂或抗病毒剂之前、并行地或之后施用经修饰的TFF2多肽。

[0201] 根据本公开内容,药学上可接受的载体可以包含与药物施用相容的任意的和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这样的介质和试剂用于药学活性物质的用途是本领域众所周知的。可以使用与活性化合物相容的任何常规介质或试剂。还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。

[0202] 可以将经修饰的TFF2多肽一次性施用给受试者(例如,作为单次注射或沉积)。备选地,可以每天给有需要的受试者施用经修饰的TFF2多肽一次或两次,持续约2至约28天、或约7至约10天、或约7至约15天的阶段。也可以每天给受试者服用一次或两次,持续每年1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12次的阶段,或它们的组合。此外,经修饰的TFF2多肽可以与另一种治疗剂共同施用。

[0203] 在一个实施方案中,可以与化学疗法药物共同施用经修饰的TFF2多肽。常规化学

疗法药物的一些非限制性例子包括：氨鲁米特、安吡啶、天门冬酰胺酶、bcg、阿那曲唑、博来霉素、布舍瑞林、比卡鲁胺、白消安、卡培他滨、卡铂、喜树碱、苯丁酸氮芥、顺铂、卡莫司汀、克拉屈滨、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、环丙孕酮、氯膦酸盐、柔红霉素、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、多西他赛、更生霉素、多柔比星、己二烯雌酚、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟氢可的松、表柔比星、雌二醇、吉西他滨、染料木黄酮、雌莫司汀、氟甲睾酮、氟他胺、戈舍瑞林、亮丙瑞林、羟基脲、伊达比星、左旋咪唑、伊马替尼、洛莫司汀、异环磷酰胺、甲地孕酮、美法仑、干扰素、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、依罗替康、米托蒽醌、尼鲁米特、甲羟孕酮、二氯甲基二乙胺、巯基嘌呤、米托坦、诺考达唑、奥曲肽、甲氨蝶呤、丝裂霉素、紫杉醇、奥沙利铂、替莫唑胺、喷司他丁、普卡霉素、舒拉明、他莫昔芬、吡非尔钠、美司钠、帕米膦酸盐、链佐星、替尼泊苷、丙卡巴肼、二氯钛烯(titanocene dichloride)、雷替曲塞、利妥昔单抗、睾酮、硫鸟嘌呤、长春新碱、长春地辛、塞替派、托泊替康、维A酸、长春碱、曲妥珠单抗和长春瑞滨。

[0204] 在一个实施方案中，可以与针对PD-1、PD-L1或CTLA-4的单克隆抗体共同施用经修饰的TFF2多肽。PD-1阻断抗体的例子是派姆单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)和西米普利单抗(Libtayo®)。PD-L1阻断抗体的例子是阿特朱单抗(Tecentriq®)、阿维鲁单抗(Bavencio®)和度伐单抗(Imfinzi®)。CTLA-4阻断抗体的一个例子是伊匹木单抗(Yervoy®)。

[0205] 在一个实施方案中，所述癌症对阻断性抗-PD-1或抗-PD-L1单克隆抗体没有应答，且使用经修饰的TFF2多肽的治疗会诱导对阻断性抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA-4单克隆抗体的应答性。

[0206] 在一个实施方案中，所述化学疗法药物是烷化剂、亚硝基脲、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、蒽环霉素、皮质类固醇激素、性激素或靶向抗肿瘤化合物。

[0207] 在一个实施方案中，可以与抗炎药共同施用经修饰的TFF2多肽。抗炎药的一些非限制性例子包括：抗炎类固醇(皮质类固醇)(例如泼尼松)、氨基水杨酸盐(例如，美沙拉嗪、Asacol HD®、Delzicol®等)、巴柳氮(balsalazide, Colazal®)和奥沙拉嗪(Dipentum)和/或非甾体类抗炎药(NSAID)(例如阿司匹林、布洛芬、萘普生)和免疫选择性的抗炎衍生物(ImSAID)。抗炎药还可以包括靶向细胞因子和趋化因子的抗体或分子，包括、但不限于抗-TNF α 抗体(例如英夫利昔单抗(Remicade®)、阿达木单抗(Humira®)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol, Cimzia®)、戈利木单抗(Simponi®)、依那西普(Enbrel®)、抗-IL12抗体、抗-IL2抗体(巴利昔单抗(Simulect®)、达克珠单抗(Zenapax®)、硫唑嘌呤(Imuran®、Azasan®)、6-巯基嘌呤(6-MP、Purinethol®)、环孢菌素A(Sandimmune®、Neoral®)、他克莫司(Prograf®)和抗-GM-CSF抗体。在某些实施方案中，可以与那他珠单抗(Tysabri®)、维多珠单抗(Entyvio®)和乌司奴单抗(Stelara®)共同施用经修饰的TFF2多肽。在某些实施方案中，与Janus激酶1-3的抑制剂(诸如小分子托法替尼)共同施用经修饰的TFF2多肽。在某些实施方案中，可以与用于治疗IBD的免疫系统抑制剂一起施用经修饰的TFF2多肽，所述免疫系统抑制剂是诸如硫唑嘌呤(Azasan®、Imuran®)、巯基嘌呤

(Purinethol®、Purixan®)、环孢菌素(Gengraf®、Neoral®、Sandimmune®)和甲氨蝶呤(Trexall®)。

[0208] 在一个实施方案中,可以与放射疗法共同施用经修饰的TFF2多肽。常规放射疗法的一些非限制性例子包括:外线束放射疗法、密封源放射疗法、非密封源放射疗法、粒子疗法和放射性同位素疗法。

[0209] 在一个实施方案中,可以与癌症免疫疗法共同施用经修饰的TFF2多肽。癌症免疫疗法包括使用受试者的免疫系统来治疗癌症。例如,可以刺激受试者的免疫系统以识别和消除癌细胞。癌症免疫疗法的一些非限制性例子包括:癌症疫苗、治疗性抗体诸如单克隆抗体疗法(例如,贝伐珠单抗、西妥昔单抗和帕木单抗)、基于细胞的免疫疗法和过继性基于细胞的免疫疗法。

[0210] 也可以与用于治疗消化系统疾病的手术或其它介入治疗方案联合使用经修饰的TFF2多肽。

[0211] 可以配制本公开内容的组合物,并通过使活性成分与人或非人受试者体内的药剂作用部位发生接触的任何方式施用以减少与消化系统疾病相关的症状。例如,可以配制和施用本公开内容的组合物以减少与消化系统的炎症性疾病、消化系统癌症或消化系统的发育异常相关的症状,或造成细胞增殖的减少或肿瘤生长的减少。它们可以通过任何可与药物结合使用的常规方式进行施用,无论是作为单独的治疗活性成分还是与治疗活性成分联合。它们可以单独施用,但通常与基于所选施用途径和标准药物实践而选择的药物载体一起施用。

[0212] 可以使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂以常规方式配制根据本公开内容使用的药物组合物。可以配制本公开内容的治疗组合物用于多种施用途径,包括全身和局部或定位施用。技术和制剂通常可以参见Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. (2000年第20版),其整个公开内容通过引用并入本文。对于全身施用,注射是有用的,包括肌肉内、静脉内、腹膜内和皮下。对于注射,本公开内容的治疗组合物可以配制在液体溶液中,例如在生理上相容的缓冲液诸如PBS、汉克氏溶液或林格氏溶液中。此外,可以将治疗组合物配制成固体形式并在即将使用前重新溶解或悬浮。也包括冻干形式。本公开内容的药物组合物的特征在于至少是无菌的和无热原的。这些药物制剂包括人用和兽医用制剂。

[0213] 本文所述的任何治疗用途可以应用于需要这种疗法的任何受试者,包括例如哺乳动物,诸如狗、猫、牛、马、兔、猴、猪、绵羊、山羊或人。

[0214] 将本公开内容的药物组合物配制成与它的预期施用途径相容。施用途径的例子包括胃肠外施用,例如静脉内、真皮内、皮下、口服(例如、吸入)、透皮(局部)、透粘膜和直肠施用。用于胃肠外、真皮内或皮下应用的溶液或混悬液可以包括以下组分:无菌的稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂;抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可以将胃肠外制剂包封在由玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多次剂量瓶中。

[0215] 适合注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散剂、和用

于即时制备无菌注射液或分散剂的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑制细菌的水、Cremophor EM™ (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。所述组合物必须是无菌的和流动性的,以达到易于注射的程度。它在制备和贮存条件下必须是稳定的,并且必须被保存免于微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、药学上可接受的多元醇如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇和它们的合适混合物。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣剂诸如卵磷脂、通过维持所需的粒度(在分散剂的情况下)和通过使用表面活性剂。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞,可以防止微生物的作用。在许多情况下,在组合物中包括等渗剂可以是有用的,例如,糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如,单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0216] 可以如下制备无菌注射溶液:将所需量的经修饰的TFF2多肽掺入适当的溶剂中,所述溶剂根据需要含有本文列举的一种成分或成分的组合,随后过滤除菌。如下制备分散剂:将活性化合物掺入无菌媒介物中,所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自本文所列举的那些的所需其它成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,有用的制备方法的例子是真空干燥和冷冻干燥,其从先前无菌过滤的活性成分和任何额外期望成分的溶液产生粉末。

[0217] 全身施用还可以是通过透粘膜或透皮方式。关于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用适合要渗透的屏障的穿透剂。这样的穿透剂是本领域已知的,且包括,例如,对于透粘膜施用,去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾或栓剂而完成。对于透皮施用,将活性化合物配制成本领域已知的软膏剂、油膏剂、凝胶或乳膏剂。

[0218] 可以将本公开内容的组合物施用给有需要的受试者。有需要的受试者可以包括、但不限于,例如,哺乳动物,诸如狗、猫、牛、马、兔、猴、猪、绵羊、山羊或人。

[0219] 还可以将本公开内容的组合物配制为持续释放和/或定时释放制剂。通过本领域普通技术人员众所周知的持续释放装置或递送装置,诸如在美国专利号3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、4,710,384、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556和5,733,566(它们的公开内容各自通过引用并入本文)中描述的那些,可以制备这样的持续释放和/或定时释放制剂。使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、透性膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体、微球等或它们的组合,本公开内容的药物组合物(例如,具有治疗效果)可以用于提供一种或多种活性成分的缓慢或持续释放,以提供不同比例的期望的释放特征。可以容易地选择本领域普通技术人员已知的合适持续释放制剂,包括本文描述的那些,用于与本公开内容的药物组合物一起使用。适合于口服施用的单一单位剂型,诸如、但不限于适用于持续释放的片剂、胶囊剂、软胶囊剂(gel-caps)、囊片或粉剂,被涵盖在本公开内容中。

[0220] 在本文所述的方法中,经修饰的TFF2多肽可以作为RNA与递送试剂一起施用给受试者,或者作为包含表达基因产物的序列的核酸(例如,重组质粒或病毒载体)施用给受试者。用于施用经修饰的TFF2多肽的合适递送试剂包括Mirus Transit TK0亲脂试剂;lipofectin;lipofectamine;cellfectin;或聚阳离子(例如,聚赖氨酸)或脂质体。

[0221] 施用的剂量可以是组合物的治疗有效量,其足以导致消化系统炎症性疾病的治疗、

消化系统癌症的治疗、细胞增殖的减少、肿瘤生长的减少或消化系统发育异常的治疗,并且可以根据已知因素而变化,诸如活性成分的药效动力学特征及其施用模式和途径;活性成分的施用时间;接受者的年龄、性别、健康和体重;症状的性质和程度;并行治疗的种类、治疗的频率和期望的效果;和排泄速率。

[0222] 在某些实施方案中,施用的经修饰的TFF2多肽的有效量是至少约0.01 μ g/kg体重、至少约0.025 μ g/kg体重、至少约0.05 μ g/kg体重、至少约0.075 μ g/kg体重、至少约0.1 μ g/kg体重、至少约0.25 μ g/kg体重、至少约0.5 μ g/kg体重、至少约0.75 μ g/kg体重、至少约1 μ g/kg体重、至少约5 μ g/kg体重、至少约10 μ g/kg体重、至少约25 μ g/kg体重、至少约50 μ g/kg体重、至少约75 μ g/kg体重、至少约100 μ g/kg体重、至少约150 μ g/kg体重、至少约200 μ g/kg体重、至少约250 μ g/kg体重、至少约300 μ g/kg体重、至少约350 μ g/kg体重、至少约400 μ g/kg体重、至少约450 μ g/kg体重、至少约500 μ g/kg体重、至少约550 μ g/kg体重、至少约600 μ g/kg体重、至少约650 μ g/kg体重、至少约700 μ g/kg体重、至少约750 μ g/kg体重、至少约800 μ g/kg体重、至少约850 μ g/kg体重、至少约900 μ g/kg体重、至少约950 μ g/kg体重、至少约1000 μ g/kg体重、至少约1500 μ g/kg体重、至少约2000 μ g/kg体重、至少约2500 μ g/kg体重、至少约3000 μ g/kg体重、至少约3500 μ g/kg体重、至少约4000 μ g/kg体重、至少约4500 μ g/kg体重、至少约5000 μ g/kg体重、至少约5500 μ g/kg体重、至少约6000 μ g/kg体重、至少约6500 μ g/kg体重、至少约7000 μ g/kg体重、至少约7500 μ g/kg体重、至少约8000 μ g/kg体重、至少约8500 μ g/kg体重、至少约9000 μ g/kg体重、至少约9500 μ g/kg体重、或至少约10000 μ g/kg体重。

[0223] 在一个实施方案中,至少每天一次施用经修饰的TFF2多肽。在另一个实施方案中,至少每天两次施用经修饰的TFF2多肽。在某些实施方案中,施用经修饰的TFF2多肽持续至少1周、持续至少2周、持续至少3周、持续至少4周、持续至少5周、持续至少6周、持续至少8周、持续至少10周、持续至少12周、持续至少18周、持续至少24周、持续至少36周、持续至少48周或持续至少60周。在其它实施方案中,与第二治疗剂联合施用经修饰的TFF2多肽。

[0224] 本公开内容的治疗组合物的毒性和治疗效果可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中确定,例如,通过用于确定LD50(对群体的50%致死的剂量)和ED50(在群体的50%中治疗上有效的剂量)的标准药物程序。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数,且它可以表示为比率LD50/ED50。表现出大治疗指数的治疗剂是有用的。可以使用表现出一些毒副作用的治疗组合物。

[0225] 实验动物可以用作人疾病的模型。例如,小鼠可以用作哺乳动物模型系统。哺乳动物拥有的生理系统可以在例如小鼠和人的中找到。通过操纵其环境、基因组或两者的组合,可以在小鼠中诱发某些疾病。例如,AOM/DSS小鼠模型是人结肠癌的模型。在另一个例子中,DSS小鼠模型是人结肠炎的模型。致癌作用的其它小鼠模型包括皮肤癌的两阶段DMBA/TPA模型、肝癌的DEN/CCL4模型和胃癌的猫血巴尔通氏体(*H.felis*)/MNU模型。此外,存在众多遗传工程改造的癌症模型,诸如胰腺癌的KPC模型。

[0226] 经修饰的TFF2多肽的施用不限于单一途径,而是可以涵盖通过多种途径的施用。多次施用可以是相继的或同时的。通过多种途径的其它应用模式对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0227] 重组蛋白和技术

[0228] 本公开内容利用本领域普通技术人员可获得的常规分子生物学、微生物学和重组

DNA技术。这样的技术对于技术人员来说是众所周知的并且在文献中有充分解释。参见,例如,Maniatis,Fritsch和Sambrook,“DNA Cloning:A Practical Approach,”第I和II卷(D.N.Glover,编,1985);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait,编,1984);“Nucleic Acid Hybridization”(B.D.Hames和S.J.Higgins,编,1985);“Transcription and Translation”(B.D.Hames和S.J.Higgins,编,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney,编,1986);“Immobilized Cells and Enzymes”(IRL Press,1986):B.Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”(1984),和Sambrook,等人,“Molecular Cloning:a Laboratory Manual”(2001)。

[0229] 本领域技术人员可以通过多种方式获得TFF2蛋白,所述方式包括、但不限于通过生化手段分离蛋白或通过基因工程方法表达编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列。在某些实施方案中,将在其中表达TFF2蛋白(诸如人TFF2)的宿主细胞中的多核苷酸序列可以针对表达进行优化,同时仍编码SEQ ID NO:1或3的蛋白。在某些实施方案中,编码TFF2的DNA还可以编码可用于蛋白纯化的氨基酸,诸如具有人血清白蛋白(HSA)、his标签或Fc-标签的杂合蛋白,并且如本文所述。

[0230] 经修饰的TFF2多肽可以是TFF2蛋白的片段,例如,TFF2蛋白片段可以涵盖SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的至少约8个连续氨基酸的任何部分。所述片段可以包含SEQ ID NO:1、3或6的至少约10个连续氨基酸、至少约20个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸、至少约40个连续氨基酸、至少约50个连续氨基酸、至少约60个连续氨基酸、至少约70个连续氨基酸、至少约80个连续氨基酸、至少约90个连续氨基酸、至少约100个连续氨基酸、至少约110个连续氨基酸或至少约120个连续氨基酸。片段包括约8至约80个氨基酸的所有可能的氨基酸长度,例如,约10至约80个氨基酸、约15至约80个氨基酸、约20至约80个氨基酸、约35至约80个氨基酸、约40至约80个氨基酸、约50至约80个氨基酸或约70至约80个氨基酸的长度。

[0231] 经修饰的TFF2多肽可以通过几种方式获得,例如、但不限于,通过基因工程方法表达编码感兴趣的蛋白或其片段的核苷酸序列。

[0232] 可以在表达盒中表达编码经修饰的TFF2多肽的核酸,例如,以实现在细胞中的过表达。核酸可以是可表达形式的感兴趣的RNA、cDNA、cDNA样或DNA,诸如表达盒,其可以从天然启动子或完全异源的启动子表达。感兴趣的核酸可以编码蛋白,并且可以包括或不包括内含子。可以使用任何重组表达系统,包括、但不限于细菌、哺乳动物、酵母、昆虫或植物细胞表达系统。

[0233] 可以在适合于从细胞培养物表达和回收蛋白的条件下培养用编码经修饰的TFF2多肽的核酸序列转化的宿主细胞。取决于所使用的序列和/或载体,由转化细胞产生的多肽可以被分泌或包含在细胞内。可以将含有编码经修饰的TFF2多肽的核酸序列的表达载体设计成含有信号序列,所述信号序列指导所编码的经修饰的TFF2多肽的可溶性多肽分子穿过原核或真核细胞膜的分泌。异源信号肽的例子如下表2所示,但不限此。

[0234] 表2-异源信号肽

[0235]

来源	氨基酸序列	SEQ ID NO:
人Igκ轻链	MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARA	SEQ ID NO:14
人载脂蛋白E	MKVLWAALLVTFLAGCQA	SEQ ID NO:15

牛生长激素	MMAAGPRTSLLLAFALLCLPWTQVVG	SEQ ID NO:16
果蝇68C Glue	MKLIAVTIIACILLIGFSDLALG	SEQ ID NO:17
人血清白蛋白	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFR	SEQ ID NO:18
人 α 1B糖蛋白	MSMLVVFLLLWGVTWGPVTEA	SEQ ID NO:19

[0236] 使用本领域已知的化学方法,可以完全地或部分地合成包含编码多肽的TFF2的核酸序列。备选地,使用化学方法合成其氨基酸序列,诸如通过使用固相技术的直接肽合成,可以生产TFF2蛋白。可以使用手动技术或通过自动化进行蛋白合成。例如,使用Applied Biosystems 431A肽合成仪(Perkin Elmer),可以实现自动化合成。任选地,可以使用化学方法分别合成TFF2的片段并组合以产生全长多肽。

[0237] 通过高效液相色谱法(HPLC),可以基本上纯化合成的肽。通过氨基酸分析或测序,可以确认合成的经修饰的TFF2多肽的组成。另外,TFF2氨基酸序列的任何部分可以在直接合成过程中进行改变和/或使用化学方法与来自其它蛋白的序列组合以产生经修饰的TFF2多肽变体或融合蛋白。

[0238] 本公开内容进一步涵盖使用由TFF2的核酸序列(诸如SEQ ID NO:2和3所示的序列)编码的蛋白或经修饰的TFF2多肽的方法。在另一个实施方案中,可以修饰所述多肽,诸如通过糖基化和/或乙酰化和/或化学反应或偶联,并且可以含有一个或几个非天然的或合成的氨基酸。在某些实施方案中,本公开内容涵盖TFF2的变体。

[0239] 融合蛋白

[0240] 本领域技术人员理解,期望的蛋白产物的表达可以基于融合蛋白。经修饰的TFF2多肽的一个实施方案是融合蛋白。融合蛋白的一个实施方案是TFF2-白蛋白蛋白。另一个实施方案是经修饰的TFF2-IgG1融合蛋白。与天然或重组TFF2相比,这些融合蛋白增加经修饰的TFF2多肽的血清半衰期。另一类融合蛋白连接有可用于纯化重组蛋白的亲亲和标签。融合蛋白可以包括在TFF2序列的N-端或C-端处的新序列。融合蛋白可以包括TFF2氨基酸序列的部分、整个氨基酸序列,或可以包括将TFF2序列连接到融合结构域的新序列。

[0241] 具有亲和标签的常见融合蛋白采用多组氨酸标签。亲和标签经常通过靶蛋白酶切割位点序列连接至TFF2序列,所述靶蛋白酶切割位点序列可以被适当的蛋白酶切割(Waugh, D.S. An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags, Protein Expr Purif. 2011年12月; 80 (2): 283-293)。一种常见的靶蛋白酶切割位点序列是具有以下氨基酸序列(Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) SEQ ID NO:20的凝血酶切割位点的靶标。凝血酶选择性地在切割位点的精氨酸和甘氨酸残基之间切割。在其它情况下,通过在识别位点(Asp-Asp-Asp-Lys) (SEQ ID NO:21)处切割的胰凝乳蛋白酶的靶序列连接亲和标签。在另一个实施方案中,通过烟草蚀刻病毒(TEV)的靶蛋白酶切割位点序列连接亲和标签。TEV蛋白酶是一种高度特异性的半胱氨酸蛋白酶,其识别氨基酸序列:Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly (SEQ ID NO:22)或Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser (SEQ ID NO:23),并在Gln和Gly/Ser (P1' 位置)残基之间切割。P1' 残基还可以是Ala、Met或Cys (Kapust, R.B. 等人 (2002). Biochem. and Biophysical Research Comm. 294, 949-955)。

[0242] 在其它实施方案中,在切割亲和标签以后,所得到的蛋白包括来自切割位点的一个或多个氨基酸残基。

[0243] 在某些实施方案中,在切割亲和标签以后,所得到的蛋白是天然蛋白。作为一个例

子,来自 **Qiagen®** 的 TAGZyme 是使用 his- 标签和标签除去对重组蛋白进行亲和纯化的酶促系统。它组合了用于从 N- 端进行外切蛋白水解性切割的二肽酶 (DAPase, 或重组二肽基肽酶 I) 以及用于完全除去 his- 标签的潜在两种辅助氨肽酶 (Qcyclase, 或植物谷氨酰胺环转移酶, 和 pGAPase, 或细菌焦谷氨酰基氨肽酶)。在 TAGZyme 中的所有三种酶都显示出不可切割的 his- 标签被除去。

[0244] 在某些实施方案中,可以将融合蛋白聚乙二醇化以制备药物产品,包括具有增加半衰期的序列(如白蛋白或 IgG 序列)和用作亲和标签的序列(诸如 his- 标签)和用作亲和标签的接头序列或用于其它生产方面的序列的融合蛋白。

[0245] 细菌表达系统.

[0246] 本领域技术人员理解,期望的蛋白产物在原核生物中的表达最常在大肠杆菌中用含有组成型或诱导型启动子的载体进行。用于转化的细菌细胞的一些非限制性例子包括细菌细胞系大肠杆菌菌株 DH5 α 或 MC1061/p3 (Invitrogen Corp.®, San Diego, Calif.), 其可以使用在本领域实施的标准程序进行转化,并然后可以关于适当的质粒表达来筛选菌落。在细菌系统中,可以选择许多表达载体。这样的载体的非限制性例子包括多功能大肠杆菌克隆和表达载体,诸如 BLUESCRIPT (Stratagene®)。一些大肠杆菌表达载体(在本领域中也称为融合载体)被设计成添加许多氨基酸残基,通常是在表达的重组蛋白的 N- 端。这样的融合载体可以起到三种作用: 1) 增加期望的重组蛋白的溶解度; 2) 增加感兴趣的重组蛋白的表达; 和 3) 通过在亲和纯化中充当配体来帮助重组蛋白纯化。在一些情况下,也可以使用指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。融合表达载体的一些非限制性例子包括: pGEX, 其将谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 与期望的蛋白融合; pcDNA3.1/V5-His A B&C (Invitrogen Corp.®, Carlsbad, Calif.), 其将 6 $\times$ -His (SEQ ID NO:8) 与感兴趣的重组蛋白融合; pMAL (New England Biolabs®, MA), 其将麦芽糖 E 结合蛋白与靶重组蛋白融合; 大肠杆菌表达载体 pUR278 (Ruther 等人, (1983) EMBO 12:1791), 其中编码序列可以单独与 lac Z 编码区一起在框架内连接进载体中以产生融合蛋白; 和 pIN 载体 (Inouye 等人, (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke 等人, (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509)。由上述载体的类似物产生的融合蛋白通常是可溶性的,并且可以通过将融合蛋白吸附和结合到亲和基质上而容易地从裂解的细胞中纯化。例如,可以如下从裂解的细胞中纯化融合蛋白: 吸附和结合至谷胱甘肽琼脂糖珠子的基质,随后在有游离谷胱甘肽存在下洗脱。例如, pGEX 载体被设计成包括凝血酶或因子 Xa 蛋白酶切割位点,使得克隆的靶标可以从 GST 部分释放。

[0247] 植物、昆虫和酵母表达系统

[0248] 除了用含有 TFF2 肽的编码序列的重组细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物诸如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)之外,其它合适的细胞系也可以备选地用于生产感兴趣的分子。一个非限制性的例子包括用重组病毒表达载体(例如,烟草花叶病毒、TMV; 花椰菜花叶病毒、CaMV) 感染或用含有经修饰的 TFF2 多肽的编码序列的重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统。如果使用植物表达载体,编码经修饰的 TFF2 多肽的序列的表达可以由许多启动子中的任一种驱动。例如,病毒启动子诸如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子可以单独使用,或者与来自烟草花叶病毒 TMV 的 ω 前导序列联合使用。备

选地,可以使用植物启动子诸如RUBISCO的小亚基或热激启动子。通过直接DNA转化或通过病原体介导的转染,可以将这些构建体引入植物细胞中。

[0249] 昆虫系统也可以用于表达经修饰的TFF2多肽或融合蛋白。许多使用昆虫系统表达重组蛋白的方法是本领域已知的,例如,参见Bleckmann,M.等人,(2016),*Biotechnol Bioeng.*113(9):1975-1983;Zitzmann,J.等人,*Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells*,*New Insights into Cell Culture Technology*; InTech;2017;美国专利号5,194,376;美国专利号5,843,733;例如,在一个这样的系统中,使用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)作为载体在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中或在烟芽粉夜蛾(*Trichoplusia virescens*)的粉夜蛾幼虫中表达外源基因。可以将编码经修饰的TFF2多肽的序列克隆进病毒的非必需区域,诸如多角体蛋白基因,并置于多角体蛋白启动子的控制下。经修饰的TFF2多肽的核酸序列的成功插入将使得多角体蛋白基因无活性并产生缺乏外壳蛋白的重组病毒。然后使用重组病毒感染例如草地贪夜蛾(*S.frugiperda*)细胞或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) (在粉夜蛾属中)幼虫,在草地贪夜蛾(*S.frugiperda*)细胞或粉纹夜蛾(*Trichoplusia night moth*) (粉夜蛾属)幼虫中已经表达感兴趣的多肽(参见Engelhard,EK等人(1994),*Proc.Natl.Acad.Sci.*3224)。

[0250] 在另一个实施方案中,可以使用酵母,例如粟酒裂殖酵母(*chizosaccharomyces pombe*,*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,例如,乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*),脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*,*K.fragilis*) (ATCC 12424),保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16045),梭菌属克鲁维酵母属(*K.wickerhamii*) (ATCC 24178),*K.waltii* (ATCC 56500),果蝇克鲁维酵母(*Drosophila Kluyveromyces*,*K.drosophilum*) (ATCC 36906),耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*,*K.thermotolerans*),和马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*,*K.marxianus*);子囊菌酵母属(*Yarrowia,yarrowia*) (EP 402226);毕赤酵母属酵母(巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)) (EP 183070);假丝酵母属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesei*,*Trichoderma reesei*) (EP 244234);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*)例如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,诸如,脉孢菌属菌株(*Neurospora*),青霉属(*Penicillium*),环孢菌素(弯颈霉属(*Tolypocladium*))和曲霉菌属(*Aspergillus*)宿主,诸如构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*,*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。可以用含有经修饰的TFF2多肽的编码序列的重组酵母表达载体转化酵母。一个优选实施方案是在酵母(包括酿酒酵母)中表达,因为酵母具有将重组蛋白糖基化的能力,且在胃液中的大部分人TFF2通过N-键糖基化,推定是在Asn(15)上,这可能对血管内TFF2具有功能重要性并可能增加血浆半衰期(May FE等人,*Gut* 2000 46(4):454-9)。当在酿酒酵母中表达重组人TFF2时,大部分重组蛋白通过Asn(15)上的N-键糖基化(Thim L等人.*FEBS Lett* 1993:318:345-52)。

[0251] 哺乳动物表达系统.

[0252] 哺乳动物细胞(诸如BHK细胞、VERO细胞、CHO细胞、HEK293细胞等)也可以含有用于表达期望产物的表达载体(例如,携带编码经修饰的TFF2多肽的核苷酸序列的载体)。通过本领域已知的方法可以引入表达载体,其含有以允许在宿主细胞中表达核苷酸序列的方式

连接至至少一个调节序列的这样的核酸序列。许多基于病毒的表达系统可以用于在哺乳动物宿主细胞中表达经修饰的TFF2多肽。所述载体可以是重组DNA或RNA载体,并且包括DNA质粒或病毒载体。例如,如果将腺病毒用作表达载体,则编码经修饰的TFF2多肽的序列可以连接进包含晚期启动子和三联前导序列的腺病毒转录/翻译复合物中。向病毒基因组的非必需E1或E3区域中的插入可以用于获得能够在受感染的宿主细胞中表达经修饰的TFF2多肽的活病毒。转录增强子,诸如劳斯肉瘤病毒(RSV)增强子,也可以用于增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。此外,基于、但不限于腺伴随病毒、逆转录病毒、腺病毒、慢病毒或甲病毒,可以构建病毒载体。

[0253] 调节序列是本领域众所周知的,并且可以被选择来指导感兴趣的蛋白或多肽(诸如经修饰的TFF2多肽)在适当的宿主细胞中的表达,如Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)所述。调节序列的非限制性例子包括:多腺苷酸化信号、启动子(诸如CMV、ASV、SV40或其它病毒启动子诸如从牛乳头状瘤、多形瘤和腺病毒2型病毒衍生出的那些(Fiers, 等人, 1973, *Nature* 273:113; Hager G L, 等人, *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12 (2) :137-41))、增强子以及其它表达控制元件。本领域的从业人员理解,设计表达载体可以取决于多种因素,诸如待转染的宿主细胞的选择和/或待表达的期望蛋白的类型和/或量。

[0254] 在本领域中也已知增强子区域(其为在非编码DNA区域的启动子区域的上游或下游发现的那些序列)在优化表达中是重要的。如果需要的话,可以采用来自病毒源的复制起点,例如如果利用原核宿主来引入质粒DNA。但是,在真核生物中,染色体整合是DNA复制的常见机制。

[0255] 为了稳定转染哺乳动物细胞,小部分细胞可以将引入的DNA整合到它们的基因组中。所利用的表达载体和转染方法可以是促成成功整合事件的因素。为了稳定扩增和表达期望的蛋白,将含有编码感兴趣的蛋白(例如,经修饰的TFF2多肽)的DNA的载体稳定整合进真核细胞(例如哺乳动物细胞,诸如HEK293细胞)的基因组中,从而导致转染的基因的稳定表达。通过同源重组可以将外源核酸序列引入细胞(诸如哺乳动物细胞,无论原代细胞还是次代细胞),如在美国专利号5,641,670(其内容通过引用并入本文)中所公开。

[0256] 可以将编码选择标记(例如,对抗生素或药物诸如氨苄青霉素、新霉素、G418和潮霉素的抗性)的基因与感兴趣的基因一起引入宿主细胞,以便鉴定和选择稳定地表达编码感兴趣的蛋白的基因的克隆。可以将编码选择标记的基因在与感兴趣的基因相同的质粒上引入宿主细胞,或者可以在单独的质粒上引入。通过药物选择可以鉴定含有感兴趣的基因的细胞,其中已经掺入选择标记基因的细胞将在药物存在下存活。未掺入选择标记基因的细胞死亡。然后可以关于期望的蛋白分子(例如,经修饰的TFF2多肽)的产生来筛选存活细胞。

[0257] 可以关于其调节插入序列的表达或以期望方式处理表达的经修饰的TFF2多肽的能力来选择宿主细胞株。这样的多肽修饰包括、但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。切割多肽的“前原”形式的翻译后加工也可以用于促进正确的插入、折叠和/或功能。具有翻译后活性的特定细胞机制和特有机制的不同宿主细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、HEK293和WI38)可得自美国典型培养物保藏中心(ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209),并可以进行选择以确保外源蛋白的正确修饰和加

工。

[0258] 通过本领域已知的多种技术,诸如脂转染、显微注射、磷酸钙或氯化钙沉淀、DEAE-糊精介导的转染或电穿孔,可以将外源核酸引入细胞。在近似的电压和电容下进行电穿孔,以导致一种或多种DNA构建体进入感兴趣的细胞。用于转染细胞的其它方法还可以包括改进的磷酸钙沉淀、聚凝胺沉淀、脂质体融合和受体介导的基因递送。

[0259] 能够携带、表达并向培养基中分泌大量感兴趣的TFF2肽以进行后续分离和/或纯化的动物或哺乳动物宿主细胞包括、但不限于人胚肾293细胞(HEK-293)(ATCC CRL-1573);中国仓鼠卵巢细胞(CHO),诸如CHO-K1(ATCC CCL-61),DG44(Chasin等人,(1986) Som. Cell Molec. Genet, 12:555-556;Kolkekar等人,(1997) Biochemistry, 36:10901-10909;和W001/92337A2),二氢叶酸还原酶阴性的CHO细胞(CHO/dhfr-, Urlaub等人,(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4216),和dp12.CHO细胞(美国专利号5,721,121);被SV40转化的猴肾CV1细胞(COS细胞,COS-7,ATCC CRL-1651);人胚肾细胞(例如,293细胞,或为悬浮培养生长而亚克隆的293细胞,Graham等人,(1977) J. Gen. Virol., 36:59);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL-10);猴肾细胞(CV1,ATCC CCL-70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587;VERO,ATCC CCL-81);小鼠塞尔托利细胞(TM4;Mather(1980) Biol. Reprod., 23:243-251);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL-2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL-34);人肺细胞(W138,ATCC CCL-75);人肝细胞瘤细胞(HEP-G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562,ATCC CCL-51);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL-1442);TRI细胞(Mather(1982) Annals NY Acad. Sci., 383:44-68);MCR 5细胞;FS4细胞。被转化以产生经修饰的TFF2多肽的细胞系也可以是淋巴样起源的永生化哺乳动物细胞系,其包括、但不限于骨髓瘤、杂交瘤、三源杂交瘤(trioma)或四源杂交瘤(quadroma)细胞系。所述细胞系还可以包含正常的淋巴样细胞,诸如B细胞,其已通过用病毒(诸如埃巴病毒)转化而永生化(诸如骨髓瘤细胞系或其衍生物)。

[0260] 也可以选择宿主细胞株,其调节插入序列的表达,或以期望的特定方式修饰和加工核酸。蛋白产物的这样的修饰(例如,糖基化和其它翻译后修饰)和加工(例如,切割)可能对蛋白的功能而言是重要的。不同的宿主细胞株对蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰具有特有的和特定的机制。因此,可以选择适当的宿主系统或细胞系以确保所表达的外源蛋白(诸如经修饰的TFF2多肽)的正确修饰和加工。因此,可以使用具有初级转录物的正确加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括HEK-293、3T3、W138、BT483、Hs578T、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、BT20、T47D、NS0(一种不内源性地产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、MDCK、293、HTB2和HsS78Bst细胞。

[0261] 可以针对正在培养的宿主细胞使用各种培养参数。哺乳动物细胞的适当培养条件是本领域众所周知的(Cleveland W L,等人,J Immunol Methods,1983,56(2):221-234),或者可以由熟练的技术人员确定(参见,例如,Animal Cell Culture:A Practical Approach,第2版,Rickwood,D.和Hames,B.D.,编(Oxford University Press:New York,1992))。细胞培养条件可以根据所选宿主细胞的类型而变化。可以使用商购可得培养基。

[0262] 适合培养的细胞可以含有引入的表达载体,诸如质粒或病毒。通过转化、显微注射、转染、脂转染、电穿孔或感染,可以引入表达载体构建体。表达载体可以含有编码蛋白进

行表达和生产的编码序列或其部分。使用本领域技术人员众所周知的和实践的方法,可以产生含有编码所产生的蛋白和多肽的序列以及适当的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括合成技术、体外重组DNA技术和体内基因重组,它们描述于J.Sambrook等人,201,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.和F.M.Ausubel等人,1989,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y。

[0263] 重组蛋白的纯化

[0264] 经修饰的TFF2多肽可以从表达该多肽的任何人或非人细胞中纯化,包括已经用表达经修饰的TFF2多肽的表达构建体转染的细胞。使用本领域已知的方法,可以从通常与TFF2相关联的其它化合物(诸如某些蛋白、碳水化合物或脂质)中分离经纯化的经修饰的TFF2多肽。对于蛋白回收、分离和/或纯化,将细胞培养基或细胞裂解物离心以除去微粒细胞和细胞碎片。通过合适的纯化技术从污染性的可溶蛋白和多肽中分离或纯化出期望的经修饰的TFF2多肽。蛋白的非限制性纯化方法包括:尺寸排阻色谱法;亲和色谱法;离子交换色谱法;乙醇沉淀;反相HPLC;在树脂(诸如硅树脂)或阳离子交换树脂(例如,DEAE)上的色谱法;色谱聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如Sephadex G-75、**Sepharose®**的凝胶过滤;用于除去免疫球蛋白污染物的蛋白A琼脂糖色谱法;等等。其它添加剂诸如蛋白酶抑制剂(例如,PMSF或蛋白水解酶K)可以用于在纯化过程中抑制蛋白水解性降解。也可以使用可选择碳水化合物的纯化程序,例如,离子交换软凝胶色谱法,或使用阳离子或阴离子交换树脂的HPLC,其中收集酸性较高的级分。

[0265] 实施例

[0266] 下面提供了实施例以便于更全面地理解本公开内容。以下实施例举例说明了制造和实践本发明的示例性模式。但是,本公开内容的范围不限于在这些实施例中公开的具体实施方案,所述具体实施方案仅用于举例说明的目的,因为可以利用替代方法来获得类似的结果。

[0267] 实施例1-具有His_Strep-标签的经修饰的人TFF2多肽的密码子优化

[0268] 在下面SEQ ID NO:32中显示了具有His_Strep-标签的经修饰的人TFF2多肽的优化密码子:

```
1   ATG GGC AGA AGA GAC GCA CAG CTA TTA GCT GCT CTG CTG GTG TTA GGA CTG TGT GCT TTG GCT GGA TCT GAG AAG
76  CCT TCT CCT TGC CAG TGT TCT AGA CTG AGC CCC CAC AAT AGG ACC AAT TGC GGC TTT CCA GGC ATC ACC TCT GAT
151 CAG TGC TTC GAT AAT GGC TGC TGC TTC GAT AGC AGC GTT ACA GGC GTT CCT TGG TGC TTC CAT CCT CTG CCT AAA
[0269] 226 CAG GAA AGC GAT CAG TGC GTG ATG GAG GTG TCT GAC AGA AGG AAT TGC GGC TAT CCT GGC ATC TCT CCT GAA GAA
301 TGT GCC AGC AGG AAG TGC TGC TTC AGC AAC TTC ATC TTC GAG GTT CCT TGG TGC TTC TTC CCC AAG TCT GTG GAG
376 GAC TGC CAC TAC GAG AAC CTG TAC TTT CAA GGA GGA GGA GGA GGA TCT CAC CAC CAT CAC CAC CAC CAC CAC
451 CAT CAT GGA GGA GGA GGA TCT GGA GGA TCT TGG TCT CAT CCT CAG TTT GAG AAG TAG
```

[0270] 下面显示了从经优化的DNA序列产生的推导氨基酸序列:SEQ ID NO:33。

1 MGRRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKPSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD
[0271] 51 QCFDNGCCFD SSVTGVPWCF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE
101 CASRKCCFSN FIFEVPWCFF PKSVEDCHYE NLYFQGGGGG GSHHHHHHHH
151 HHGGGSGGS WSHPQFEK*

[0272] 实施例2-经修饰的人TFF2-C-端HULG1 Fc-标签多肽的密码子优化
[0273] 下面显示了TFF2-C-端HULG1 FC-标签的密码子优化的DNA序列:SEQ ID NO:34。
1 ATGGGCAGAA GAGACGCACA GCTATTAGCT GCTCTGCTGG TGTTAGGACT GTGTGCTTGG GCTGGATCTG AGAAGCCTTC
TCCTTGCCAG TGTTCTAGAC
101 TGAGCCCCCA CAATAGGACC AATTGCGGCT TTCCAGGCAT CACCTCTGAT CAGTGCTTCG ATAATGGCTG CTGCTTCGAT
AGCAGCGTTA CAGGCGTTCC
201 TTGGTGCTTC CATCCTCTGC CTAAACAGGA AAGCGATCAG TCGTGATGG AGGTGTCTGA CAGAAGGAAT TGCGGCTATC
CTGGCATCTC TCCTGAAGAA
[0274] 301 TGTGCCAGCA GGAAGTGCTG CTTCAGCAAC TTCATCTTCG AGGTTCCCTG GTGCTTCTTC CCCAAGTCTG TGGAGGACTG
CCACTATGGA GGAGGAGGAT
401 CTGGAGGATC TGCTAGCACA AAAGGACCTA GCGTTTTTCC TCTGGCCCCA TCTAGCAAGA GCACATCTGG CGGAACAGCT
GCTTTGGGAT GTCTGGTGAA
501 GGATTACTTT CCCGAGCCTG TGACAGTGAG CTGGAATTCT GGAGCCCTGA CATCTGGAGT GCACACCTTT CCTGCTGTTC
TGCAGTCTTC TGGCCTGTAT
601 TCTCTGTCTA GCGTGGTGAC AGTGCCTAGC TCTTCTCTGG GAACACAGAC CTACATCTGC AACGTGAACC ACAAGCCCAG
CAACACCAAG GTGGACAAGA
701 AAGTGGAGCC TAAGAGCTGC GATAAGACCC ACACATGTCC TCCATGTCTT GCCCTGAAC TGTTAGGAGG ACCTAGCGTT
TTCCTGTTTC CACCTAAGCC
801 CAAAGATACC CTGATGATCA GCAGGACCCC TGAGGTGACC TGTGTGGTGG TTGATGTGAG CCATGAGGAT CCTGAAGTGA
AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GCGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCTAGAGAAG AGCAGTACAA TAGCACCTAC AGAGTGGTGA GCGTGCTGAC
AGTGCTGCAC CAGGATTGGC
[0275] 1001TGAATGGCAA GGAGTATAAG TGCAAGGTGA GCAATAAGGC CCTGCCAGCC CCTATCGAGA AGACCATCTC TAAGGCCAAG
GGACAACCTA GAGAACCACA
1101GGTTTACACA CTGCCCCCA GCAGAGATGA GCTGACCAAA AACCAGGTGT CTCTGACATG TCTGGTGAAG GGCTTTTATC
CCAGCGACAT CGCCGTGGAA
1201TGGGAGTCTA ATGGACAGCC CGAGAATAAC TACAAGACCA CACCTCCAGT GCTGGATAGC GATGGCAGCT TCTTCCTGTA
CAGCAAGCTG ACCGTGGATA
1301AAAGCAGATG GCAACAGGGC AACGTGTTTA GCTGCAGCGT GATGCATGAA GCCCTGCACA ACCACTATAC CCAGAAAAGC
CTGAGCCTGT CTCCTGGCAA
1401GTAA

[0276] 下面显示了从经优化的DNA序列产生的推导氨基酸序列:SEQ ID NO:35

1 MGRRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD
51 QCFDNGCCFD SSVTGVPWCF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE
101 CASRKCCFSN FIFEVPWCFF PKSVEDCHYG GGGSGGSAST KGPSVFPLAP
151 SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP
[0277] 251 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
351 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
401 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
451 ALHNHYTQKS LSLSPGK*

[0278] 实施例3-人TFF2-HSA的密码子优化

[0279] 下面显示了人TFF2-HSA密码子优化的DNA (SEQ ID NO:36)。

[0280] >人TFF2-HSA_密码子优化的DNA

[0281] 1 ATGGGCAGAA GAGACGCACA GCTATTAGCT GCTCTGCTGG TGTTAGGACT GTGTGCTTTG GCTGGATCTG AGAAGCCTTC

[0282]

TCCTTGCCAG TGTCTAGAC

101 TGAGCCCCA CAATAGGACC AATTGCGGCT TTCCAGGCAT CACCTCTGAT CAGTGCTTCG ATAATGGCTG CTGCTTCGAT
AGCAGCGTTA CAGGCGTTCC

201 TTGGTGCTTC CATCCTCTGC CTAAACAGGA AAGCGATCAG TGCCTGATGG AGGTGTCTGA CAGAAGGAAT TCGGCTATC
CTGGCATCTC TCCTGAAGAA

301 TGTGCCAGCA GGAAGTGCTG CTCAGCAAC TTCATCTTCG AGGTCCTTG GTGCTTCTTC CCCAAGTCTG TGGAGGACTG
CCACTATGGA GGAGGAGGAT

401 CTGATGCCA TAAATCTGAA GTGGCCACA GGTTCAGGA TCTGGGAGAG GAGAACTCA AGGCCCTGGT GCTGATCGCT
TTTGCTCAAT ACCTGCAGCA

501 GTGCCCTTTT GAGGATCAG TGAACTGGT GAACGAGTG ACCGAGTTTG CCAAGACATG TGTGGCCGAT GAGTCTGCCG
AGAATTGCGA TAAAAGCCTG

601 CACACCTGT TCGGAGACAA GCTGTGTACA GTGGCTACCC TGAGAGAGAC ATATGGCGAA ATGGCCGATT GTTGCGCCA
ACAGGAACCC GAGAGAAATG

701 AGTGCTTCTT GCAGCACAAG GACGACAACC CTAATCTGCC TAGGCTGGTT AGACCTGAGG TGGATGTGAT GTGTACCGC
TTCCACGACA ATGAGGAGAC

801 ATTCTGAAG AAGTACCTGT ACGAGATCG CCGGAGACAC CCTTACTTCT ACGCCCCTGA ACTGCTGTTT TTCGCCAAGA
GATACAAAGC CGCCTTTACC

901 GAGTGCTGTC AGGCTGCCA TAAAGCTGCC TGTTTACTGC CCAAGCTGGA TGAAGTAGA GATGAGGGAA AGGCCTCTAG
CGCCAAGCAG AGACTGAAAT

1001 GTGCTAGCCT GCAGAAGTTT GCGAAAGAG CCTTTAAAGC CTGGGCTGTG GCCAGACTGA GCCAGAGATT TCCTAAAGCC
GAGTTTGCCG AAGTGAGCAA

1101 ATTAGTGACC GACCTGACCA AGGTGCACAC CGAGTGTTGT CATGGCGATC TTCTGGAATG CGCCGATGAT AGAGCTGATC
TGGCCAAGTA CATCTGCGAG

1201 AACCAGGATA GCATCAGCAG CAAGCTGAAG GAGTGTGCG AGAAACCTCT GCTGGAGAAA AGCCACTGTA TCGCCGAAGT
GGAGAACGAC GAGATGCCTG

1301 CTGATCTGCC TTCTTTAGCC GCCGATTTTG TGGAGAGCAA GGATGTGTGC AAGAACTACG CCGAGGCCAA AGACGTGTTT
TTGGGCATGT TCCTGTACGA

1401 GTACGCCAGA AGACACCCTG ATTATAGCGT GGTGCTGCTG CTGAGACTGG CCAAGACATA CGAGACAACA CTGGAGAAGT
GTTGTGCTGC TGCTGATCCT

1501 CACGAGTGTT ACGCCAAGGT GTTCGACGAG TTCAAACCTC TGGTGGAAGA ACCTCAGAAC CTGATCAAGC AGAACTGCGA
GCTGTTTCGAG CAGCTGGGCG

1601 AGTACAAGTT CCAGAATGCT CTGCTGGTGA GATACACCAA GAAAGTGCCT CAGGTGTCTA CCCCCACCCT GGTGAAGTG

AGCAGAAATC TGGGCAAAGT

1701 GGGCTCTAAA TGTGCAAGC ACCCTGAGGC CAAGAGGATG CCTTGTGCCG AGGATTATCT GTCTGTGGTG CTGAATCAAC
TGTGTGTGCT GCACGAGAAG

1801 ACCCTGTGA GCGACAGAGT GACAAAGTGT TGTACCGAGT CTCTGGTGAA CAGAAGACCC TGCTTTTCTG CCCTGGAGGT
GGATGAGACC TATGTGCCTA

[0283]

1901 AGGAGTTCAA TGCCGAGACC TTTACCTTCC ATGCCGACAT CTGCACCCTG AGCGAGAAAAG AGAGGCAGAT CAAGAAACAG
ACAGCCCTGG TTGAACTGGT

2001 GAAGCACAAG CCTAAGGCCA CCAAAGAGCA GCTGAAAGCC GTTATGGACG ATTTTGCCGC CTTTGTGGAG AAGTGCTGTA
AGGCCGACGA TAAGGAGACC

2101 TGTTTCGCCG AAGAGGGAAA AAAGCTGGTT GCTGCCTCTC AAGCTGCTCT GGGCCTGTAA TAA

[0284]

下面的SEQ ID NO:37显示了推导的TFF2-HSA氨基酸序列:

1 MGRRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKPSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD
51 QCFDNGCCFD SSVTGVPCWF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE
101 CASRKCCFSN FIFEVPWCFF PKSVEDCHYG GGGSDAHKSE VAHRFKDLGE
151 ENFKALVLIA FAQYLQCPF EDHVKLNEV TEFAKTCVAD ESAENCCKSL
201 HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLRLV
251 RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT
301 ECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQ RLKASLQKF GERAFAKAWAV

[0285]

351 ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDILLECADD RADLAKYICE
401 NQDSISSKLK ECCEKPLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC
451 KNYAEAKDVF LGMFLYFYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP
501 HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCSELF QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP
551 QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK
601 TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL
651 SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKADDKET
701 CFAEEGKKLV AASQAALGL* *

[0286]

实施例4-人TFF2-CTPX2-FLAG X3的密码子优化

[0287]

人TFF2-CTPX2-FLAG X3_密码子优化的DNA (SEQ ID NO:38):

1 ATGGGCAGAA GAGACGCACA GCTATTAGCT GCTCTGCTGG TGTTAGGACT GTGTGCTTTG GCTGGATCTG AGAAGCCTTC

[0288]

TCCTTGCCAG TGTCTAGAC

101 TGAGCCCCCA CAATAGGACC AATTGCGGCT TTCCAGGCAT CACCTCTGAT CAGTGCTTCG ATAATGGCTG CTGCTTCGAT

AGCAGCGTTA CAGGCGTTCC

201 TTGGTGCTTC CATCCTCTGC CTAAACAGGA AAGCGATCAG TCGTGATGG AGGTGTCTGA CAGAAGGAAT TCGGCTATC
CTGGCATCTC TCCTGAAGAA

301 TGTGCCAGCA GGAAGTGCTG CTTCAGCAAC TTCATCTTCG AGGTTCTTG GTGCTTCTTC CCCAAGTCTG TGGAGGACTG
CCACTACAGC AGCTCTTCTA

[0289]

401 AAGCTCTCC TCCTTCTCTG CCTTCTCCTT CTAGACTTCC TGGCCCTAGC GATACCCCTA TTCTGCCTCA AAGCAGCAGC
TCTAAAGCTC CTCCTCCTTC

501 TTTACCTAGC CCCAGCAGAC TTCCTGGACC TTCTGATACC CCTATCCTGC CTCAAACAGG CATGGACTAT AAGGACGACG
ACGACAAGGA CTACAAGGAC

601 GACGACGACA AGGACTACAA GGATGACGAC GACAAAGCCA GCTAA

[0290] 下面显示了推导的TFF2-HSA氨基酸序列(SEQ ID NO:39)：

1 MGRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD

51 QCFDNGCCFD SSVTGVPWCF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE

[0291] 101 CASRKCCFSN FIFEVPWCFF PKSVEDCHYS SSSKAPPPSL PSPSRLPGPS

151 DTPILPQSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQTGMDY KDDDDKDYKD

201 DDDKDYKDDD DKAS*

[0292] 在CHO-S瞬态系统中表达实施例1-4的所有构建体。使用蛋白质印迹和抗-huTFF2分析这三种变体的表达。

[0293] 实施例5-通过钙动员测量经修饰的TFF2多肽活性

[0294] 将Jurkat细胞、KATO-III和/或AsPC-1细胞(2.5×10^6 个细胞/ml)重新悬浮在含有0.5%BSA的RPMI 1640培养基中并与终浓度为5mM的 Ca^{2+} 结合染料Indo-1 AM一起在37°C在暗处在搅拌下温育1小时。将加载的细胞洗涤,重新悬浮在含有2mM CaCl_2 和1mM MgCl_2 的汉克氏平衡盐溶液介质中,并在室温放置20min。将细胞等分进荧光活化的细胞分选试管中,立即将试管转移进37°C水浴另外5min然后测量。然后将平衡过的细胞用于使用LSRII机器(BD Biosciences)进行 Ca^{2+} 水平的流式细胞计数分析。在最初的25-30秒记录基线细胞内 Ca^{2+} 水平,随后用指定浓度的SDF-1a、TFF2、胃泌素、离子霉素或稀释剂(磷酸盐缓冲盐水)刺激。以2000个事件/秒的速度继续数据收集另外4-10分钟。细胞溶质 Ca^{2+} 与Indo-1的结合的增加导致Indo-1的发射谱从510nm(游离形式)变化为420nm(Ca^{2+} -结合形式)。因而,测量蓝色(4',6-二脒基-2-苯基-吡啶通道,420nm)和紫罗兰色(Indo通道,510nm)细胞荧光,并使用FlowJo软件(6.4版;Tree Star, Inc.)将数据绘图。在将细胞与AMD3100一起或与抗-CXCR4 mAb 12G5或2B11(eBioscience)一起在37°C预温育40min以后,相应地测量在有AMD3100或抗-CXCR4抗体存在下响应于SDF-1a或TFF2的细胞内钙动员。

[0295] 实施例6-通过ERK1/2的磷酸化测量经修饰的TFF2多肽活性

[0296] 使用Perkin Elmer的AlphaLISA SureFire Ultra p-ERK 1/2(Thr202/Tyr204)测定试剂盒,通过ERK1/ERK2的磷酸化在Jurkat人急性T细胞白血病细胞、KATO-III人胃癌细胞和/或AsPC-1人胰腺细胞(所有细胞系由ATCC提供)中测量经修饰的TFF2多肽活性。根据ATCC提供的说明书,将细胞系解冻和扩增。将细胞通过离心进行收获,并以 10^7 个细胞/mL重

新悬浮在HBSS中。将细胞以4mL细胞/孔接种在384孔白色不透明培养板(PerkinElmer)中并在37℃温育1-2小时。将在含有0.1%BSA的HBSS中浓度为10-30mg/mL的4mL的重组TFF2的野生型和变体加入平板以刺激细胞并在37℃温育5-30分钟。将细胞用2mL/孔的裂解缓冲液裂解,随后加入5mL受体混合物。然后将平板用Topseal-A粘性膜密封并在室温温育1小时。并且然后在暗光下向孔中加入5mL供体混合物,用Topseal-A粘性膜密封,覆盖箔并在室温在暗处温育1小时。使用标准的AlphaPlex设置在AlphaPlex相容的平板读数器上读出平板。用AMD3100(Sigma)(一种CXCR4小分子拮抗剂)或抗-CXCR4 mAb 12G5和2B11(eBioscience)在37℃进行CXCR4的TFF2刺激的抑制1-2小时,然后加入重组TFF2。

[0297] 实施例7-结直肠腺癌

[0298] 一名51岁男性,无结直肠癌或可能与Lynch综合征亲缘族一致的其它恶性肿瘤的家族史,在通过结肠镜检查进行其首次常规筛查评价并发现在横结肠中有部分梗阻块之前,他一直处于其正常健康状态。活组织检查证实具有淋巴血管侵入的中分化腺癌的存在。反射性分子试验提示KRAS外显子2突变:(+),BRAF突变:(-)。但是,该患者被鉴定为转移性微卫星不稳定性高(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)或dMMR/MSI-H:(+)。随后的分期CT扫描鉴定出小容量肝脏和腹膜疾病,无腹腔外转移。患者被归类为无症状IV期结直肠癌,并且没有困难地成功完成横结肠切除术。此后六周,患者开始左亚叶酸(FOL或Fusilev®)、5-氟尿嘧啶(5-FU或F)和奥沙利铂(OX或Eloxatin®,一种铂细胞毒性剂,其在DNA中形成链间和链内交联)或“FOLFOLX”+贝伐珠单抗(Avastin®)的方案。在FOLFOLX-贝伐珠单抗的第6个周期后的重新分期与接近完全减轻(nCR)相一致。尽管患者对治疗的耐受性良好,但其健康状况仍在下降,继续“维持”贝伐珠单抗/氟尿嘧啶,并且他进入观察程序。患者在14个月内表现良好,此时他注意到呼吸困难的发作。CT扫描提示在右侧新的大面积胸腔积液、腹水和进行性肝转移,并伴有明显的肝功能试验异常。大容量胸腔穿刺术证实恶性胸腔积液的存在,具有腺癌的细胞学证据。给患者放置胸管,然后进行成功的胸膜剥脱术。患者开始使用FOLFIRI-贝伐珠单抗的第二线疗法。患者再次耐受治疗良好,并且在第4个周期后的重新分期CT扫描与部分减轻(PR)一致。患者继续左亚叶酸(FOL)、5-FU(F)和伊立替康(IRI或Camptosar®,一种拓扑异构酶I抑制剂)FOLFIRI-贝伐珠单抗,并计划在毒性允许的情况下治疗至进展。在FOLFIRI-Avastin的第10个周期后的重新分期记录了进行性肝转移和复发性腹水。患者开始使用单一药剂派姆单抗(Keytruda®)的疗法,但无应答。随后用经修饰的TFF2多肽开始治疗,患者实现部分客观应答。用经修饰的TFF2多肽和派姆单抗开始联合治疗,其导致完全应答以及肿瘤和转移的消退。

[0299] 实施例9-食管鳞状细胞癌

[0300] 患者为58岁男性,有烟草滥用史,在出现吞咽困难和间歇性剑突下不适之前,他一直处于正常的健康状态。在多次姑息性干预(包括组胺受体2型(H2)阻滞剂和质子泵阻滞剂)失败后,他在正式的胃肠病学会诊中被发现,并接受上消化道内窥镜检查,当时他被告知有一个部分阻塞性的、3.2厘米的外生性中食道肿块。病理检查显示为中分化鳞状细胞癌。PD-L1综合阳性评分(CPS):20%。分期PET/CT扫描和内窥镜超声与T4aN0疾病一致,并确认肿瘤可切除。患者成功地完成了同时进行的每周低剂量新辅助卡铂/紫杉醇(一种微管蛋白抑制剂,Taxol®)和放射疗法,然后进行了最终的手术切除。手术病理学检查没有发现残

留恶性肿瘤的任何证据。九个月后,患者出现厌食和体重减轻。CT扫描记录了肝和肺转移的存在。CT导向的芯针穿刺活组织检查证实转移性鳞状细胞癌的存在。PD-L1综合阳性评分(CPS):16%。由于第一线化学疗法(在该情况下,新辅助化疗)后无进展存活(PFS)>6个月,且患者具有良好的表现状态(ECOG<1),尤其是如果患者出现快速进展或症状严重的疾病,需要早期和有意义的应答来稳定病情,则开始第二线疗法。患者接受六个周期的FOLFIRI并达到平台期部分减轻(PR)和进入观察程序。四个月后,常规监测CT扫描显示转移性疾病的进展。患者维持ECOG 1表现状态并希望进行额外治疗。患者开始单一药剂派姆单抗治疗,但没有应答。随后,用经修饰的TFF2多肽开始治疗,患者实现部分客观应答。用经修饰的TFF2多肽和派姆单抗开始联合治疗,其导致完全应答以及肿瘤和转移的消退。

[0301] 实施例10-胃/食管腺癌

[0302] 患者为47岁女性,在18个月前出现消化不良和间歇性剑突下不适之前,她一直处于正常的健康状态。在多次姑息性干预(包括H2和质子泵阻滞剂)失败后,她在正式的胃肠病学会诊中被发现,并接受了上消化道内窥镜检查,当时她被告知(在胃贲门/远端食管处)有一个2.2厘米的外生肿块。病理检查显示为低分化腺癌。没有证据表明幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染,Her2免疫组织化学(IHC)染色为0。PD-L1综合阳性评分(CPS):12%。分期CT扫描记录了局部淋巴结病和低容量肝转移的存在。该患者被归类为具有不可切除的低容量IV期低分化胃/食管腺癌。基于症状轻微且CPS>10的低容量疾病,根据KEYNOTE-062试验的结果,患者开始单一药剂派姆单抗作为第一线疗法,其中具有CPS>10、OS(相对于CDDP/氟嘧啶)的患者得到改善(17.4个月相对于10.8个月),几乎没有所有级别或3/4级毒性。但是,患者的病情进展,并且她出现了一个体积庞大且有症状的肿瘤(6.0cm原发性、广泛性肝转移)和PD-L1 CPS<10。随后,她接受了五个周期的FOLFOX并实现了平台期部分减轻(PR)。虽然治疗通常被良好耐受,但她经历2级周围神经病变。患者被安排到观察程序中。七个月后,常规监测CT扫描显示进行性肝转移和新的肺转移。患者维持ECOG 1表现状态,并开始使用雷莫芦单抗(Cyramza®,一种直接VEGFR2拮抗剂)和紫杉醇的治疗。第4周期后重新分期CT扫描与稳定疾病一致。但是,患者的周围神经病变恶化,紫杉醇被停用。她维持单一药剂雷莫芦单抗,但三个月后进展。根据KEYNOTE-059研究的结果(两线或更多线化疗失败),患者被转为单一药剂派姆单抗治疗。患者开始单一药剂派姆单抗,但没有应答。随后,用经修饰的TFF2多肽开始治疗,患者实现了部分客观应答。用经修饰的TFF2多肽和派姆单抗开始联合治疗,其导致完全应答以及肿瘤和转移的消退。

[0303] 实施例11-胰腺癌

[0304] 患者为39岁女性,总体健康状况良好直到她报告出现原因不明的中部胸背痛,所述背痛通过间歇性使用非甾体类抗炎药(NSAID)得以控制。患者出现盗汗、一周巩膜黄疸和尿变黑。临床评价证实了黄疸的存在,化学检查鉴定出胆汁淤积性肝功能障碍的模式,总胆红素为12.2mg/dl。CT扫描显示在胰腺头部有一个8.4cm肿块,肝门淋巴结病,散在的双侧肝脏小肿块,胆总管明显扩张。内窥镜逆行胰胆管造影术(ERCP)和肝支架置入术是成功的,并且胆红素恢复至正常水平。CT导向的肝活组织检查证实低分化KRAS的存在:(+) TP53:(+) 腺癌。CA19-9显著升高(710)。这种表现与不可切除的胰腺IV期腺癌最为一致。没有胰腺癌、乳腺癌或卵巢癌的家族史,也没有已知的BRCA2突变。患者经历下一代测序(NGS)。没有证据表明BRCA2或PALB2的种系突变。但是,患者是dMMR/MSI-H。对患者开始改良的FOLFIRINOX方案

(FOL+F+伊立替康或“IRIN”+OX), 并成功完成了六个治疗周期, 通常耐受良好。在第4个和第6个周期后的重新分期CT扫描与稳定的平台期部分减轻相一致。患者进入观察程序并保持良好, 直到四个月后常规监测CT扫描证实肝转移的无症状低容量进展的存在。对患者开始单一药剂纳武单抗(Opdivo®), 但没有应答。随后用经修饰的TFF2多肽开始治疗, 患者实现部分客观应答。用经修饰的TFF2多肽和纳武单抗开始联合治疗, 其导致完全减轻和肿瘤的消退。

[0305] 实施例12-稳定化的重组TFF2 (TFF2-CTP) 在结直肠癌的小鼠模型中增强PD-1阻断的抗肿瘤活性

[0306] 尽管免疫检验点阻断在多种肿瘤类型中有显著应答, 但在结直肠癌 (CRC) 中的临床益处限于微卫星不稳定肿瘤。PD-L1表达是CRC的阴性预后标志物, 但与对PD-1阻断的更好应答相关。在本实施例中, 研究了PD-L1在结直肠肿瘤发生中的作用, 并在结直肠癌 (CRC) 的小鼠模型中评价了靶向骨髓源性抑制细胞 (MDSC) 联合PD-1阻断的效用。产生了条件性表达鼠Pd11基因 (R26-LSL-Pd11-EGFP) 的敲入小鼠, 并与LysM-Cre小鼠杂交以在骨髓谱系中特异性过表达PD-L1。AOM/DSS治疗的小鼠在AOM后10周时形成肿瘤, 并在AOM后17周发展为腺癌。参见图3A至3D。与未经处理的小鼠相比, AOM/DSS处理导致髓样细胞、尤其是CD11b+Gr-1+MDSC的显著扩增。参见图4A至4C。此外, 肿瘤内CD8+ T细胞显著减少, 表明抗肿瘤免疫减弱。参见图5A至5C。AOM/DSS处理的过表达PD-L1的LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠表现出显著增强的早期结直肠肿瘤发生, 肿瘤数目和大小显著增加。参见图6A至6F。TFF2是一种分泌型抗炎肽, 其通过抑制CD11b+Gr-1+MDSC的扩增来抑制结肠肿瘤生长。与两个羧基端肽和三个Flag基序融合的TFF2 (TFF2-CTP-Flag) 延长了在血液中的循环时间, 但保留了生物活性。参见图7A至7E。我们用AOM/DSS在R26-PD-L1和LysM-Cre;R26-PD-L1小鼠中诱导了肿瘤;施用了融合重组TFF2-CTP-Flag和/或抗-PD-1抗体。与TFF2-CTP组合的抗-PD-1抗体表现出肿瘤生长的显著减少, 而抗-PD-1单一疗法未能抑制生长。令人感兴趣的是, 联合治疗在过表达PD-L1的小鼠中显示出比对照动物更大的抗肿瘤活性。参见图8。治疗应答者显示显著增加的肿瘤浸润性CD8+ T细胞, CD11b+Gr-1+髓样细胞伴随减少。参见图9。这些早期发现表明, TFF2可能通过抑制MDSC扩增而提高CRC对PD-1阻断的应答率, 从而支持与I-0治疗组合的TFF2-CTP对于CRC的潜力。

[0307] 因此, 抗-PD-1单一疗法不能在CRC中激发抗肿瘤免疫, 但TFF2-CTP增强了抗-PD-1疗法的效力。与TFF2-CTP组合的抗-PD-1在过表达PD-L1的小鼠中显示出更大的抗肿瘤活性。对单独的TFF2-CTP或与PD-1阻断组合的TFF2-CTP的应答者具有增加的肿瘤浸润性CD8+ T细胞, 以及减少的MDSC。

[0308] 实施例13-TFF2-人血清白蛋白 (HSA) 融合体的表达和纯化

[0309] 基因合成

[0310] 对TFF-2 HSA蛋白进行密码子优化并使用Codex基因合成进行合成。合成的TFF-2 HSA蛋白为: TFF2-HSA[WT]; TFF2-HSA[D I/I]; TFF2-HSA[D II/I]; TFF2-HSA[D II/II]; TFF2-HSA[LBD I/I]; TFF2-HSA[LBD II/I]和TFF2-HSA[LBD II/II]。寡核苷酸由Codex合成, 并在SGI/Codex汇编程序中组装基因。使用SGI将合成的基因亚克隆进表达载体pAB2 (用XbaI和BamHI消化)。使用重叠的30bp序列将感兴趣的基因Gibson组装到pAB2中。将含有感兴趣的基因的载体转化进NEB®5-α感受态大肠杆菌[(高效率); NEB; C2987H]。选取三个

菌落,并通过mini-prep放大进行DNA分离。然后将这三个菌落送去测序。在序列验证后,放大阳性克隆并分离质粒DNA。

[0311] 转染

[0312] 在转染前一天,将HEK293细胞接种在烧瓶中。在转染当天,测量细胞计数和培养物活力,一旦培养物达到 1.8×10^6 - 2.2×10^6 个细胞/mL且活力>96%,则继续转染。然后将DNA重新悬浮在FectoPro (Polyplus) 转染试剂中,并在无血清培养基中稀释,并在室温温育。然后在旋转烧瓶的同时将转染复合物轻轻添加给HEK293细胞,并随后移回37°C培养箱。在转染后4-5小时,然后用新鲜培养基喂饲细胞培养物。在转染后6天,收获细胞上清液,通过离心澄清。

[0313] 蛋白纯化

[0314] 用AlbuPure® (产品代码3151, Prometic Bioseparations®, Ltd.) 选择性亲和色谱法吸附柱纯化HSA-标记的人TFF2蛋白。将柱首先用5个柱体积(CV)的0.5N NaOH洗涤,然后用5个CV的高压灭菌E-纯水洗涤。然后用10个CV的50mM柠檬酸钠pH 5.5(缓冲液A)平衡柱。然后将蛋白级分装载到柱上,并随后用10个CV的缓冲液A洗涤。然后用5个CV的50mM乙酸铵、10mM辛酸钠(pH 7.0)从柱上洗脱纯化的蛋白。

[0315] SDS-PAGE

[0316] 将样品在NuPAGE凝胶4-12%Bis-Tris 1.0mm, 12-孔(Invitrogen®, 目录号NP0302BOX)上运行。将样品(2μg)在NuPAGE LDS样品缓冲液(4X)中装载,并在MES缓冲液(Invitrogen®, 目录号NP002-02)中在200V运行30分钟。Precision Plus MW标准品被用作分子量标准(Bio-Rad®, 目录号161-0374)。将凝胶用Simply Blue Stain(Invitrogen®, 目录号LC6060)染色。在凝胶中运行澄清的收获物、穿流物、洗液和蛋白A洗脱样品。参见图10。图11显示了每种纯化的TFF2-HAS变体的所得产率。

[0317] 本文引用的所有专利、专利申请和公开以及非专利出版物特此通过引用整体并入。

[0318] 已经描述了本公开内容的许多实施方案。尽管如此,应该理解,可以在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下做出各种修改。因此,其它实施方案在下述权利要求的范围内。

序列表

<110> 通尼克斯制药有限公司 (TONIX PHARMA LIMITED)

<120> 经修饰的TFF2多肽

<130> 104545-0046-W01

<140>

<141>

<150> 63/041,097

<151> 2020-06-18

<150> 62/943,803

<151> 2019-12-04

<150> 62/892,520

<151> 2019-08-27

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Gly Arg Arg Asp Ala Gln Leu Leu Ala Ala Leu Leu Val Leu Gly
1 5 10 15
Leu Cys Ala Leu Ala Gly Ser Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser
 20 25 30
Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr
 35 40 45
Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr
 50 55 60
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln
65 70 75 80
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile
 85 90 95
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile
 100 105 110
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His
 115 120 125
Tyr
<210> 2
<211> 717

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

cacggtggaa gggctggggc cacggggcag agaagaaagg ttatctctgc ttgttgaca	60
aacagagggg agattataaa acatacccg gaggtagacac catgcattct gcaagccacc	120
ctgggggtgca gctgagctag acatgggacg gcgagacgcc cagctcctgg cagcgctcct	180
cgtcctgggg ctatgtgccc tggcggggag tgagaaaccc tccccctgcc agtgctccag	240
gctgagcccc cataacagga cgaactgcgg cttccctgga atcaccagt accagtgttt	300
tgacaatgga tgctgtttcg actccagtgt cactggggtc ccctggtgtt tccacccct	360
cccaaagcaa gagtcggatc agtgcgtcat ggaggtctca gaccgaagaa actgtggcta	420
cccgggcac agccccgagg aatgcgcctc tcggaagtgc tgcttctcca acttcatctt	480
tgaagtgccc tgggtgttct tcccgaagtc tgtggaagac tgccattact aagagaggct	540
ggttccagag gatgcatctg gctcaccggg tgttccgaaa ccaaagaaga aacttcgcct	600
tatcagcttc atacttcatg aaatcctggg ttttcttaac catcttttcc tcattttcaa	660
tggtttaaca tataatttct ttaaataaaa cccttaaaat ctgctaaaaa aaaaaaa	717

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 3

Met Arg Pro Arg Gly Ala Pro Leu Leu Ala Val Val Leu Val Leu Gly	
1 5 10 15	
Leu His Ala Leu Val Glu Gly Glu Lys Pro Ser Pro Cys Arg Cys Ser	
20 25 30	
Arg Leu Thr Pro His Asn Arg Lys Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr	
35 40 45	
Ser Glu Gln Cys Phe Asp Leu Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Ala	
50 55 60	
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Asn Gln Glu Ser Glu Gln	
65 70 75 80	
Cys Val Met Glu Val Ser Ala Arg Lys Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile	
85 90 95	
Ser Pro Glu Asp Cys Ala Ser Arg Asn Cys Cys Phe Ser Asn Leu Ile	
100 105 110	
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Gln Ser Val Glu Asp Cys His	
115 120 125	

Tyr

<210> 4

<211> 571

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 4

```

attctgcagg ctgcccaggt ccagtggagc agacatgcga cctcgaggtg cccccctgct      60
ggcagtggtc ctggtttttg gactgcatgc tctggtagag ggcgagaaac cttccccctg      120
tcggtgctcc aggctgacac cccacaacag aaagaactgt ggcttcccgg gcatcaccag      180
tgagcagtgct tttgatcttg gatgctgctt tgactctagc gtcgctgggg tcccttggtg      240
tttccaccca cttccaaacc aagaatcgga gcagtgtgtc atggaagtgt cagctcgcaa      300
gaattgtggg taccggggca tcagtcccga ggactgtgcc agtcgaaact gctgcttttc      360
caacctgatac tttgaagtgc cctgggtgtt cttcccacag tctgtggaag attgtcacta      420
ctgagagttg ctactgccga gccaccggtt ccctggggagc tgcaagccag aagaaagttt      480
caaccagact tcataaatct ctgggggttc taaaaccatc ttgacctta gcagtggcta      540
gacacagcat tttccaagta aagaaaagtt g                                     571

```

<210> 5

<400> 5

000

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

```

Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg
1           5           10           15
Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn
          20           25           30
Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys Phe His
          35           40           45
Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln Cys Val Met Glu Val Ser Asp
          50           55           60
Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser
65           70           75           80
Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe
          85           90           95
Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr
          100          105

```

<210> 7

<400> 7

000

<210> 8

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列说明：合成的6xHis标签"
<400> 8
His His His His His His
1 5
<210> 9
<400> 9
000
<210> 10
<400> 10
000
<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注释="关于未知的说明：CTP肽序列"
<400> 11
Phe Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
1 5 10 15
Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25 30
<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列说明：合成的肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> 除脯氨酸外的任意氨基酸
<400> 12

Val Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="关于置换和优选实施方案的详述
参见提交的说明书"

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Ala

20

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys

1 5 10 15

Gln Ala

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 16

Met Met Ala Ala Gly Pro Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ala Leu

1	5	10	15
Leu Cys Leu Pro Trp Thr Gln Val Val Gly			
	20	25	
<210> 17			
<211> 23			
<212> PRT			
<213> 果蝇属(Drosophila sp.)			
<400> 17			
Met Lys Leu Ile Ala Val Thr Ile Ile Ala Cys Ile Leu Leu Ile Gly			
1	5	10	15
Phe Ser Asp Leu Ala Leu Gly			
	20		
<210> 18			
<211> 24			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 18			
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala			
1	5	10	15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg			
	20		
<210> 19			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 19			
Met Ser Met Leu Val Val Phe Leu Leu Leu Trp Gly Val Thr Trp Gly			
1	5	10	15
Pro Val Thr Glu Ala			
	20		
<210> 20			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 未知			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="关于未知的说明：切割位点肽"			
<400> 20			
Leu Val Pro Arg Gly Ser			

1 5
 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="关于未知的说明：切割位点肽"
 <400> 21
 Asp Asp Asp Lys
 1
 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="关于未知的说明：切割位点肽"
 <400> 22
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="关于未知的说明：切割位点肽"
 <400> 23
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 24
 Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser

	20	25	30
Val Thr Gly Val Pro Trp Cys			
35			
<210> 25			
<211> 38			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 25			
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile			
1 5 10 15			
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile			
20 25 30			
Phe Glu Val Pro Trp Cys			
35			
<210> 26			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"			
<400> 26			
Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg			
1 5 10 15			
Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn			
20 25 30			
Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys Phe His			
35 40 45			
Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His			
50 55 60			
Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Ser Asp Gln Cys Phe			
65 70 75 80			
Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys			
85 90 95			
Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr			
100 105			
<210> 27			
<211> 105			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 27

Glu	Lys	Pro	Ser	Pro	Cys	Gln	Cys	Val	Met	Glu	Val	Ser	Asp	Arg	Arg
1				5					10					15	
Asn	Cys	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Lys
			20					25						30	
Cys	Cys	Phe	Ser	Asn	Phe	Ile	Phe	Glu	Val	Pro	Trp	Cys	Phe	His	Pro
		35					40						45		
Leu	Pro	Lys	Gln	Glu	Ser	Asp	Gln	Cys	Val	Met	Glu	Val	Ser	Asp	Arg
		50				55				60					
Arg	Asn	Cys	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg
65					70				75						80
Lys	Cys	Cys	Phe	Ser	Asn	Phe	Ile	Phe	Glu	Val	Pro	Trp	Cys	Phe	Phe
				85					90					95	
Pro	Lys	Ser	Val	Glu	Asp	Cys	His	Tyr							
			100					105							

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 28

Glu	Lys	Pro	Ser	Pro	Cys	Gln	Cys	Val	Met	Glu	Val	Ser	Asp	Arg	Arg
1				5					10					15	
Asn	Cys	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Lys
			20					25						30	
Cys	Cys	Phe	Ser	Asn	Phe	Ile	Phe	Glu	Val	Pro	Trp	Cys	Phe	His	Pro
		35					40						45		
Leu	Pro	Lys	Gln	Glu	Ser	Asp	Gln	Cys	Ser	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Asn
		50				55				60					
Arg	Thr	Asn	Cys	Gly	Phe	Pro	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	Gln	Cys	Phe	Asp
65					70				75						80
Asn	Gly	Cys	Cys	Phe	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	Gly	Val	Pro	Trp	Cys	Phe
				85					90					95	

Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr
100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 29

Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg
1 5 10 15
Thr Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile Ser Ser Glu Glu Cys Phe Asp Arg
20 25 30
Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys Phe His
35 40 45
Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln Cys Val Met Glu Val Ser Asp
50 55 60
Arg Arg Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Pro Asp Gln Cys Ala Ser
65 70 75 80
Asn Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe
85 90 95
Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr
100 105

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 30

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

50	55	60
Arg Arg Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr Pro Asp Gln Cys Ala Ser		
65	70	75
Asn Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe		80
	85	90
Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr		95
100	105	

<210> 31

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 31

Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser Arg Leu Ser Pro His Asn Arg	
1	5
Thr Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile Ser Ser Glu Glu Cys Phe Asp Arg	10
	15
	20
Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr Gly Val Pro Trp Cys Phe His	25
	30
	35
Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln Cys Val Met Glu Val Ser Asp	40
	45
	50
Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser	55
65	70
Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe	75
	80
	85
Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His Tyr	90
	95
100	105

<210> 32

<211> 507

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 32

atgggcagaa gagacgcaca gctattagct gctctgctgg tgtaggact gtgtgctttg	60
gctggatctg agaagccttc tccttgccag tgttctagac tgagcccca caataggacc	120

aattgcggct ttccaggcat cacctctgat cagtgccttcg ataatggctg ctgcttcgat 180
agcagcgta caggcggtcc ttggtgcttc catcctctgc ctaaacagga aagcgatcag 240
tgcgtgatgg aggtgtctga cagaaggaat tgcggctatc ctggcatctc tcctgaagaa 300
tgtgccagca ggaagtgtg cttcagcaac ttcatcttcg aggttccttg gtgcttcttc 360
cccaagtctg tggaggactg ccactacgag aacctgtact ttcaaggagg aggaggagga 420
ggatctcacc accatcacca ccaccaccac catcatggag gaggaggatc tggaggatct 480
tggtctcatc ctcagtttga gaagtag 507

<210> 33

<211> 168

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 33

Met Gly Arg Arg Asp Ala Gln Leu Leu Ala Ala Leu Leu Val Leu Gly
1 5 10 15
Leu Cys Ala Leu Ala Gly Ser Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser
 20 25 30
Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr
 35 40 45
Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr
 50 55 60
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln
65 70 75 80
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile
 85 90 95
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile
 100 105 110
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His
 115 120 125
Tyr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser His His
 130 135 140
His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
145 150 155 160
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 165

<210> 34

<211> 1404

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 34

atgggcagaa gagacgcaca gctattagct gctctgctgg tgtaggact gtgtgctttg	60
gctggatctg agaagccttc tccttgccag tgttctagac tgagcccca caataggacc	120
aattgcggct ttccaggcat cacctctgat cagtgcctcg ataatggctg ctgcttcgat	180
agcagcgta caggcgttcc ttggtgcttc catcctctgc ctaaacagga aagcgatcag	240
tgctgatgg aggtgtctga cagaaggaat tgcggctatc ctggcatctc tctgaagaa	300
tgtgccagca ggaagtgtg cttcagcaac ttcattctcg aggttccttg gtgcttcttc	360
cccaagtctg tggaggactg ccactatgga ggaggaggat ctggaggatc tgctagcaca	420
aaaggacctg gcgtttttcc tctggcccca tctagcaaga gcacatctgg cggaacagct	480
gctttgggat gtctggtgaa ggattacttt cccgagcctg tgacagttag ctggaattct	540
ggagccctga catctggagt gcacaccttt cctgctgttc tgcagtcttc tggcctgtat	600
tctctgtcta gcgtggtgac agtgcctagc tcttctctgg gaacacagac ctacatctgc	660
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagtggagcc taagagctgc	720
gataagacct acacatgtcc tccatgtcct gccctgaac tgtaggagg acctagcgtt	780
ttcctgtttc cacctaagcc caaagatacc ctgatgatca gcaggacccc tgaggtgacc	840
tgtgtggtgg ttgatgtgag ccatgaggat cctgaagtga agttcaactg gtacgtggat	900
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagaag agcagtacaa tagcacctac	960
agagtggtag gcgtgctgac agtgctgcac caggattggc tgaatggcaa ggagtataag	1020
tgcaaggtga gcaataaggc cctgccagcc cctatcgaga agaccatctc taaggccaag	1080
ggacaacctg gagaaccaca ggtttacaca ctgccccca gcagagatga gctgacaaa	1140
aaccagggtg ctctgacatg tctggtgaag ggcttttatc ccagcgacat cgccgtggaa	1200
tgaggagtcta atggacagcc cgagaataac tacaagacca cacctccagt gctggatagc	1260
gatggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggata aaagcagatg gcaacagggc	1320
aacgtgttta gctgcagcgt gatgcatgaa gccctgcaca accactatac ccagaaaagc	1380
ctgagcctgt ctcctggcaa gtaa	1404

<210> 35

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 35

Met Gly Arg Arg Asp Ala Gln Leu Leu Ala Ala Leu Leu Val Leu Gly

1	5	10	15
Leu Cys Ala	Leu Ala Gly Ser Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser		
20	25	30	
Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr			
35	40	45	
Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr			
50	55	60	
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln			
65	70	75	80
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile			
85	90	95	
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile			
100	105	110	
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His			
115	120	125	
Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
130	135	140	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
145	150	155	160
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
165	170	175	
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
180	185	190	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
210	215	220	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
225	230	235	240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
245	250	255	
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
260	265	270	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
275	280	285	
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
290	295	300	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
305	310	315	320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 36

<211> 2163

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 36

atgggcagaa gagacgcaca gctattagct gctctgctgg tgtaggact gtgtgctttg	60
gctggatctg agaagccttc tccttgccag tgttctagac tgagcccca caataggacc	120
aattgcggct ttccaggcat cacctctgat cagtgccttcg ataatggctg ctgcttcgat	180
agcagcgtaa caggcggtcc ttggtgcttc catcctctgc ctaaacagga aagcgatcag	240
tgcgtgatgg aggtgtctga cagaaggaat tgcggctatc ctggcatctc tcctgaagaa	300
tgtgccagca ggaagtgctg cttcagcaac ttcattcttcg aggttccttg gtgcttcttc	360
cccaagtctg tggaggactg ccactatgga ggaggaggat ctgatgcca taaatctgaa	420
gtggcccaca ggttcaagga tctgggagag gagaacttca aggccttggt gctgatecgt	480
tttgetcaat acctgcagca gtgccctttt gaggatcacg tgaaactggg gaacgaggtg	540
accgagtttg ccaagacatg tgtggccgat gagtctgccg agaattgcga taaaagcctg	600
cacaccctgt tcggagacaa gctgtgtaca gtggctaccc tgagagagac atatggcgaa	660

```

atggccgatt gttgcgccaa acaggaaccc gagagaaatg agtgcttcct gcagcacaag      720
gacgacaacc ctaatctgcc taggctgggt agacctgagg tggatgtgat gtgtaccgcc      780
ttccacgaca atgaggagac attcctgaag aagtacctgt acgagatcgc ccggagacac      840
ccttacttct acgccccctga actgctgttt ttcgccaaga gatacaaagc cgcctttacc      900
gagtgtctgtc aggctgccga taaagctgcc tgtttactgc ccaagctgga tgaactgaga      960
gatgagggaa aggcctctag cgccaagcag agactgaaat gtgctagcct gcagaagttt    1020
ggcgaaaagag ccttttaaagc ctgggctgtg gccagactga gccagagatt tcctaaagcc    1080
gagtttgccg aagttagcaa attagtgacc gacctgacca aggtgcacac cgagtgttgt    1140
catggcgatc ttctggaatg cgccgatgat agagctgacg tggccaagta catctgcgag    1200
aaccaggata gcatcagcag caagctgaag gagtgttgcg agaaacctct gctggagaaa    1260
agccactgta tcgccgaagt ggagaacgac gagatgcctg ctgatctgcc ttcttttagcc    1320
gccgattttg tggagagcaa ggatgtgtgc aagaactacg ccgaggccaa agacgtgttt    1380
ttgggcatgt tcctgtacga gtacgccaga agacacctg attatagcgt ggtgtgtctg    1440
ctgagactgg ccaagacata cgagacaaca ctggagaagt gttgtgtctg tgctgacct    1500
cacgagtgtt acgccaaggt gttcgacgag ttcaaacctc tgggtggaaga acctcagaac    1560
ctgatcaagc agaactgcga gctgttcgag cagctgggag agtacaagtt ccagaatgct    1620
ctgctggtga gatacaccaa gaaagtgcct caggtgtcta ccccccacct ggttgaagtg    1680
agcagaaaatc tgggcaaagt gggctctaaa tgttgcaagc accctgaggc caagaggatg    1740
ccttgtgccg aggattatct gtctgtggtg ctgaatcaac tgttgtgtgt gcacgagaag    1800
acccctgtga gcgacagagt gacaaagtgt tgtaccgagt ctctggtgaa cagaagaccc    1860
tgctttttctg ccctggaggt ggatgagacc tatgtgccta aggagttcaa tgccgagacc    1920
tttaccttcc atgccgacat ctgcaccctg agcgagaaag agaggcagat caagaaacag    1980
acagccctgg ttgaactggt gaagcacaag cctaaggcca ccaaagagca gctgaaagcc    2040
gttatggacg attttgccgc ctttgtggag aagtgtgtga aggccgacga taaggagacc    2100
tgtttcgccg aagagggaaa aaagctgggt gctgcctctc aagctgtctt gggcctgtaa    2160
taa

```

<210> 37

<211> 719

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 37

```

Met Gly Arg Arg Asp Ala Gln Leu Leu Ala Ala Leu Leu Val Leu Gly
1           5           10           15
Leu Cys Ala Leu Ala Gly Ser Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser
           20           25           30
Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr

```

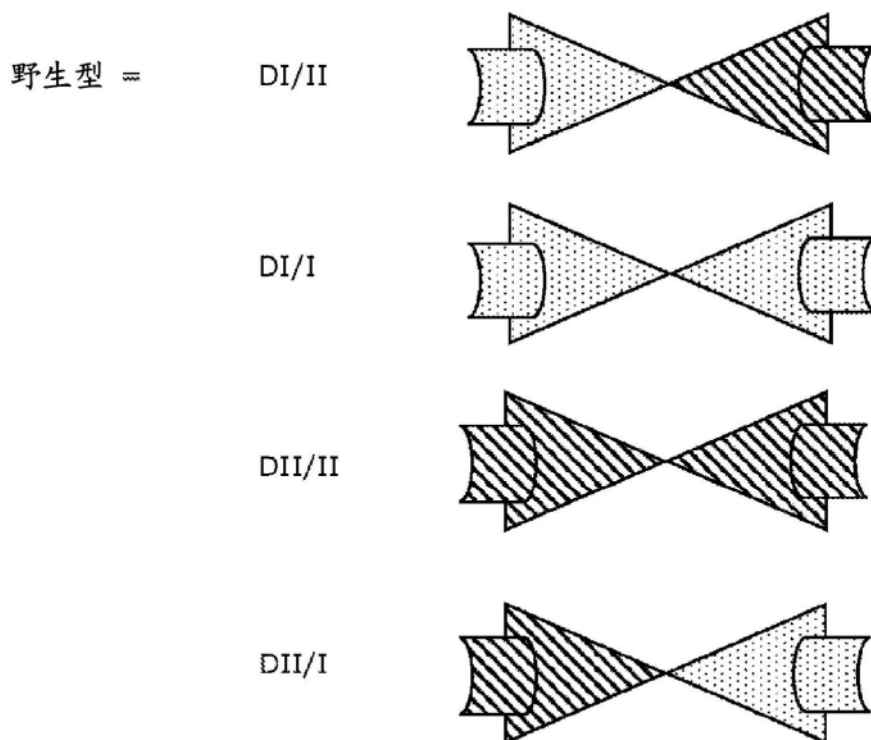
35	40	45
Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr		
50	55	60
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln		
65	70	75
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile		
85	90	95
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile		
100	105	110
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His		
115	120	125
Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg		
130	135	140
Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala		
145	150	155
Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu		
165	170	175
Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser		
180	185	190
Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu		
195	200	205
Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys		
210	215	220
Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys		
225	230	235
Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val		
245	250	255
Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr		
260	265	270
Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu		
275	280	285
Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln		
290	295	300
Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg		
305	310	315
Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser		
325	330	335
Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg		
340	345	350

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu		
355	360	365
Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu		
370	375	380
Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu		
385	390	395
Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro		
405	410	415
Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met		
420	425	430
Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp		
435	440	445
Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe		
450	455	460
Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu		
465	470	475
Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala		
485	490	495
Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys		
500	505	510
Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu		
515	520	525
Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg		
530	535	540
Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val		
545	550	555
Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu		
565	570	575
Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn		
580	585	590
Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr		
595	600	605
Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala		
610	615	620
Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr		
625	630	635
Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln		
645	650	655
Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys		

660	665	670
Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys	Ala Val Met Asp Asp Phe	Ala Ala Phe
675	680	685
Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala	Asp Asp Lys Glu Thr Cys	Phe Ala Glu
690	695	700
Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala	Ala Ser Gln Ala Ala Leu	Gly Leu
705	710	715
<210> 38		
<211> 645		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"		
<400> 38		
atgggcagaa gagacgcaca gctattagct gctctgctgg tgtaggact gtgtgctttg		60
gctggatctg agaagccttc tccttgccag tgttctagac tgagcccca caataggacc		120
aattgcggct ttccaggcat cacctctgat cagtgcctcg ataatggctg ctgcttcgat		180
agcagcgta caggcggtcc ttggtgcttc catcctctgc ctaaacagga aagcgatcag		240
tgcgtgatgg aggtgtctga cagaaggaat tgcggctatc ctggcatctc tcctgaagaa		300
tgtgccagca ggaagtgtg cttcagcaac ttcatcttcg aggttccttg gtgcttcttc		360
cccaagtctg tggaggactg ccactacagc agctcttcta aagctcctcc tccttctctg		420
ccttctcctt ctagacttcc tggccctagc gataccccta ttctgcctca aagcagcagc		480
tctaaagctc ctctccttc ttacctagc ccagcagac ttctggacc ttctgatacc		540
cctatcctgc ctcaaacagg catggactat aaggacgacg acgacaagga ctacaaggac		600
gacgacgaca aggactacaa ggatgacgac gacaaagcca gctaa		645
<210> 39		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"		
<400> 39		
Met Gly Arg Arg Asp Ala Gln Leu Leu Ala Ala Leu Leu Val Leu Gly		
1 5 10 15		
Leu Cys Ala Leu Ala Gly Ser Glu Lys Pro Ser Pro Cys Gln Cys Ser		
20 25 30		
Arg Leu Ser Pro His Asn Arg Thr Asn Cys Gly Phe Pro Gly Ile Thr		

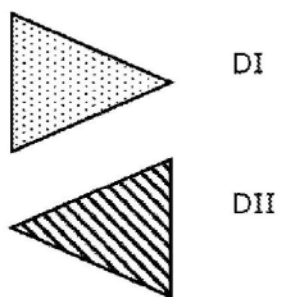
35	40	45
Ser Asp Gln Cys Phe Asp Asn Gly Cys Cys Phe Asp Ser Ser Val Thr		
50	55	60
Gly Val Pro Trp Cys Phe His Pro Leu Pro Lys Gln Glu Ser Asp Gln		
65	70	75
Cys Val Met Glu Val Ser Asp Arg Arg Asn Cys Gly Tyr Pro Gly Ile		
85	90	95
Ser Pro Glu Glu Cys Ala Ser Arg Lys Cys Cys Phe Ser Asn Phe Ile		
100	105	110
Phe Glu Val Pro Trp Cys Phe Phe Pro Lys Ser Val Glu Asp Cys His		
115	120	125
Tyr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser		
130	135	140
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser		
145	150	155
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly		
165	170	175
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Thr Gly Met Asp Tyr Lys Asp		
180	185	190
Asp Asp Asp Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Tyr Lys Asp		
195	200	205
Asp Asp Asp Lys Ala Ser		
210		

野生型和嵌合 rTFF2



图例

TFF2 结构域 (D)



TFF2 配体结合结构域 (LBD)

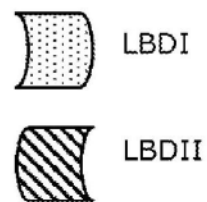
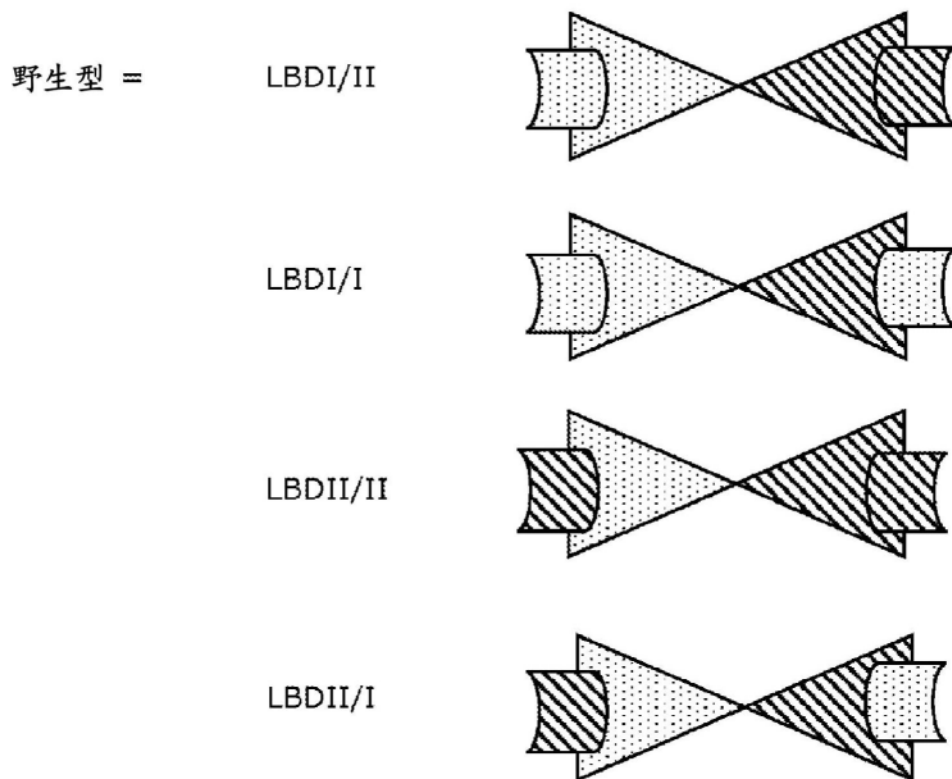


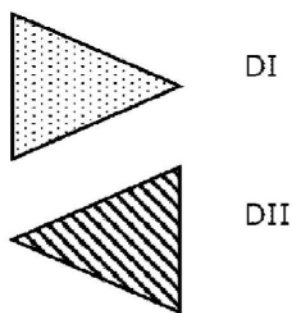
图1

野生型和嵌合 rTFF2



图例

TFF2 结构域 (D)



TFF2 配体结合结构域 (LBD)

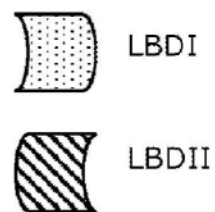


图2

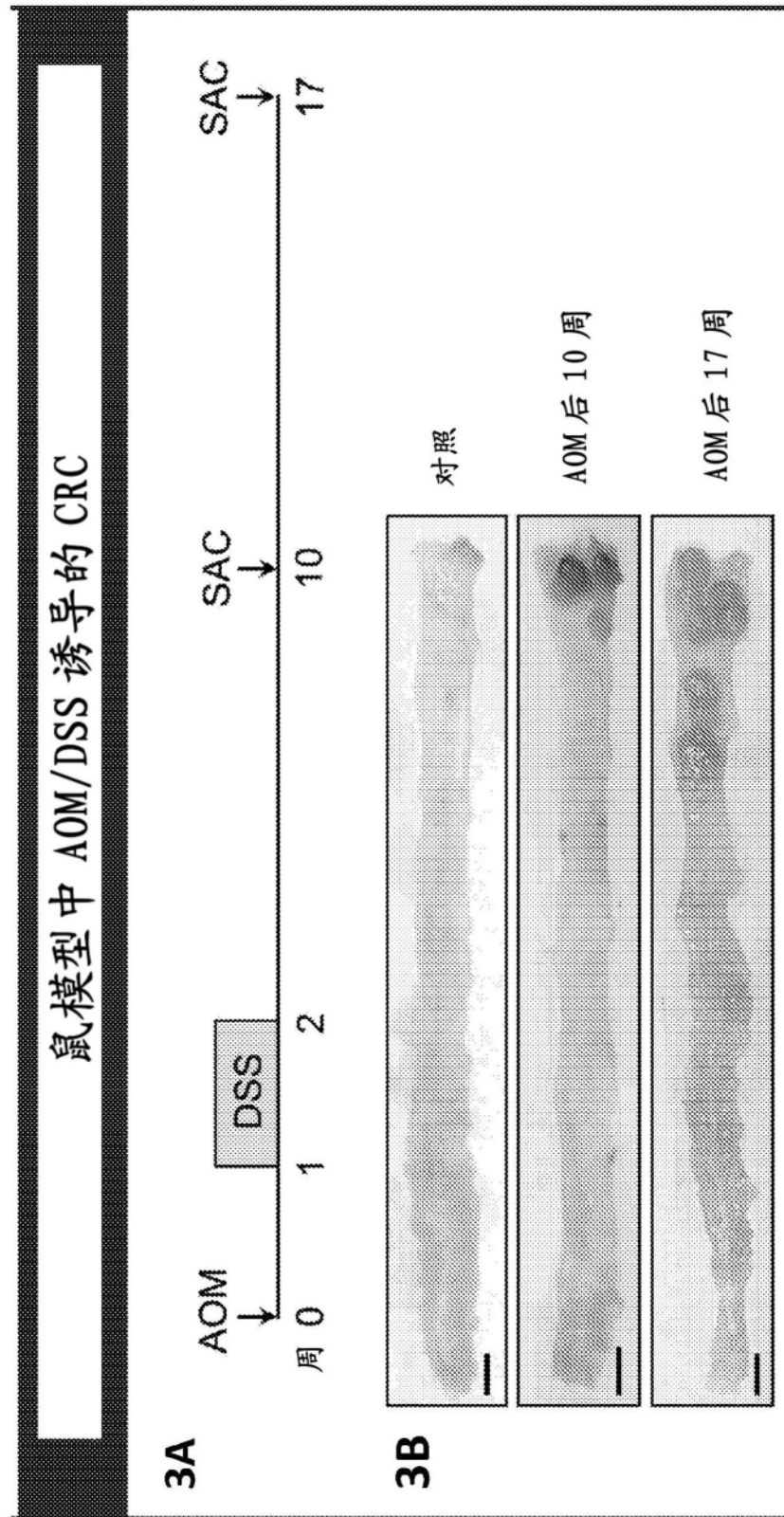


图3A和3B

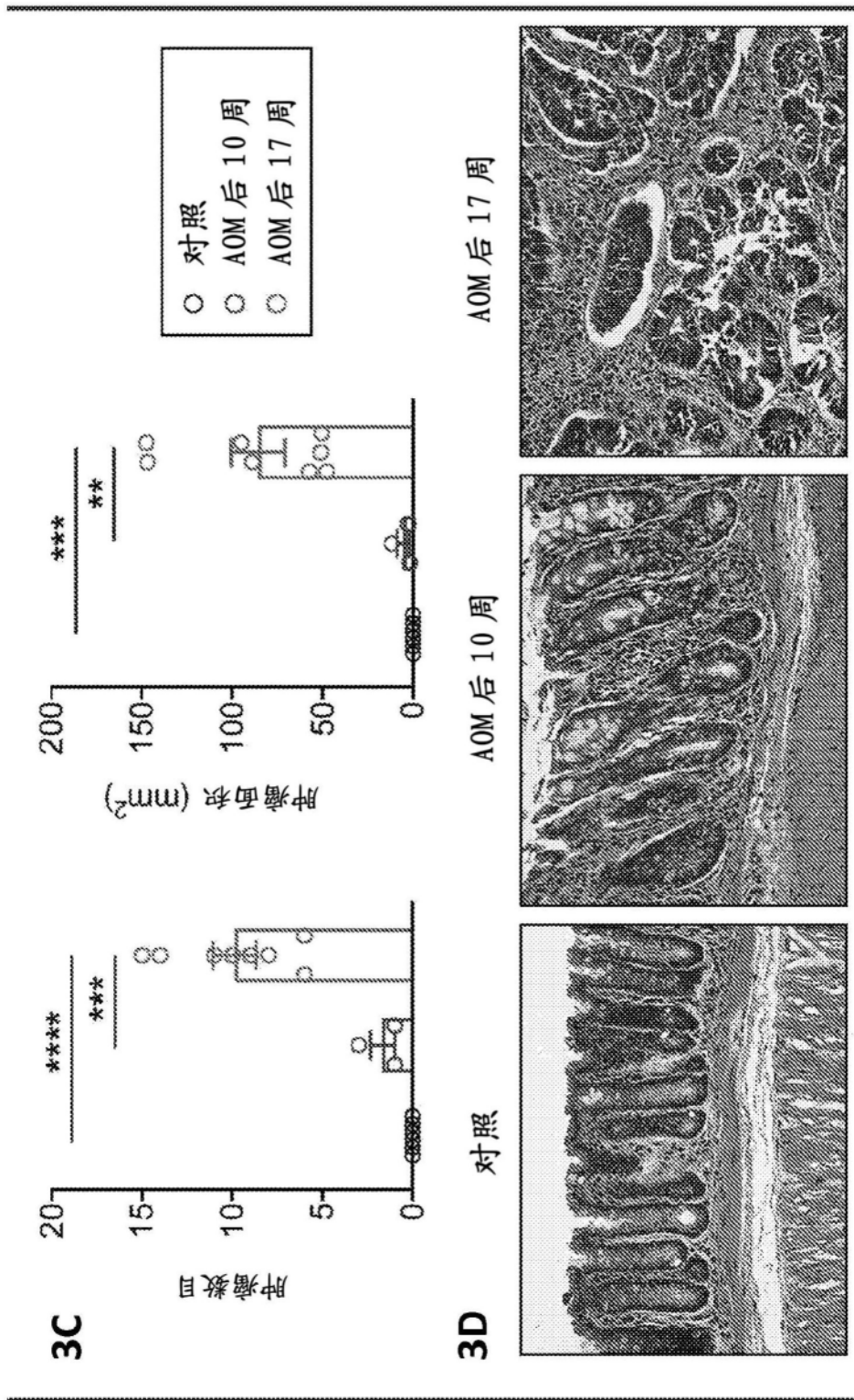


图3C和3D

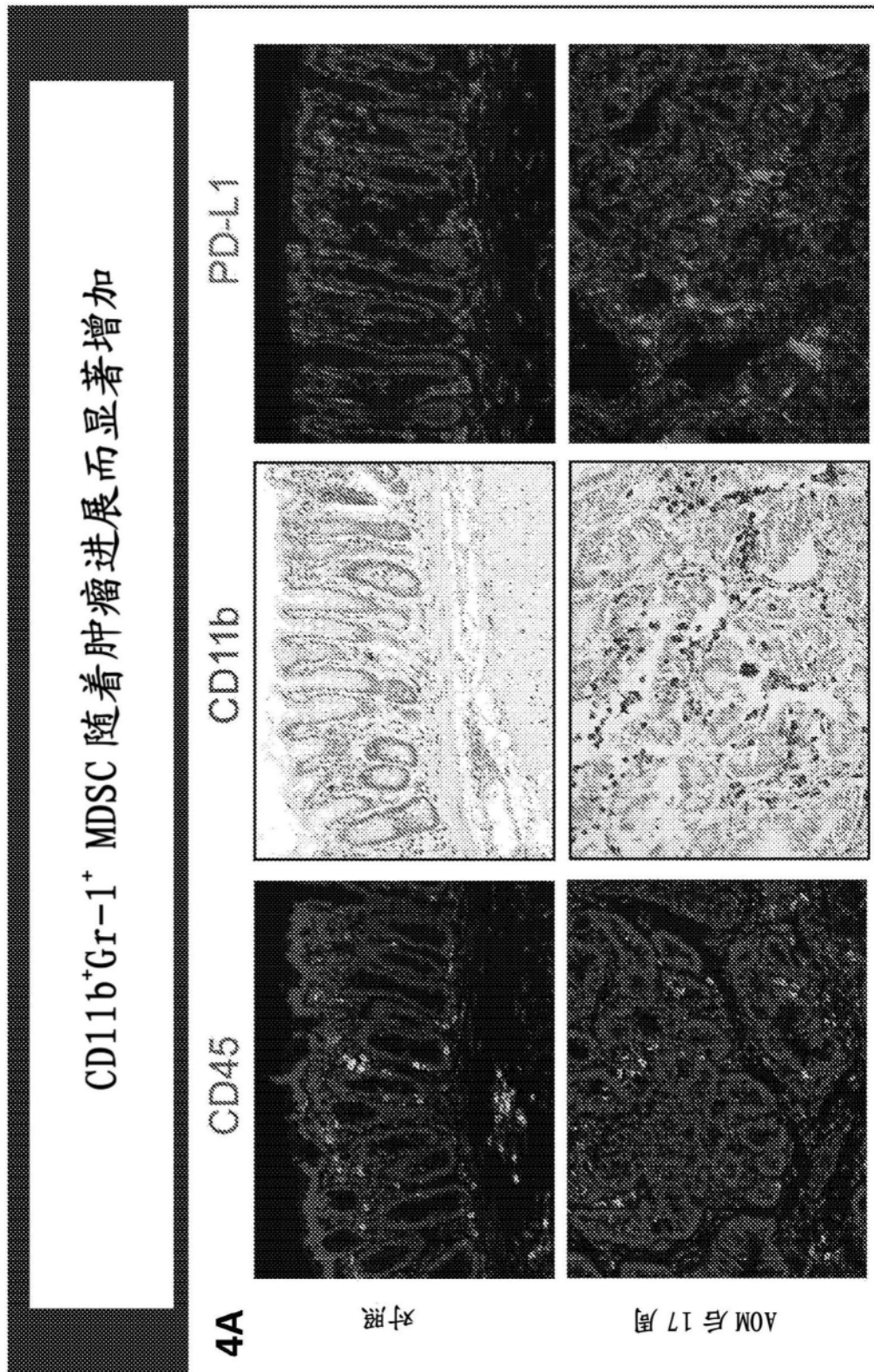


图4A

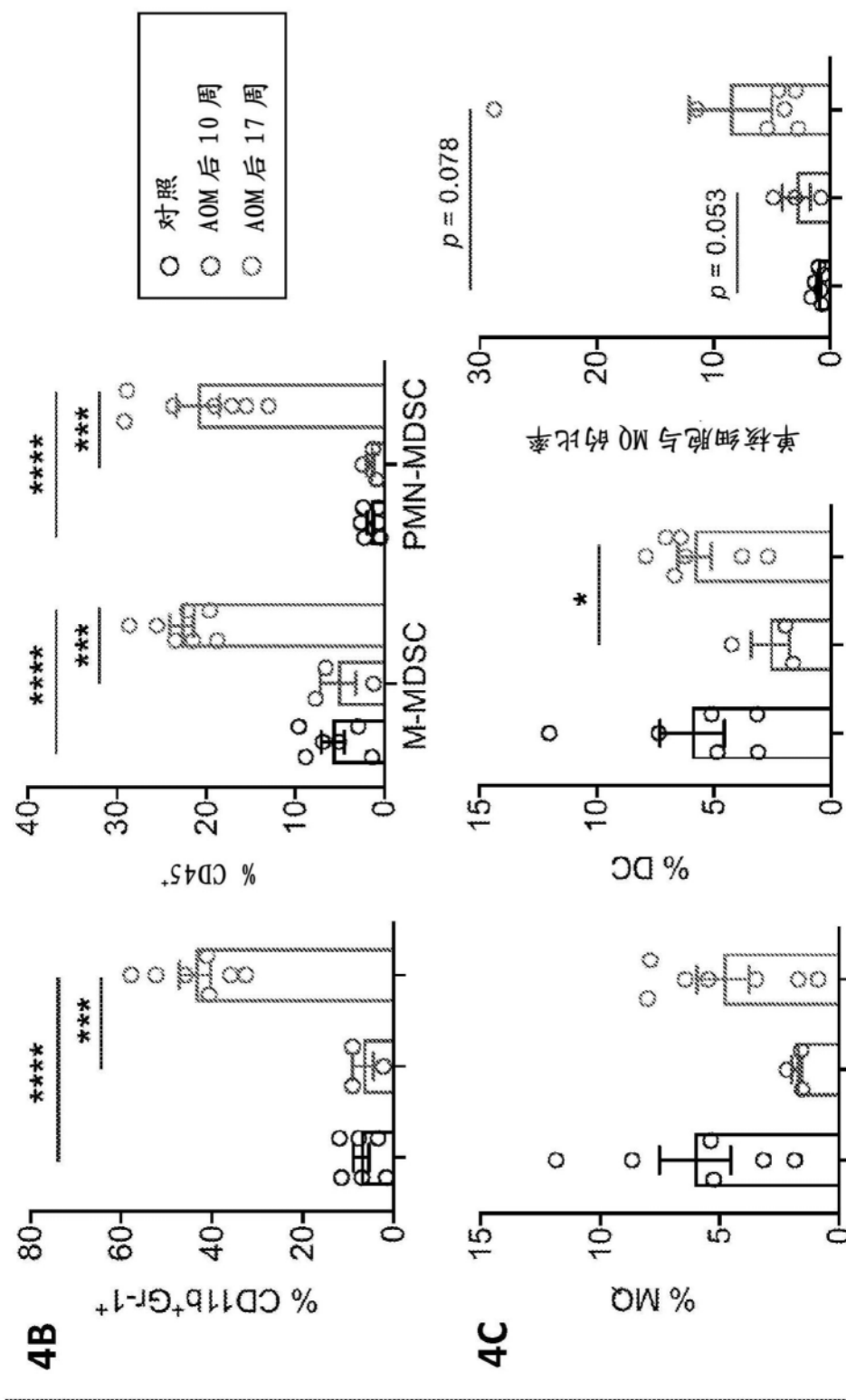


图4B和4C

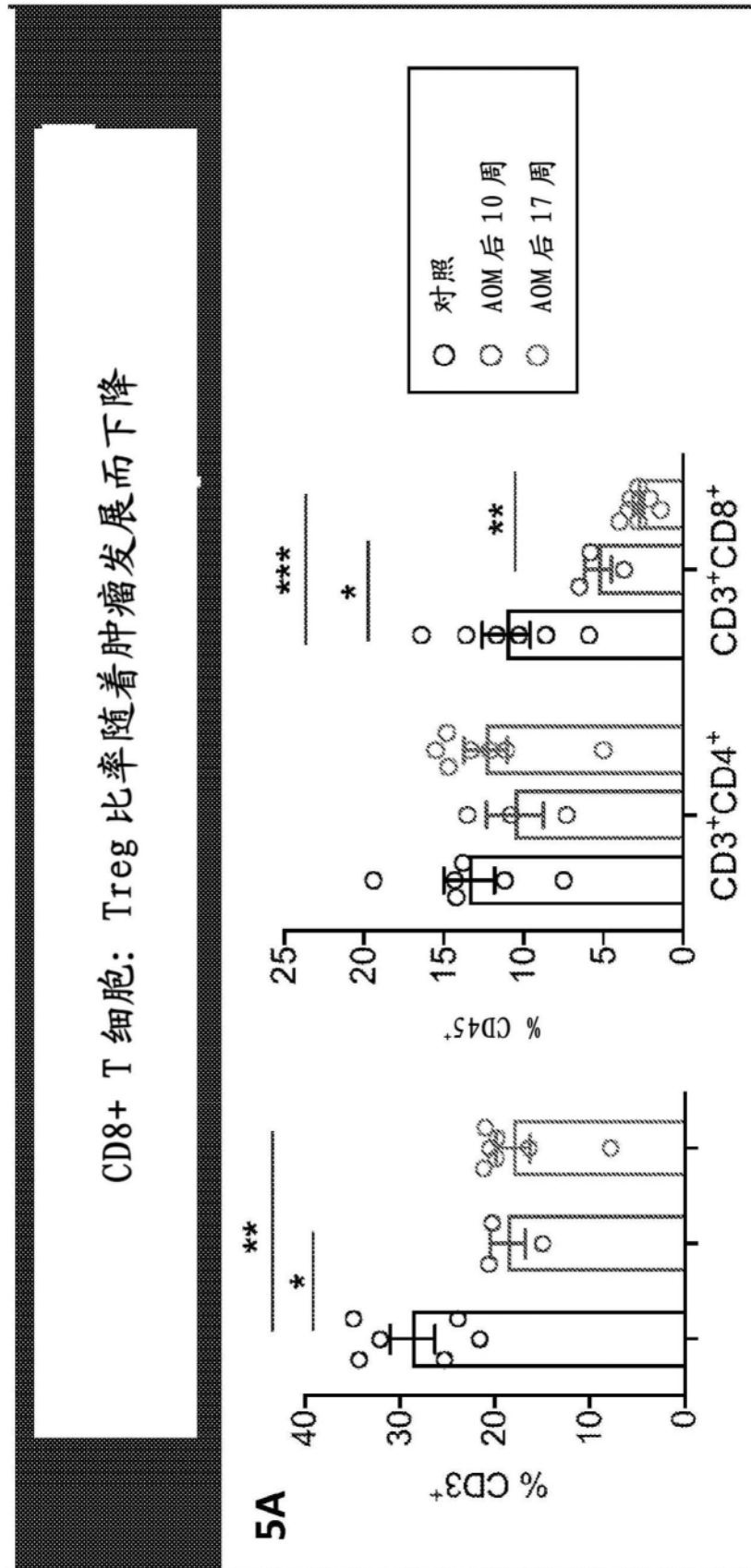


图5A

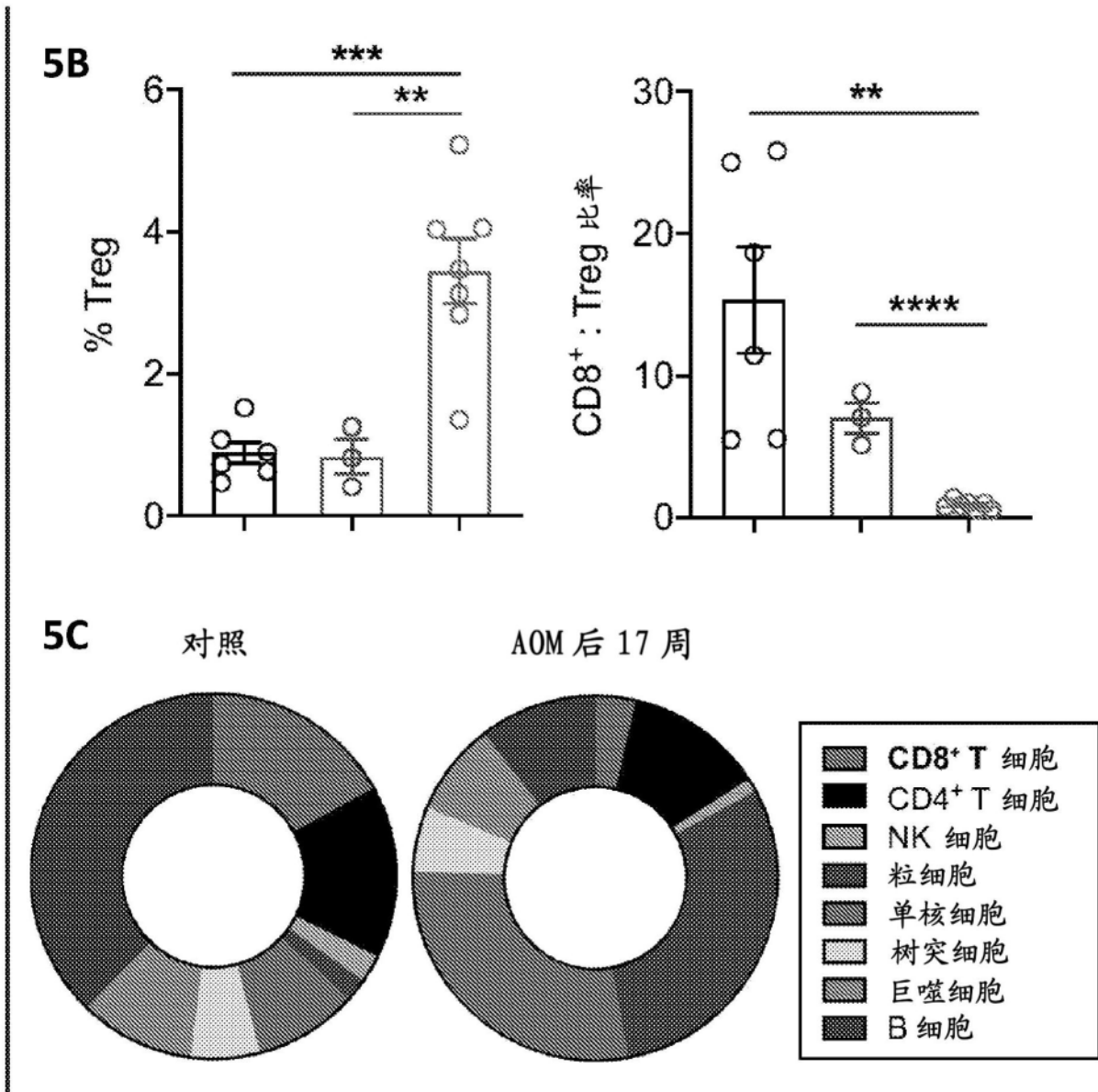


图5B和5C

髓样细胞中的 PD-L1 过表达促进早期结肠肿瘤发生

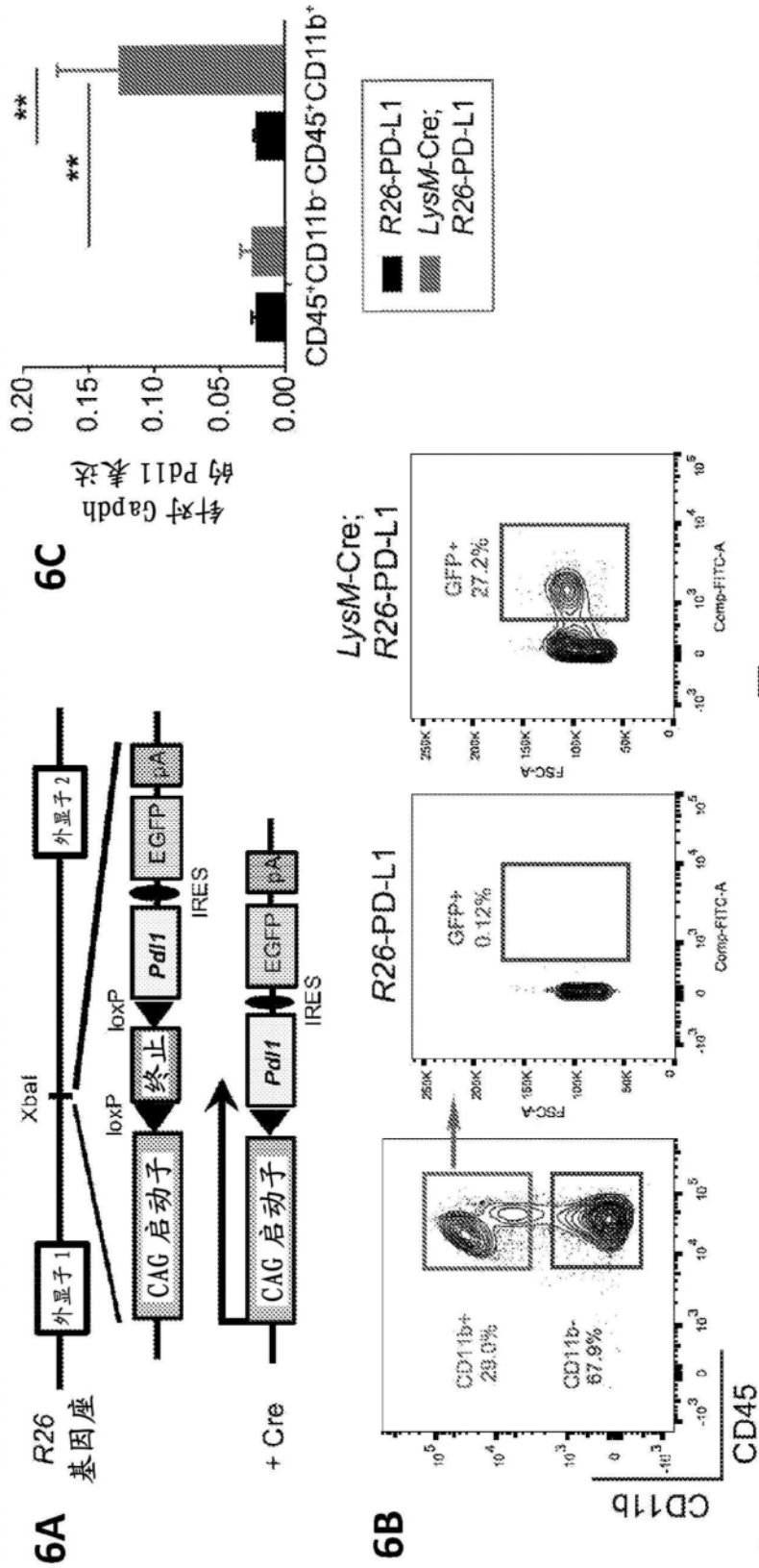


图6A, 6B, 和6C

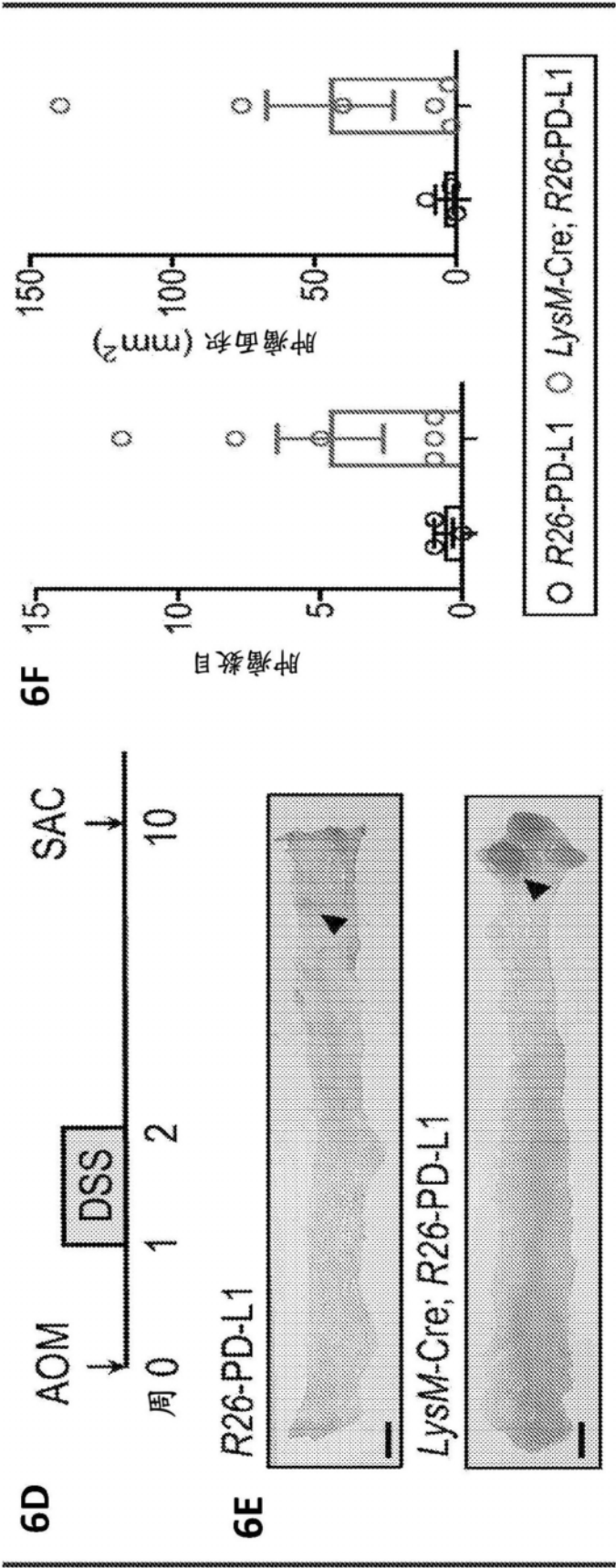


图6D,6E和6F

TFF2 通过抑制 MDSC 的扩增来抑制结肠肿瘤生长

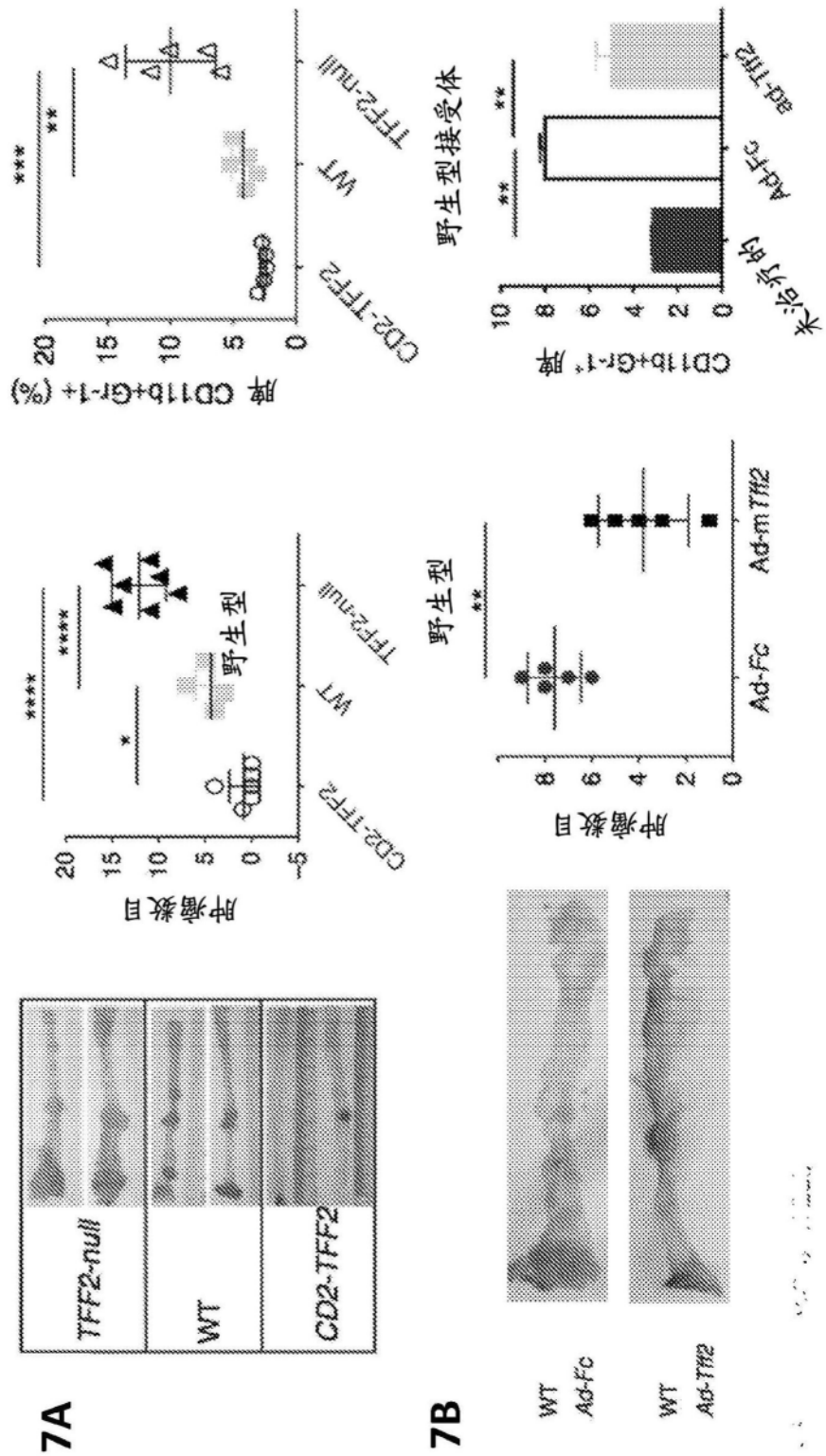


图7A和7B

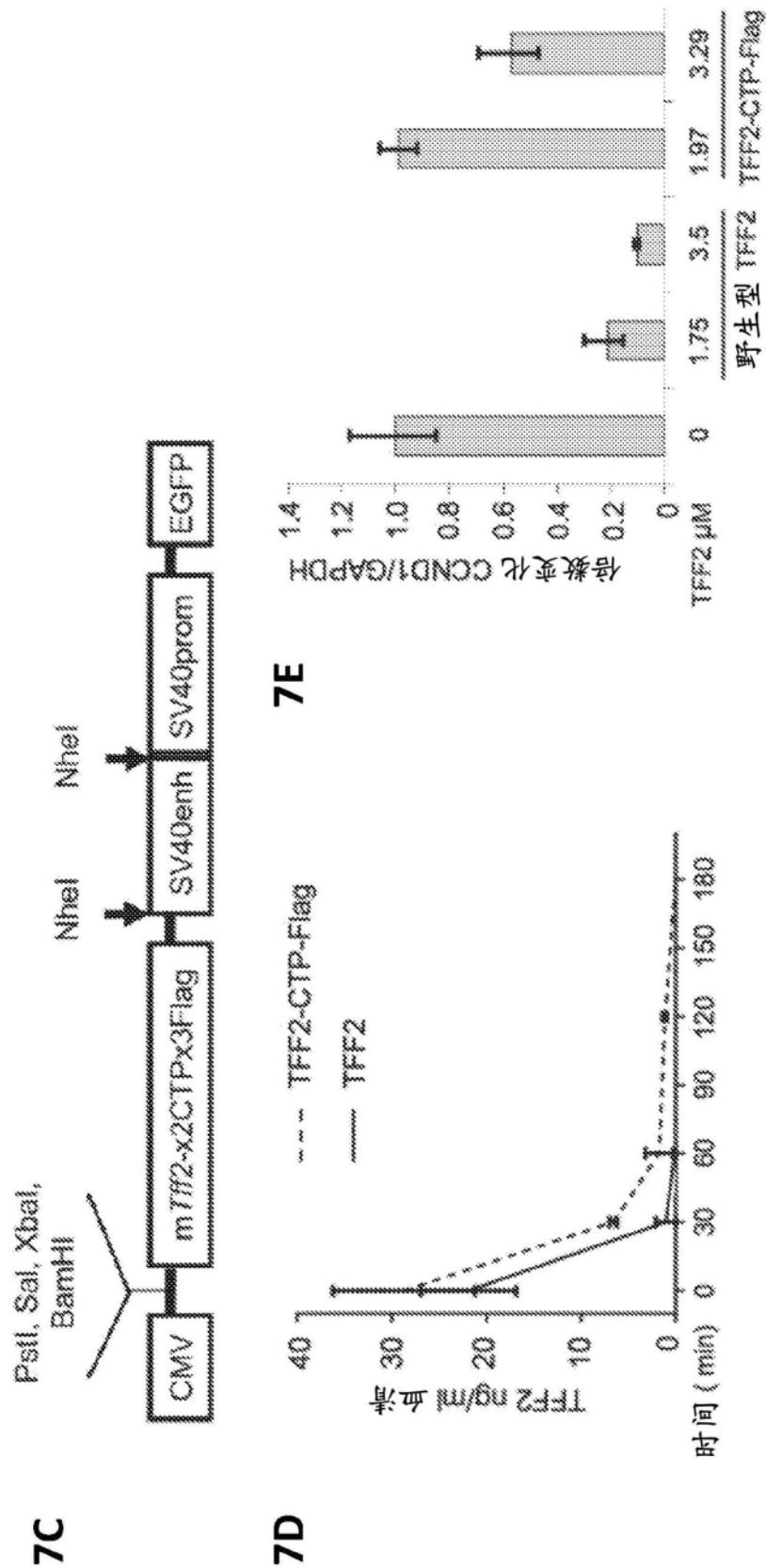


图7C,7D和7E

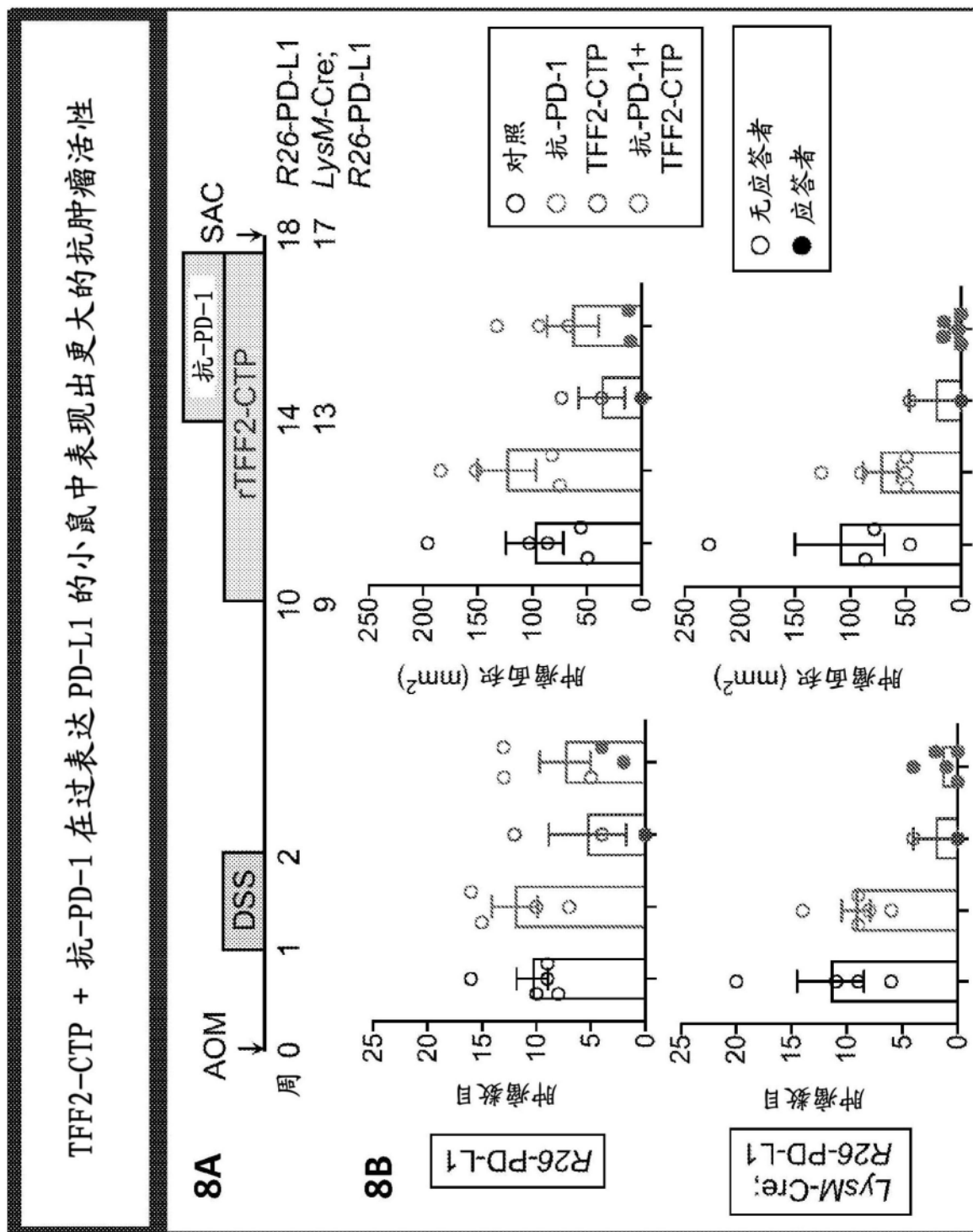


图8A和8B

应答者表现出在肿瘤中增加的 CD8⁺ T 细胞和减少的 MDSC

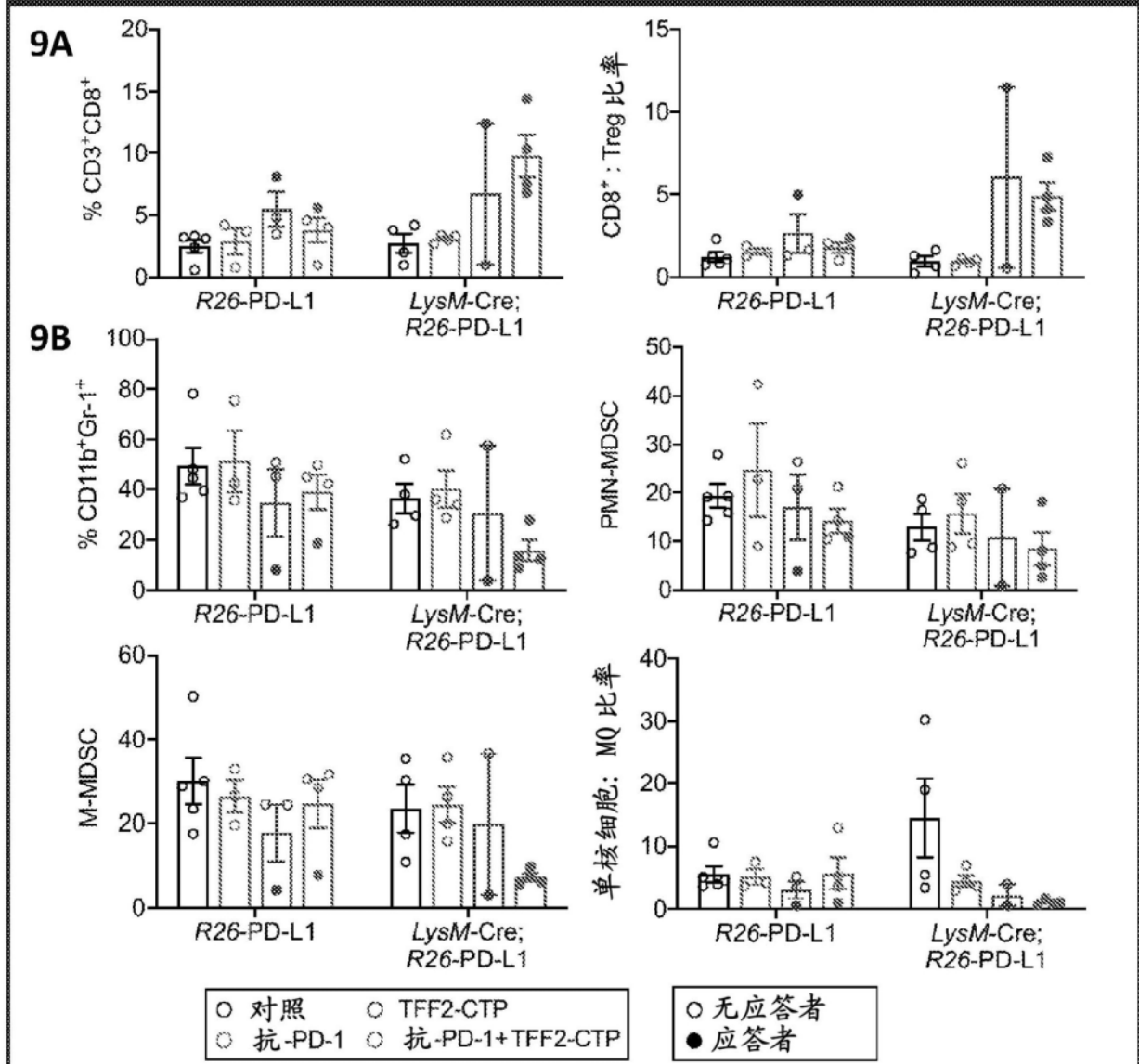


图9A和9B

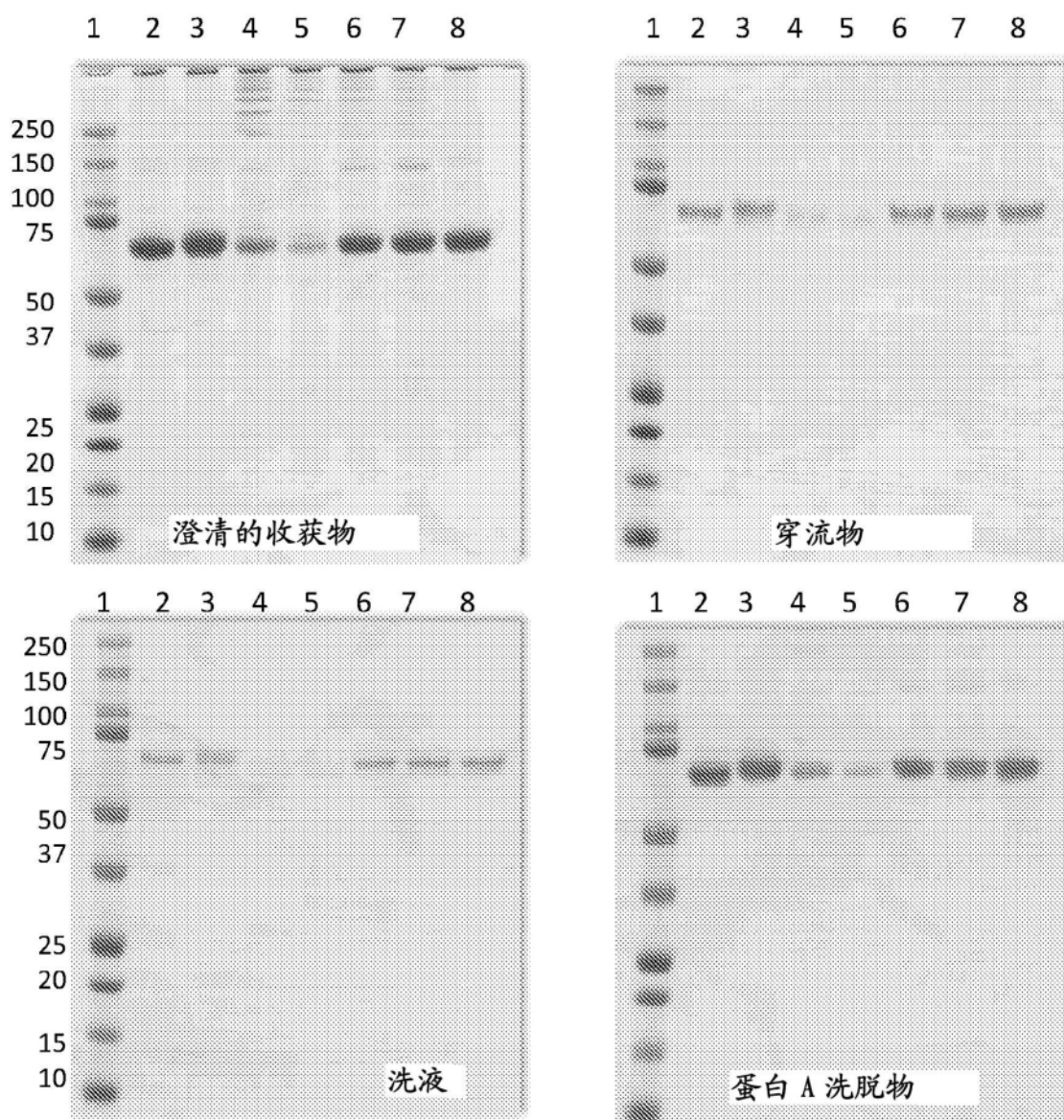


图10

	TFF2-HSA [WT]	TFF2-HSA [D I/I]	TFF2-HSA [D II/I]	TFF2-HSA [D II/II]	TFF2-HSA [LBD I/I]	TFF2-HSA [LBD II/I]	TFF2-HSA [LBD-II/II]
收获物体积 (mL)	89.3	91.6	92.2	91.6	89.6	90.7	91.4
浓度 (mg/mL)	0.49	0.5	0.2	0.06	0.41	0.42	0.49
体积 (mL)	39.0	39.1	39.0	39.0	39.2	39.2	39.3
总计 (mg)	19.1	19.5	7.79	2.34	16.1	16.5	19.3

图11