



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118632866 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 10

(21) 申请号 202380019293.5

苏珊娜·柯林特

(22) 申请日 2023.02.08

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

专利代理师 王玉桂 张奎燕

22155646.7 2022.02.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.07.29

C07K 14/52 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 38/00 (2006.01)

PCT/EP2023/053030 2023.02.08

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 37/00 (2006.01)

W02023/152144 EN 2023.08.17

C07K 14/31 (2006.01)

(71) 申请人 阿菲博迪公司

地址 瑞典索尔纳

(72) 发明人 安娜·爱德沃森

林德维·古德蒙斯多特

西亚瓦什·基贾尼

权利要求书2页 说明书55页

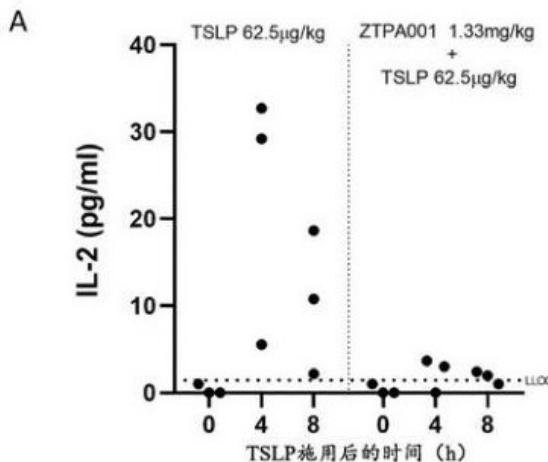
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

结合胸腺基质淋巴细胞生成素的蛋白质Z变体及其医疗用途

(57) 摘要

本披露涉及一类对胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)具有结合亲和力的经工程化的多肽,并且提供了包含序列EAVX₄ALX₇EIW_{X₁₁}LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LRD或与其具有至少93%同一性的序列的TSLP结合多肽。本披露还涉及这种TSLP结合多肽作为治疗剂、预后剂和/或诊断剂的用途。



1. 一种TSLP结合多肽,其包含TSLP结合基序BM,该基序由选自以下的氨基酸序列组成:

i) EAVX₄ALX₇EIW X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LRD

(SEQ ID NO:1081)

其中,彼此独立地,

X₄选自D、E和H;

X₇选自I、L、M和V;

X₁₁选自A、D、E、K、N、Q、R、S和T;

X₁₆选自N和T;

X₁₇选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

X₂₀选自H、N、Q、T、W和Y;

X₂₁选自D、E、G、H、K、M、N、Q和R;

X₂₅选自A、H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且

X₂₆选自K和S;

以及

ii) 与i)中定义的序列具有至少93%同一性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的TSLP结合多肽,其中在序列i)中,

X₄是E;

X₇是V;

X₁₁选自A和T;

X₁₆是T;

X₁₇是R;

X₁₈选自D和E;

X₂₀是W;

X₂₁是Q;

X₂₅是Y;并且

X₂₆是K。

3. 根据权利要求1所述的TSLP结合多肽,其中该结合基序序列对应于选自由SEQ ID NO:1-875组成的组,例如选自由SEQ ID NO:1-645组成的组的序列中位置8至位置36的序列。

4. 根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽,其中所述结合基序形成三螺旋束蛋白结构域的一部分。

5. 根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽,其包含结合模块(BMod),其氨基酸序列选自:

iii) K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ(SEQ ID NO:1082);

其中

[BM]是如权利要求1-3中任一项所定义的TSLP结合基序;

X_a选自A和S;

X_b选自E和N;

X_c选自A、S和C;

X_d选自E、N和S;

X_e选自D、E和S;

X_f选自A和S;以及

iv) 与iii)中定义的序列具有至少91%同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求5所述的TSLP结合多肽,其中序列iii)对应于选自由SEQ ID NO:1-875组成的组的序列中位置7至位置55的氨基酸序列。

7. 根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:

xi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK (SEQ ID NO:1093);

其中[BM]是如权利要求1-3中任一项所定义的;以及

xii) 与xi)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求7所述的TSLP结合多肽,其中序列xi)是SEQ ID NO:645和876-972。

9. 根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽,该多肽能够与TSLP结合,使得与TSLP的相互作用的K_D值为至多1×10⁻⁶M。

10. 一种融合蛋白或缀合物,其包含

-由根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽组成的第一部分;以及

-由具有所期望生物活性的多肽组成的第二部分。

11. 一种多核苷酸,该多核苷酸编码根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽或融合蛋白。

12. 一种组合物,该组合物包含根据权利要求1-10中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物,以及至少一种药学上可接受的赋形剂或载剂。

13. 根据权利要求1-10中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据权利要求12所述的组合物,其用作药物、诊断剂或预后剂。

14. 根据权利要求13所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其用于TSLP相关障碍或疾病,比如炎症性疾病、自身免疫性疾病或癌症疾病的治疗、预后或诊断。

15. 根据权利要求14所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其中所述障碍或疾病选自由以下组成的组:哮喘、特应性皮炎、特应性角结膜炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性食管炎、慢性阻塞性肺疾病、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)/查尔格-施特劳斯综合征、乳腺癌、结节性痒疹和大疱性类天疱疮。

结合胸腺基质淋巴细胞生成素的蛋白质Z变体及其医疗用途

技术领域

[0001] 本披露涉及对蛋白质人胸腺基质淋巴细胞生成素(以下被称为TSLP)具有结合亲和力的一类经工程化的多肽。本披露还涉及这种TSLP结合多肽作为治疗剂、预后剂和/或诊断剂的用途。

背景技术

[0002] 胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)是一种上皮细胞和肥大细胞衍生的细胞因子,与几种炎症性疾病(包括气道炎症的发生和持续)的发病机制有关。TSLP是许多下游炎症途径的关键调节剂。TSLP是一种与IL-7密切相关的四螺旋束细胞因子,该IL-7是细胞因子的血细胞生成素家族的成员。TSLP最初是从小鼠胸腺基质细胞系中分离出来的,并且被发现是B细胞的生长因子。TSLP与其受体(TSLP-R)结合以发挥其生物活性。TSLP-R是由IL-7受体 α 链(IL-7R α)和TSLP受体 α 链1(TSLP-R α ,也称为CRL2、TSLP-R和CRLF2Y)组成的异二聚体受体,它与IL-2、IL-4、IL-9和IL-15受体复合物中发现的常见受体- γ 链(γ c)密切相关。功能性TSLP-R主要在造血细胞、树突状细胞(DC)、T细胞、B细胞、天然杀伤(NK)细胞、不变性天然杀伤T细胞(iNKT)、单核细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、肝、脑、骨骼肌、肾、脾和胸腺中表达(Markovic和Savvides,2020,Front Immunol[免疫性前沿]11:1557)。

[0003] TSLP在人中以两种同种型存在。TSLP的短形式缺少信号肽和前两个 α 螺旋。它在所有上皮细胞层和皮肤表皮中组成性表达,介导内稳态功能。TSLP的短形式尚未被证明具有任何促炎性活性,但与抗微生物肽有关(Tsilingiri等人,2017,Cell Mol Gastroenterol Hepatol[细胞与分子胃肠病学与肝病学]3(2):174-182)。长的同种型在稳定状态下以低/不可检测的水平表达,并在几种组织的炎症期间上调(以下长的同种型将被称为“TSLP”,而短的同种型将被称为“TSLP的短形式”或“sfTSLP”)。此外,翻译后修饰(比如糖基化和弗林蛋白酶切割)可能会改变TSLP的功能性活性。因此,对于靶向TSLP的药物,阻断成熟和切割的活性TSLP代谢物可能很重要(Varricchi等人,2018,Front Immunol[免疫学前沿]9:1595)。

[0004] TSLP应答于促炎性刺激物(例如损害,比如病毒感染、机械应激、过敏原和污染物)而产生,引发炎症性级联反应。TSLP已被证明主要通过其对先天淋巴细胞(主要是ILC2),树突状细胞和肥大细胞的活性来促进炎症性应答。通过产生促过敏细胞因子、趋化因子和共刺激分子,驱动天然T细胞成为产生IL-4、IL-5和IL-13的Th2细胞,TSLP在诱导和维持过敏性炎症Th2、ILC2和肥大细胞应答中起关键作用。这些都是过敏性炎症的关键介质(Gauvreau等人,2020,Expert Opin Ther Targets[专家观点治疗靶标]24(8):777-792)。

[0005] 已经报道,人TSLP表达在哮喘气道中增加,并与疾病严重程度相关。慢性过敏性哮喘通常以Th2型炎症为特征,而非过敏性哮喘性炎症主要是中性粒细胞,伴有混合型Th1和Th17细胞因子应答。由于TSLP位于信号传导级联的顶部,TSLP的抑制有助于过敏性和非过敏性哮喘的治疗。除了其在哮喘发展中的基本作用外,已知TSLP还参与其他过敏性病症的发病机制(Gauvreau等人,同上)。在特应性皮炎患者的皮肤损伤中发现TSLP蛋白水平升高。

在胃肠道的过敏性疾病(包括克罗恩病、嗜酸性食管炎和溃疡性结肠炎)以及在癌症中观察到TSLP的异常表达。与健康个体相比,也已经在慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者中观察到更高的TSLP表达(Cianferoni和Spiegel,2014,Expert Rev Clin Immunol[临床免疫性专家评论]10(11):1463-74)。

[0006] 已发表的数据提供了临床证据,即与施用安慰剂相比,用泰匹鲁单抗(tezepelumab)(一种抗TSLP单克隆抗体)对TSLP的抑制导致哮喘恶化的年化率更低(Corren和Ziegler,2019,Nat Immunol[自然免疫学]20(12):1603-1609)。结果独立于基线嗜酸性粒细胞计数或其他Th2生物标志物。在用长效 β 受体激动剂和中至高剂量的吸入型糖皮质激素治疗的患者中,相比接受安慰剂治疗的患者,接受泰匹鲁单抗治疗的患者具有更低的临床显著哮喘恶化率。

[0007] 这些发现突出了靶向上游细胞因子(比如TSLP)的潜在优势,该细胞因子可能比抑制单个下游途径更广泛地影响疾病活性。此外,在III期设置中,在严重、不受控制的哮喘患者的广泛人群中,无论基线血液嗜酸性粒细胞计数如何,泰匹鲁单抗减少恶化,并改善肺功能、哮喘控制和健康相关生活质量(Menzies-Gow等人,2021,N Engl J Med[新英格兰医学杂志]384(19):1800-1809)。泰匹鲁单抗最近被批准用于治疗严重哮喘,并在品牌名Tezpire[®]下销售。目前正在用于治疗COPD、鼻窦炎、嗜酸性食管炎和慢性荨麻疹的临床试验中进行研究。

[0008] 近年来,过敏性疾病(比如哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎和食物过敏)的患病率似乎在增加,特别是在发达国家,影响了越来越多的人口比例(Rutowski等人,2014,Postepy Dermatol Alergol[变态反应进展]31(2):77-83)。

[0009] 对于许多炎症性疾病,诊断和监测治疗的手段是对一般生物标志物的临床评估和分析。传统上依赖临床评估用于诊断炎症性疾病和监测治疗的方法可能与次优的患者预后相关联。需要可靠的方法用于诊断炎症性疾病、评估疾病状态和监测对治疗的应答。此外,炎症性疾病新疗法的合理设计 and 应用需要对生物过程或对治疗干预的药理学应答的信息指标进行探究、验证和实施。这可以通过开发适当的伴随诊断工具来促进,这些工具可以实现个性化医疗方法,其中基于患者的预测应答或疾病风险,为个体患者量身定制医疗决策、实践、干预和/或产品。研究示出,支气管肺泡灌洗液(BALF)中TSLP的上调与哮喘的疾病严重程度密切相关。已经示出BALF中TSLP的水平与肺功能呈负相关,这表明它可以作为有用的诊断标志物(Li等人,2018,J Immunol[免疫学杂志]200(7):2253-2262)。

[0010] 由于组织穿透率与分子的大小呈负相关,因此相对较大的抗体分子固有地具有较差的组织分布和穿透能力,并且可能不适合局部肺递送,例如治疗呼吸系统疾病(如哮喘和COPD)。此外,尽管由于抗体对大量可能的抗原具有高亲和力和特异性而广泛用于各种常规情况,比如用于分析、纯化、诊断和治疗目的,但它们仍然具有一些缺点。此类缺点包括聚合倾向,有限的稳定性和有限的溶解度,这使得抗体不太适合替代性施用途径(比如吸入)。

[0011] 因此,对于治疗单克隆抗体的用途并不总是最佳,并且持续需要提供对TSLP具有高亲和力的药剂。同样非常有趣的是提供了此类分子在疾病的治疗、诊断和预后中的用途。

发明内容

[0012] 本披露的目标是提供新的TSLP结合剂,其可以例如用于治疗、预后和诊断应用。

[0013] 本披露的目的是提供一种分子,其允许例如各种形式的炎症性疾病的有效疗法,同时减轻当前疗法的上述和其他缺点。

[0014] 此外,本披露的目的是提供适合于预后和诊断应用的分子,例如与各种形式的炎症性疾病相关的预后和诊断应用。

[0015] 对于技术人员来说,从本披露内容中显而易见的这些和其他目标,通过如所附权利要求中所要求的以及如本文中一般披露的本发明的不同方面来实现。

[0016] 因此,在本披露的第一方面,提供了TSLP结合多肽,其包含TSLP结合基序BM,该基序由选自以下的氨基酸序列组成:

[0017] i) EAVX₄ALX₇EIW X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀ X₂₁AFIX₂₅X₂₆LRD

[0018] (SEQ ID NO:1081)

[0019] 其中,彼此独立地,

[0020] X₄选自D、E和H;

[0021] X₇选自I、L、M和V;

[0022] X₁₁选自A、D、E、K、N、Q、R、S和T;

[0023] X₁₆选自N和T;

[0024] X₁₇选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0025] X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0026] X₂₀选自H、N、Q、T、W和Y;

[0027] X₂₁选自D、E、G、H、K、M、N、Q和R;

[0028] X₂₅选自A、H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且

[0029] X₂₆选自K和S;

[0030] 以及

[0031] ii) 与i)中定义的序列具有至少93%同一性的氨基酸序列。

[0032] 在一个实施方案中,提供了TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,

[0033] X₄选自D、E和H;

[0034] X₇选自I、L、M和V;

[0035] X₁₁选自A、D、E、K、N、Q、R、S和T;

[0036] X₁₆选自N和T;

[0037] X₁₇选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0038] X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0039] X₂₀选自H、N、Q、T、W和Y;

[0040] X₂₁选自D、E、G、H、K、M、N、Q和R;

[0041] X₂₅选自A、H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且

[0042] X₂₆选自K和S。

[0043] 在另一个实施方案中,提供了TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,

[0044] X₄选自E和H;

[0045] X₇选自I、L和V;

[0046] X₁₁选自A、D、E、Q、R、S和T;

[0047] X₁₆选自N和T;

- [0048] X_{17} 选自A、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、T、V、W和Y；
- [0049] X_{18} 选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y；
- [0050] X_{20} 选自H、N、Q、W和Y；
- [0051] X_{21} 选自D、E、H、K、M、N、Q和R；
- [0052] X_{25} 选自H、I、K、L、Q、R、V和Y；并且
- [0053] X_{26} 选自K和S。
- [0054] 在又一个实施方案中，提供了TSLP结合多肽，其中，在序列i)中，
- [0055] X_4 选自E和H；
- [0056] X_7 选自I、L和V；
- [0057] X_{11} 选自A、D、E、Q、S和T；
- [0058] X_{16} 是T；
- [0059] X_{17} 选自D、E、G、H、N、Q、R、S、W和Y；
- [0060] X_{18} 选自A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T、W和Y；
- [0061] X_{20} 选自H、W和Y；
- [0062] X_{21} 选自D、E、H、N和Q；
- [0063] X_{25} 选自I、L、R、V和Y；并且
- [0064] X_{26} 是K。
- [0065] 在又一个实施方案中，提供了TSLP结合多肽，其中，在序列i)中，
- [0066] X_4 是E；
- [0067] X_7 选自I和V；
- [0068] X_{11} 选自A、D、E、Q、S和T；
- [0069] X_{16} 是T；
- [0070] X_{17} 选自D、E、G、H、N、Q、R和Y；
- [0071] X_{18} 选自A、D、E、F、G、I、L、N、Q、R、S、T和Y；
- [0072] X_{20} 选自H、W和Y；
- [0073] X_{21} 选自D、E、H、N和Q；
- [0074] X_{25} 选自I、L、V和Y；并且
- [0075] X_{26} 是K。
- [0076] 在又一个实施方案中，提供了根据任一前述权利要求所述的TSLP结合多肽，其中，在序列i)中，
- [0077] X_4 是E；
- [0078] X_7 是V；
- [0079] X_{11} 选自A和T；
- [0080] X_{16} 是T；
- [0081] X_{17} 是R；
- [0082] X_{18} 选自D和E；
- [0083] X_{20} 是W；
- [0084] X_{21} 是Q；
- [0085] X_{25} 是Y；并且

[0086] X_{26} 是K。

[0087] 如本文所用,“ X_n ”和“ X_m ”用于指示如上定义的序列i)中位置n和m的氨基酸,其中n和m是整数,指示如从所述序列的N-末端开始计算的所述序列中氨基酸的位置。例如, X_4 和 X_7 分别指示从序列i)的N-末端开始,位置四和位置七的氨基酸。

[0088] 在根据第一方面的实施方案中,提供了多肽,其中序列i)中的 X_n 独立地选自根据表1的一组可能的残基。技术人员将理解, X_n 可以选自列出的可能的残基组中的任何一组,并且该选择独立于 X_m (其中 $n \neq m$)中氨基酸的选择。因此,可以将表1位置 X_n 中任何列出的可能的残基与表1任何其他可变位置中任何列出的可能的残基独立地组合。

[0089] 技术人员将理解,表1应如下阅读:在根据第一方面的一个实施方案中,提供了多肽,其中序列i)中的氨基酸残基“ X_n ”选自“可能的残基”。因此,表1披露了本披露的第一方面的几个特定且个性化的实施方案。例如,在根据第一方面的一个实施方案中,提供了多肽,其中序列i)中的 X_4 选自D、E和H,并且在根据第一方面的另一个实施方案中,提供了多肽,其中序列i)中的 X_4 选自D和E。为免生疑问,所列实施方案可以在又其他实施方案中自由组合。例如,一个这样的组合实施方案是多肽,其中 X_4 选自E和H,而 X_7 选自I、L和V,并且 X_{25} 选自H、I、K、L、Q、R、V和Y等。

[0090] 表1

[0091]

X_n	可能的残基
X_4	D、E和H
X_4	D和E
X_4	D和H
X_4	E和H
X_4	D
X_4	E
X_4	H
X_7	I、L、M和V
X_7	I、M和V
X_7	I、L和V
X_7	I和L
X_7	I和M
X_7	I和V
X_7	L、M和V
X_7	L和M
X_7	L和V
X_7	M和V
X_7	I

X_n	可能的残基
X_7	L
X_7	M
X_7	V
X_{11}	A、D、E、K、N、Q、R、S和T
X_{11}	A、D、E、K、Q、R、S和T
X_{11}	A、D、E、K、N、Q、S和T
X_{11}	A、D、E、N、Q、R、S和T
X_{11}	A、D、E、Q、R、S和T
X_{11}	A、D、E、Q、K、S和T
X_{11}	A、D、E、N、Q、S和T
X_{11}	A、D、E、Q、S和T
X_{11}	A、D、E、Q和T
X_{11}	A、D、E和T
X_{11}	A、E、Q和T
X_{11}	A和T

[0092]

X _n	可能的残基
X ₁₁	E 和 T
X ₁₁	D、E、K、N、Q、R、S 和 T
X ₁₁	D、E、Q 和 T
X ₁₁	E、K、N、Q、R、S 和 T
X ₁₁	E、Q 和 T
X ₁₁	Q 和 T
X ₁₁	A
X ₁₁	D
X ₁₁	E
X ₁₁	K
X ₁₁	N
X ₁₁	Q
X ₁₁	R
X ₁₁	T
X ₁₆	N 和 T
X ₁₆	N
X ₁₆	T
X ₁₇	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、F、G、H、K、L、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、F、G、H、I、K、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、F、G、H、K、

X _n	可能的残基
	N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、G、H、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₇	A、D、E、G、H、N、Q、R、S、T、V 和 W
X ₁₇	A、D、E、G、H、N、Q、R、S、T 和 V
X ₁₇	D、E、G、H、N、Q、R、S、W 和 Y
X ₁₇	D、E、G、H、N、Q、R、S 和 T
X ₁₇	D、E、G、H、N、Q、R 和 Y
X ₁₇	D、E、G、H、N、Q 和 R
X ₁₇	D、E、G、H、N 和 R
X ₁₇	D、E、G、H 和 R
X ₁₇	D、E、H 和 R
X ₁₇	D、H、N、Q 和 R
X ₁₇	D、H 和 Q
X ₁₇	D、H 和 R
X ₁₇	D 和 H
X ₁₇	D 和 R
X ₁₇	H 和 R
X ₁₇	R
X ₁₈	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y
X ₁₈	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y

[0093]

X_n	可能的残基
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、W 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V 和 W
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、W 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T 和 W
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S 和 T
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S 和 T
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T 和 V
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T、W 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T 和 W
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S 和 T
X_{18}	A、D、E、F、G、I、L、N、Q、R、S 和 T

X_n	可能的残基
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R 和 S
X_{18}	A、D、E、F、H、I、L、N、Q、R、S 和 T
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q 和 R
X_{18}	A、D、E、G、H、I、L、N、Q 和 R
X_{18}	A、D、E、F、G、I、L、N、Q、R、S、T 和 Y
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、N、Q、R、S、T 和 V
X_{18}	A、D、F、G、I、N、Q、R 和 V
X_{18}	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R 和 T
X_{18}	A、D、E、H、I、K、L、N 和 Q
X_{18}	A、D、E、I、K、L、N 和 Q
X_{18}	A、D、E、I、L 和 Q
X_{18}	A、D、I、K、L、N 和 Q
X_{18}	A、D、K、L、N 和 Q
X_{18}	D、E 和 I
X_{18}	D 和 E
X_{20}	H、N、Q、T、W 和 Y
X_{20}	H、N、Q、W 和 Y
X_{20}	H、N、W 和 Y
X_{20}	H、N 和 Y
X_{20}	H、W 和 Y
X_{20}	N、W 和 Y
X_{20}	N、W 和 Y

[0094]

X _n	可能的残基
X ₂₀	W 和 Y
X ₂₀	H 和 Y
X ₂₀	H 和 N
X ₂₀	H 和 W
X ₂₀	H
X ₂₀	N
X ₂₀	Q
X ₂₀	T
X ₂₀	W
X ₂₀	Y
X ₂₁	D、E、G、H、K、M、N、 Q 和 R
X ₂₁	D、E、G、H、K、M、N 和 Q
X ₂₁	D、E、H、K、M、N、Q 和 R
X ₂₁	D、E、G、H、M、N、Q 和 R
X ₂₁	D、E、G、H、K、N、Q 和 R
X ₂₁	D、E、G、H、M、N 和 Q
X ₂₁	D、E、G、H、K、N 和 Q
X ₂₁	D、E、H、K、M、N 和 Q
X ₂₁	D、E、H、K、N、Q 和 R
X ₂₁	D、E、H、M、N 和 Q
X ₂₁	D、E、H、M 和 N
X ₂₁	D、E、H、N 和 Q

X _n	可能的残基
X ₂₁	D、E 和 Q
X ₂₁	E 和 Q
X ₂₁	D
X ₂₁	E
X ₂₁	H
X ₂₁	M
X ₂₁	N
X ₂₁	Q
X ₂₅	A、H、I、K、L、Q、R、V 和 Y
X ₂₅	H、I、K、L、Q、R、V 和 Y
X ₂₅	I、K、L、Q、R、V 和 Y
X ₂₅	H、I、L、Q、R、V 和 Y
X ₂₅	I、L、Q、R、V 和 Y
X ₂₅	I、L、Q、V 和 Y
X ₂₅	I、L、R、V 和 Y
X ₂₅	I、K、L、V 和 Y
X ₂₅	I、L、V 和 Y
X ₂₅	I、L 和 Y
X ₂₅	I、L 和 Y
X ₂₅	L 和 Y
X ₂₅	Y
X ₂₆	K 和 S
X ₂₆	K
X ₂₆	S

[0095] 在定义TSLP结合多肽的亚类的更特定实施方案中,序列i)满足八个条件I-VIII中的至少四个:

[0096] I. X₄是E或H;

[0097] II. X₇选自I、L和V;

[0098] III. X₁₁选自A、D、E、Q、S和T;

[0099] IV. X₁₆是T;

[0100] V. X₂₀选自H、W和Y;

[0101] VI. X₂₁选自D、E、H、N和Q;

[0102] VII. X₂₅选自I、L、R、V和Y;以及

[0103] VIII. X₂₆是K。

[0104] 在TSLP结合多肽的一些实例中,根据第一方面,序列i)满足八个条件I-VIII中的

至少五个。更特定地,序列i)可以满足八个条件I-VIII中的至少六个,比如八个条件I-VIII中的至少七个,比如八个条件I-VIII中的全部。

[0105] 在TSLP结合多肽的一些实施方案中,根据第一方面, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{20} 是W。在一些实施方案中, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{20} 是Y。在一些实施方案中, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{21} 是Q。在一些实施方案中, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{21} 是E。在一些实施方案中, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{25} 是Y。在一些实施方案中, X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{25} 是L。

[0106] 如下面的实验部分中所详细描述,对TSLP结合多肽变体的选择导致鉴定出许多属于本披露第一方面中定义类别的单个TSLP结合基序(BM)序列。根据该方面,这些序列构成序列i)或ii)的单个实施方案。单个TSLP结合基序的序列对应于序列列表中呈现的SEQ ID NO:1-875中的氨基酸位置8-36。在TSLP结合多肽的一个实施方案中,根据该第一方面,序列i)对应于选自SEQ ID NO:1-645组成的组的序列中位置8至位置36的序列。在一个实施方案中,序列i)对应于选自SEQ ID NO:1-630和645组成的组的序列中位置8至位置36的序列。在一个实施方案中,序列i)对应于选自SEQ ID NO:1-91和645组成的组的序列中位置8至位置36的序列。在一个实施方案中,序列i)对应于选自SEQ ID NO:1-27组成的组的序列中位置8至位置36的序列。在一个实施方案中,序列i)对应于选自SEQ ID NO:1-2组成的组的序列中位置8至位置36的序列。

[0107] 如技术人员将认识到的,任何多肽的功能,比如本披露多肽的TSLP结合能力,依赖于多肽的三级结构。因此,对多肽中的氨基酸序列进行微小的改变而不影响其功能是可能的。因此,本披露包括TSLP结合多肽的经修饰变体,其保留了TSLP结合特征。

[0108] 这样,本披露涵盖TSLP结合多肽,其包含与如i)中定义的多肽具有93%或更高同一性,比如96%或更高同一性的氨基酸序列。例如,可能的是,属于氨基酸残基的某个功能组(例如疏水、亲水、极性等)的氨基酸残基可以与来自同一功能组的另一个氨基酸残基交换。

[0109] 在一些实施方案中,可以在如本文披露TSLP结合多肽序列的任何位置进行此类改变。在其他实施方案中,此类改变可以仅在非可变位置进行,也称为支架氨基酸残基。在此类情况下,可变位置不允许改变。在其他实施方案中,此类变化可以仅在可变位置。

[0110] 根据此类“可变位置”的一种定义,这些位置在如上定义的序列i)中用“X”表示。

[0111] 根据另一种定义,“可变位置”是在选择之前在Z变体的选择文库中随机化的那些位置,并且因此可以是例如序列i)中的位置2、3、4、6、7、10、11、17、18、20、21、25和28。“可变位置”的该定义不包括位置16和26,它们在这种情况下是支架位置,尽管在每个位置中允许是两个替代方案之一。参考了Nord等人(1995),*Prot Eng*[蛋白质工程]8:601-608,和Löfblom等人(2010),*FEBS Letters*[欧洲生化学会联合会快报],584:2670-2680。如同本披露的TSLP结合Z变体,Nord等人和Löfblom等人披露的多肽也基于来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A的结构域B的Z衍生物的支架,尽管针对其他靶标。如Nord等人(参见例如图4)所示,位置23(对应于本发明TSLP结合基序中的位置16)和33(对应于本发明TSLP结合基序中的位置26)的氨基酸分别是N和S。还如Löfblom等人所示,在位置23和33分别具有氨基酸残基N和S的多肽(对应于本发明TSLP结合基序中的位置16和26;参见Löfblom等人的图2),以及在位置23和33分别具有氨基酸残基T和K的多肽,均具有维持的基本结构和功能。因此,在“可变位置”这一定义的上下文中,位置16和26处的氨基酸残基

形成共同支架的一部分,并且预期在支架位置16具有N或T,并且在支架位置26具有S或K。

[0112] 如整个说明书中使用的术语“同一性%”可以例如计算如下。使用CLUSTAL W算法将查询序列与靶序列比对(Thompson等人,1994,Nucleic Acids Research[核酸研究],22:4673-4680)。在对应于最短比对序列的窗口进行比较。在一些情况下,比对序列中最短的可能是靶序列。在其他情况下,比对序列中最短的可能是查询序列。比较每个位置处的氨基酸残基,并将查询序列中与靶序列具有相同对应关系的位置百分比报告为同一性%。

[0113] 在另一个实施方案中,提供了包含结合基序序列的TSLP结合多肽,该基序序列对应于选自SEQ ID NO:1-875组成的组的序列中位置8至位置36的序列;或与其具有93%或更高同一性,比如与其具有96%同一性的序列。

[0114] 在一些实施方案中,如上所定义的BM“形成”三螺旋束蛋白结构域的一部分。这被理解为意味着BM的序列被“插入”或“嫁接”到原始三螺旋束结构域的序列上,使得BM替代了原始结构域中的类似结构基序。例如,不希望被理论所束缚,BM被认为构成了三螺旋束的三个螺旋中的两个,并且因此可以替代任何三螺旋束中的这种双螺旋基序。如技术人员将认识到的,必须进行用两个BM螺旋替代三螺旋束结构域的两个螺旋,以便不影响多肽的基本结构。也就是说,根据本发明的该实施方案,多肽的C α 主链的整体折叠与其形成一部分的三螺旋束蛋白结构域的折叠基本上相同,例如具有相同顺序的相同二级结构元件等。因此,如果根据该实施方案的多肽具有与原始结构域相同的折叠,则根据本披露的BM“形成三螺旋束结构域的一部分”,这意味着基本结构特性是共有的,这些特性例如导致相似的CD谱。技术人员知道相关的其他参数。

[0115] 在特定实施方案中,TSLP结合基序(BM)因此形成三螺旋束蛋白结构域的一部分。例如,在所述三螺旋束蛋白结构域内,BM可以基本上构成两个具有互连的 α 螺旋。在特定实施方案中,所述三螺旋束蛋白结构域选自细菌受体蛋白的结构域。此类结构域的非限制性实例是来自金黄色葡萄球菌的蛋白A的五个不同的三螺旋结构域,比如结构域B,及其衍生物。在一些实施方案中,三螺旋束蛋白结构域是蛋白Z的变体,其来源于葡萄球菌蛋白A的结构域B(Wahlberg E等人2003,PNAS[美国国家科学院院刊]100(6):3185-3190)。

[0116] 在一些实施方案中,如本文披露的TSLP结合多肽形成三螺旋束蛋白结构域的一部分,TSLP结合多肽可以包含结合模块(BMod),其氨基酸序列选自:

[0117] iii) K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ (SEQ ID NO:1082);

[0118] 其中

[0119] [BM]是根据本文任何定义的TSLP结合基序;

[0120] X_a选自A和S;

[0121] X_b选自E和N;

[0122] X_c选自A、S和C;

[0123] X_d选自E、N和S;

[0124] X_e选自D、E和S;

[0125] X_f选自A和S;以及

[0126] iv) 与iii)中定义的序列具有至少91%同一性的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中,所述多肽在生产和储存期间以及在体内可以有利地表现出高结构稳定性,比如对化学修饰、物理条件变化和蛋白水解的抗性。

[0128] 如上所讨论,与上述氨基酸序列相比包含微小变化(这些变化不会对多肽的三级结构和功能产生很大影响)的多肽也在本披露的范围内。因此,在一些实施方案中,序列iv)与通过iii)定义的序列具有至少93%,比如至少95%,比如至少97%的同一性。

[0129] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_a 是A。

[0130] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_a 是S。

[0131] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_b 是N。

[0132] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_b 是E。

[0133] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_c 是A。

[0134] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_c 是S。

[0135] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_c 是C。

[0136] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_d 是E。

[0137] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_d 是N。

[0138] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_d 是S。

[0139] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_e 是D。

[0140] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_e 是E。

[0141] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_e 是S。

[0142] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_dX_e 选自EE、ES、SD、SE和SS。

[0143] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_dX_e 是ES。

[0144] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_dX_e 是SE。

[0145] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_dX_e 是SD。

[0146] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_f 是A。

[0147] 在一个实施方案中,序列iii)中的 X_f 是S。

[0148] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是A,并且 X_f 是A。

[0149] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是A,并且 X_f 是A。

[0150] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是C,并且 X_f 是A。

[0151] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是S,并且 X_f 是S。

[0152] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是C,并且 X_f 是S。

[0153] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是A; X_dX_e 是ND,并且 X_f 是A。

[0154] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是A; X_dX_e 是ND,并且 X_f 是A。

[0155] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是C; X_dX_e 是ND,并且 X_f 是A。

[0156] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是S; X_dX_e 是ND,并且 X_f 是S。

[0157] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是C; X_dX_e 是ND,并且 X_f 是S。

[0158] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是A; X_dX_e 是SE,并且 X_f 是A。

[0159] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是A; X_dX_e 是SE,并且 X_f 是A。

[0160] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是C; X_dX_e 是SE,并且 X_f 是A。

[0161] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是S; X_dX_e 是SE,并且 X_f 是S。

[0162] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是C; X_dX_e 是SE,并且 X_f 是S。

[0163] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是A; X_dX_e 是SD,并且 X_f 是A。

[0164] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是A; X_dX_e 是SD,并且 X_f 是A。

[0165] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是A; X_b 是N; X_c 是C; X_dX_e 是SD,并且 X_f 是A。

[0166] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是S; X_dX_e 是SD,并且 X_f 是S。

[0167] 在一个实施方案中,在序列iii)中, X_a 是S; X_b 是E; X_c 是C; X_dX_e 是SD,并且 X_f 是S。

[0168] 在进一步的实施方案中,该实施方案是本披露第一方面的实施方案,序列iii)对应于选自自由SEQ ID NO:1-875组成的组的序列中位置7至位置55的氨基酸序列。在一个实施方案中,序列iii)选自对应于SEQ ID NO:1-645中位置7-55的氨基酸序列。在一个实施方案中,序列iii)选自对应于SEQ ID NO:1-630和645中位置7-55的氨基酸序列。在另一个实施方案中,序列iii)选自对应于SEQ ID NO:1-91中位置7-55的氨基酸序列。在一个实施方案中,序列iii)选自对应于SEQ ID NO:1-27中位置7-55的氨基酸序列。在又一个实施方案中,序列iii)选自对应于SEQ ID NO:1-2中位置7-55的氨基酸序列。

[0169] 此外,在另外的实施方案中,提供了TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:

[0170] v) YA-[BMod]-AP (SEQ ID NO:1083);

[0171] 其中[BMod]是如以上定义的TSLP结合模块;以及

[0172] vi) 与v)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。

[0173] 如上所讨论,与上述氨基酸序列相比包含微小变化(不会对三级结构及其功能产生很大影响)的多肽也落入本披露的范围内。因此,在一些实施方案中,如上所定义的TSLP结合多肽可以例如具有序列vi),该序列vi)与v)中定义的序列具有至少88%、比如至少90%、比如至少92%、比如至少94%、比如至少96%、比如至少98%同一性。

[0174] 在一些实施方案中,TSLP结合基序可以形成包含选自以下的氨基酸序列的多肽的一部分

[0175] ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK (SEQ ID NO:1084);

[0176] ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEQ ID NO:1085);

[0177] ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK (SEQ ID NO:1086);

[0178] ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGAEAKKLNESQAPK (SEQ ID NO:1087); AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGAEAKKLNDSQAPK (SEQ ID NO:1088);

[0179] VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (SEQ ID NO:1089);

[0180] AEAKYAK-[BM]-DPSESELLSEAKKLNKSQAPK (SEQ ID NO:1090);

[0181] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK (SEQ ID NO:1091);

[0182] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK (SEQ ID NO:1092);

[0183] AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK (SEQ ID NO:1093);

[0184] AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSQAPK (SEQ ID NO:1094);

[0185] AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSQAPK (SEQ ID NO:1095);

[0186] AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK (SEQ ID NO:1096);

[0187] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK (SEQ ID NO:1097);

[0188] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSQAPK (SEQ ID NO:1098);

[0189] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK (SEQ ID NO:1099);

[0190] VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK (SEQ ID NO:1100); 以及

[0191] AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK (SEQ ID NO:1101);

- [0192] 其中[BM]是如以上定义的IL-17A结合基序。
- [0193] 在一个实施方案中,TSLP结合多肽包含选自以下的氨基酸序列:
- [0194] vii) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK (SEQ ID NO:1097);
- [0195] 其中[BM]是如本文定义的TSLP结合基序;以及
- [0196] viii) 与vii)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0197] 在进一步的实施方案中,序列vii)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1-636、639-644和646-875,例如选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1-636和639-644。
- [0198] 在另一个进一步的实施方案中,TSLP结合多肽包含选自以下的氨基酸序列:
- [0199] ix) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSQAPK (SEQ ID NO:1095);
- [0200] 其中[BM]是如本文定义的TSLP结合基序;以及
- [0201] x) 与ix)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0202] 在进一步的实施方案中,序列ix)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:637和SEQ ID NO:638。
- [0203] 在另一个进一步的实施方案中,TSLP结合多肽包含选自以下的氨基酸序列:
- [0204] xi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNSQAPK (SEQ ID NO:1093);
- [0205] 其中[BM]是如本文定义的TSLP结合基序;以及
- [0206] xii) 与xi)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0207] 在进一步的实施方案中,序列xi)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:645和876-972。
- [0208] 在一个实施方案中,第一方面的TSLP结合多肽与TSLP结合,使得相互作用的 K_D 值为至多 $1 \times 10^{-6}M$,例如至多 $5 \times 10^{-7}M$ 、例如至多 $1 \times 10^{-7}M$ 、例如至多 $5 \times 10^{-8}M$ 、例如至多 $1 \times 10^{-8}M$ 。
- [0209] 如本说明书中使用的术语“TSLP结合”和“对TSLP的结合亲和力”是指多肽的一种特性,该特性可以例如通过ELISA、通过表面等离子共振 (SPR) 技术、通过石英晶体微天平 (QCM) 技术和/或通过动力学排阻测定(KinExA®)进行测试。
- [0210] 例如,如以下实验部分所述,可以在实验中测试TSLP结合亲和力,其中将多肽样品捕获在经抗体涂覆的ELISA板上,并添加生物素化的TSLP,随后添加链霉亲和素缀合的HRP。添加TMB底物,并使用多孔板读取器,比如Victor³(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量450nm处的吸光度。然后,技术人员可以解释通过此类实验获得的结果,以建立多肽对TSLP的结合亲和力的至少一种定性测量。如果期望的是定量测量,例如确定相互作用的EC50值(半数最大有效浓度),还可以使用ELISA。使用如上所述的ELISA测量多肽对连续稀释的生物素化的TSLP的应答。然后,技术人员可以对通过这样的实验获得的结果进行解读,并且可以使用例如GraphPad Prism 5和非线性回归根据结果计算EC50值。
- [0211] TSLP结合亲和力还可以在实验中测试,其中将TSLP或其片段固定在表面等离子共振 (SPR) 仪器的传感器芯片上,并且使含有待测试的多肽的样品通过芯片。可替代地,将待测试的多肽固定在仪器的传感器芯片上,并且使含有TSLP或其片段的样品通过芯片。然后,技术人员可以解释通过此类实验获得的结果,以建立多肽对TSLP的结合亲和力的至少一种定性测量。如果期望定量测量,例如以确定相互作用的 K_D 值,则也可以使用表面等离子体共振方法。结合值可以例如在Biacore (思拓凡公司(Cytiva))或ProteOn XPR 36 (伯乐公司

(Bio-Rad)) 仪器中定义。将TSLP适当地固定在仪器的传感器芯片上,并且通过连续稀释制备待测定亲和力的多肽样品,并以随机顺序注射。然后可以使用例如由仪器制造商提供的BIAevaluation 4.1软件或其他合适软件的1:1Langmuir结合模型从结果计算 K_D 值。

[0212] 还可以使用用于自动分析的连续流动系统,基于石英晶体微量天平(QCM)技术,测试TSLP结合亲和力。为监测结合相互作用,将相互作用的分子或其片段之一固定在传感器表面上,并将含有另一个分子的样品注入传感器表面。实时测量结合数据。信号输出以频率(Hz)给出,并与传感器表面的质量变化直接相关。如果期望的是定量测量,例如确定相互作用的 K_D 值,还可以使用QCM方法。例如,可以在Attana A200®(阿塔那公司(Attana))仪器中定义结合值。例如,将TSLP固定在仪器的传感器芯片上,并且通过连续稀释制备待测定亲和力的多肽样品,并注射。数据由认证软件收集,并然后可以使用例如1:1朗缪尔(Langmuir)结模型从结果计算 K_D 值,并随后在仪器制造商提供的评估软件或其他合适软件中进行处理。

[0213] 用于确定TSLP的结合亲和力的另一个方法是用于测量溶液中未经修饰的分子之间的平衡结合亲和力和动力学的动力学排阻测定(KinExA®;赛皮迪仪器公司(Sapidyne Instruments Inc);Darling和Brault,2004,Assay and Drug Dev Tech[测定和药物开发技术]2(6):647-657)。对于亲和力分析,平衡解离常数 K_D 和缔合率 k_a 是实验确定的,而解离率 k_d 可以基于等式 $k_d=K_D*k_a$ 来计算。

[0214] KinExA® K_D 分析需要一个相互作用配偶体(例如,滴定的结合配偶体)固定在固相中,然后一旦达到平衡,将该固相用作探针来捕获溶液中游离的另一个相互作用配偶体(例如,恒定结合配偶体)。对于每个实验,将具有一个结合配偶体的恒定浓度和另一个结合配偶体的滴定浓度的一系列溶液进行平衡。然后将溶液短暂暴露于固相,并且捕获一部分游离的恒定结合配偶体并用荧光二级分子进行标记。与固相的短接触时间小于溶液中预先形成的复合物的解离所需的时间,这意味着溶液与固相滴定的结合配偶体之间的竞争被“动力学排除”。由于固相仅用作每个样品中游离恒定结合配偶体的探针,因此在测量期间溶液平衡不会改变。从捕获的游离恒定结合配偶体生成的信号计算 K_D 值,这些信号与平衡样品中游离恒定结合配偶体的浓度成正比。可以使用KinExA®Pro软件和最小二乘法分析数据,以将 K_D 和活性结合位点浓度(ABC)的最佳解决方案拟合为代表化学计量相关模型的曲线,例如1:1可逆双分子相互作用。

[0215] 可以按与平衡分析类似的格式进行结合动力学的确定,除了测量是“预平衡”收集的,并且结合信号是时间和滴定的结合配偶体总浓度的函数。存在可用于确定 k_a 的两种方法。“直接法”将滴定和恒定结合配偶体的浓度保持不变,并随时间探测溶液。随着样品向平衡方向移动,溶液中游离恒定结合配偶体的数量将减少。“注射法”保持温育时间和一个配偶体的浓度固定,同时滴定另一个配偶体的浓度。随着滴定的结合配偶体的浓度增加,随着更多复合物的形成,游离恒定结合配偶体的量将减少。

[0216] 如本披露中使用的术语“白蛋白结合”和“对白蛋白的结合亲和力”是指多肽的一种特性,其可以例如通过SPR、QCM或KinExA®,以与上文针对TSLP所述的实例类似的方式进行测试。

[0217] 技术人员将理解,根据本文披露的任何方面,可以对TSLP结合多肽进行各种修饰

和/或添加,以便在不脱离本披露范围的情况下,使多肽适应特定的应用。

[0218] 例如,在一个实施方案中,提供了如本文所述的TSLP结合多肽,该多肽在C末端和/或N末端处延伸了和/或包含另外的氨基酸。这种多肽应理解为在多肽链中的最前和/或最后位置处具有一个或多个另外的氨基酸残基的多肽。因此,TSLP结合多肽可以包含任何合适数量的另外的氨基酸残基,例如至少一个另外的氨基酸残基。每个另外的氨基酸残基均可以单独或共同添加,以便例如改善和/或简化多肽的生产、纯化、体内或体外稳定、偶联或检测。此类另外的氨基酸残基可以包含一个或多个为化学偶联目的而添加的氨基酸残基。其中一个实例是添加半胱氨酸残基。额外的氨基酸残基还可以提供用于多肽纯化或检测的“标签”,比如His₆标签、(HisGlu)₃标签(“HEHEHE”标签)或“myc”(c-myc)标签或“FLAG”标签,用于与对该标签特异的抗体或在His₆标签的情况下的固定化金属亲和色谱(IMAC)相互作用。

[0219] 在一个实施方案中,提供了如本文所述的TSLP结合多肽,其在C-末端和/或N-末端处包含另外的氨基酸。例如,在如本文披露的TSLP结合多肽的一个实施方案中,它由本文披露的任一种序列组成,具有0至15个另外的C-末端和/或N-末端残基,比如0至7个另外的C-末端和/或N-末端残基。在一个实施方案中,TSLP结合多肽由本文披露的任一种序列组成,具有0至15个、比如0至4个、比如3个另外的C-末端残基。

[0220] 如上所讨论的另外的氨基酸可以通过化学缀合(使用已知的有机化学方法)或通过任何其他方式与TSLP结合多肽偶联,比如将TSLP结合多肽表达为融合蛋白或以任何其他方式直接或经由接头(例如氨基酸接头)连接。

[0221] 此外,另外的多肽结构域可以提供另一个TSLP结合部分。因此,在另外的实施方案,提供了呈多聚体形式的TSLP结合多肽。所述多聚体被理解为包含至少两个如本文披露的TSLP结合多肽作为单体单元,其氨基酸序列可以相同或不同。多肽的多聚体形式可以包含合适数量的结构域,每个结构域均具有TSLP结合基序,并且每个结构域均在多聚体内形成单体。这些结构域可以具有相同的氨基酸序列,但可替代地,它们可以具有不同的氨基酸序列。换言之,本发明的TSLP结合多肽可以形成同源或异源多聚体,如同源或异源二聚体。在一个实施方案中,提供了TSLP结合多肽,其中所述单体单元共价偶联在一起。在另一个实施方案中,所述TSLP结合多肽单体单元被表达为融合蛋白。在一个实施方案中,提供了呈二聚体形式的TSLP结合多肽。在一个特定实施方案中,所述二聚体形式是同源二聚体形式。在另一个实施方案中,所述二聚体形式是异源二聚体形式。

[0222] 为了清楚起见,在整个披露内容中,术语“TSLP结合多肽”用于涵盖呈所有形式的TSLP结合多肽,即单体和多聚体形式。

[0223] 如上所讨论的另外的氨基酸可以例如包含一个或多个另外的多肽结构域。另一个多肽结构域可以为TSLP结合多肽提供另一种功能,比如另一种结合功能、或酶功能、或毒性功能或荧光信号传导功能、或其组合。

[0224] 此外,可能有益的是,如本文定义的TSLP结合多肽是包含第二或另外的部分的融合蛋白或缀合物的一部分。这种蛋白质中融合多肽或缀合物的第二和一个或多个另外的部分可以适当地具有所期望的生物活性。

[0225] 因此,在本披露的第二方面,提供了融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含:

[0226] -由根据第一方面所述的TSLP结合多肽组成的第一部分;以及

[0227] -由具有所期望生物活性的多肽组成的第二部分。

[0228] 在一个实施方案中,所述融合蛋白或缀合物可以额外地包含另外的部分,其包含所期望的生物活性,这些生物活性可以与第二部分的生物活性相同或不同。

[0229] 所期望的生物活性的非限制性实例包括治疗活性、结合活性和酶活性。在一个实施方案中,具有所期望生物活性的第二部分是治疗活性多肽。在一个实施方案中,所述第二部分是免疫应答调节剂。在另一个实施方案中,所述第二部分是抗癌剂。

[0230] 在本披露第一或第二方面的一个实施方案中,提供了TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物,其包含免疫应答调节剂。另外的免疫应答调节剂的非限制性实例包括免疫调节剂或其他抗炎剂。

[0231] 治疗活性多肽的非限制性实例是生物分子,比如选自由人内源性酶、激素、生长因子、趋化因子、细胞因子和淋巴因子组成的组的分子。

[0232] 结合活性的非限制性实例是增加融合蛋白或缀合物体内半衰期的结合活性,以及用于例如阻断、抑制、活化、增强、拮抗生物活性或使生物活性激动的结合活性。这种结合活性的一个实例是增加融合蛋白或缀合物体内半衰期的结合活性。在所述融合蛋白或缀合物的一个实施方案中,所述融合蛋白或缀合物的体内半衰期长于TSLP结合多肽本身的体内半衰期。在一个实施方案中,与TSLP结合多肽本身的体内半衰期相比,所述体内半衰期增加了至少10倍,比如至少25倍、比如至少50倍、比如至少75倍、比如至少100倍。

[0233] 如讨论的,融合蛋白或缀合物可以包含至少一个对靶标具有结合活性的另外的部分。在一个具体的实施方案中,所述靶标是白蛋白,与其结合增加了所述融合蛋白或缀合物的体内半衰期。在一个实施方案中,所述白蛋白结合活性由链球菌蛋白G或其衍生物的白蛋白结合结构域(ABD)提供。因此,所述融合蛋白可以例如包含如本文定义的呈单体或多聚体形式(比如同源二聚体或异源二聚体形式)的TSLP结合多肽和链球菌蛋白G或其衍生物的白蛋白结合结构域。链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域的衍生物是本领域技术人员已知的,例如根据WO 2009/016043、WO 2012/004384和WO 2014/048977,均通过引用特此并入。应该理解的是,所述白蛋白结合结构域(ABD)可以位于TSLP结合多肽的C末端处和/或TSLP结合多肽的N末端处。适当地,在TSLP结合多肽的N末端处具有ABD可以减少或防止寡聚化。

[0234] 在另一个实施方案中,提供了融合蛋白或缀合物,其中具有所期望结合活性的所述第二部分是基于蛋白Z的蛋白质,来源于来自金黄色葡萄球菌的蛋白A的B结构域,对除TSLP之外的靶标具有结合亲和力。

[0235] 在另一个实施方案中,提供了融合蛋白或缀合物,其中具有所期望结合活性的所述第二部分是抗体或其抗原结合片段。众所周知,抗体是免疫球蛋白分子,其能够通过免疫球蛋白分子上的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标(抗原),比如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽或其他。如本文所用,术语“抗体或其抗原结合片段”不仅涵盖全长或完整的多克隆或单克隆抗体,还涵盖其抗原结合片段,比如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₃、Fv及其变体、包含一个或多个抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、微抗体、二抗体、三抗体、四抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型,包括抗体的糖基化变体、抗体和共价修饰的抗体的氨基酸序列变体。经修饰的抗体及其抗原结合片段的进一步的实例包括纳

米抗体、AlbudAb、DART (双亲和力重靶向)、BiTE (双特异性T细胞衔接子)、TandAb (串联双抗体)、DAF (双重作用Fab)、二合一抗体、SMIP (小型模块免疫药物)、FynomAb (与抗体融合的fynomer)、DVD-Ig (双可变结构域免疫球蛋白)、CovX抗体 (肽修饰的抗体)、双抗体和三功能抗体 (triomAb)。抗体及其抗原结合片段的变体的列表不应被视为限制性的,并且技术人员知道其他合适的变体。

[0236] 在一个实施方案中,所述至少一种抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:全长抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、单链Fab (scFab)片段、Fc片段、Fv片段、单链Fv (scFv)片段、(scFv)₂、scFv-Fc构建体和结构域抗体。在一个实施方案中,所述至少一种抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab片段和scFv片段。在一个特定实施方案中,所述至少一种抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

[0237] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体及其抗原结合片段。

[0238] 技术人员知道融合蛋白的构建通常包括在待融合的功能部分之间使用接头,并且存在具有不同特性的不同种类的接头,比如柔性氨基酸接头、刚性氨基酸接头和可切割氨基酸接头。接头已被用于例如增加融合蛋白的稳定性或改善其折叠、增加表达、改善生物活性、实现靶向和改变融合蛋白的药代动力学。因此,在一个实施方案中,根据本文披露的任何方面的多肽进一步包含至少一个接头,比如至少一个选自柔性氨基酸接头、刚性氨基酸接头和可切割氨基酸接头的接头。在一个实施方案中,所述接头布置在所述TSLP结合多肽与另一个多肽结构域之间,比如如本文披露的TSLP结合结构域与抗体或其抗原结合片段之间。当连接的结构域需要一定程度的移动或相互作用时,柔性接头经常用于本领域,并且在一些实施方案中可能特别有用。此类接头通常由小的、非极性(例如G)或极性(例如S或T)氨基酸组成。一些柔性接头主要由G和S残基的区段组成,例如(GGGGS)_p。调整拷贝数“p”可用于优化接头,以实现功能部分之间的适当分离或维持必要的部分间相互作用。除了G和S接头之外,其他柔性接头是本领域已知的,比如含有另外的氨基酸残基(比如T和A)以保持柔性的G和S接头,以及提高溶解性的极性氨基酸残基。接头的额外非限制性实例分别包括ASGS (SEQ ID NO:1102)、GAPGGGGS (SEQ ID NO:1103)、GGGGS LVP RSGGGGS (SEQ ID NO:1104)、(GS)₃ (SEQ ID NO:1105)、(GS)₄ (SEQ ID NO:1106)、(GS)₈ (SEQ ID NO:1107)、GGSGGHMGS GG (SEQ ID NO:1108)、GGSGGSGGSGG (SEQ ID NO:1109)、GGSGG (SEQ ID NO:1110)、GGSGGGG (SEQ ID NO:1111)、GGGSEGGS EGGGSEGGG (SEQ ID NO:1112)、AAGAATAA (SEQ ID NO:1113)、GGGGG (SEQ ID NO:1114)、GGSSG (SEQ ID NO:1115)、GSGGGTGGGSG (SEQ ID NO:1116)、GSGSGSGSGGSG (SEQ ID NO:1117)、GSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:1118)和GSGGSGSGGSGGSG (SEQ ID NO:1119)以及GT。技术人员知道其他合适的接头。

[0239] 在一个实施方案中,所述接头是包含甘氨酸(G)、丝氨酸(S)和/或苏氨酸(T)残基的柔性接头。在一个实施方案中,所述接头具有选自(G_nS_m)_p和(S_nG_m)_p的通式,其中独立地,n=1-7,m=0-7,n+m≤8并且p=1-7。在一个实施方案中,n=1-5。在一个实施方案中,m=0-5。在一个实施方案中,p=1-5。在更特定的实施方案中,n=4,m=1,并且p=1-4。在一个实施方案中,所述接头选自由以下组成的组:S₄G (SEQ ID NO:1120)、(S₄G)₃ (SEQ ID NO:1121)和(S₄G)₄ (SEQ ID NO:1122)。在一个实施方案中,所述接头选自由以下组成的组:G₄S (SEQ ID NO:1123)和(G₄S)₃ (SEQ ID NO:1124)。在一个特定实施方案中,所述接头是G₄S,并且在

另一个实施方案中,所述接头是(G₄S)₃。

[0240] 关于上文对根据本披露掺入TSLP结合多肽的融合蛋白或缀合物的描述,应注意,第一、第二和另外的部分的命名是为了清楚起见,一方面用于区分根据本发明的一种或多种TSLP结合多肽,且另一方面用于区分表现出相同或其他功能的部分。这些名称并不意图是指融合蛋白或缀合物的多肽链中不同结构域的实际顺序。类似地,命名第一和第二单体单元是为了清楚起见,以区分所述单元。因此,例如,所述第一部分(或单体单元)可以无限制地出现在融合蛋白或缀合物的N-末端、中间或C-末端处。

[0241] 此外,以上方面还涵盖多肽,其中根据第一方面的TSLP结合多肽或如包含在根据第二方面的融合蛋白或缀合物中的TSLP结合多肽进一步包含标记,比如选自自由以下组成的组的标记:荧光染料和金属、发色染料、化学发光化合物、生物发光蛋白质、酶、放射性核素和放射性颗粒。本领域技术人员将熟悉的此类标记例如可以用于检测多肽。

[0242] 在一些实施方案中,经标记的TSLP结合多肽作为融合蛋白或缀合物(还包含具有所期望生物活性的第二部分或另外的部分)中的一部分存在。在一些情况下,标记可以仅与TSLP结合多肽偶联,并且在一些情况下,可以与TSLP结合多肽和融合蛋白或缀合物的第二部分两者偶联。此外,还可能的是,标记可以与第二部分偶联,而不与TSLP结合部分偶联。因此,在又一个实施方案中,提供了包含第二部分的TSLP结合多肽,其中所述标记仅与第二部分偶联。因此,当提及经标记的多肽时,应理解为提及如本文所述多肽的所有方面,包括TSLP结合多肽、包含TSLP结合多肽的融合蛋白和缀合物。

[0243] 在本披露的进一步方面,提供了编码如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物的多核苷酸;包含所述多核苷酸的表达载体;以及包含所述表达载体的宿主细胞。

[0244] 本披露还涵盖产生如上所述的TSLP结合多肽或融合蛋白的方法,该方法包括在允许所述多肽从其表达载体表达的条件下培养所述宿主细胞,并分离该多肽。

[0245] 可替代地,本披露的TSLP结合多肽或融合蛋白可以通过使用具有受保护的侧链的氨基酸和/或氨基酸衍生物的非生物肽合成来产生,该非生物肽合成包括

[0246] -逐步偶联氨基酸和/或氨基酸衍生物以形成如本文所述的具有受保护的侧链的多肽或融合蛋白,

[0247] -从多肽或融合蛋白的反应性侧链上除去保护基团,以及

[0248] -在水性溶液中折叠多肽。

[0249] 如本文披露的缀合物可以通过将如本文所述的至少一个TSLP结合多肽或融合蛋白与至少一个额外的部分缀合来产生。技术人员知道缀合方法,比如常规化学缀合方法,例如使用带电的琥珀酰亚胺酯或碳二亚胺。

[0250] 应该理解,根据本披露的TSLP结合多肽本身通常可用作治疗剂、诊断剂和/或预后剂。例如,可以通过拮抗TSLP作用来实现治疗效果。

[0251] 因此,在另一方面,提供了组合物,其包含如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物以及至少一种药学上可接受的赋形剂或载剂。在一个实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种另外的活性剂,比如至少两种另外的活性剂,比如至少三种另外的活性剂。

[0252] 本披露TSLP结合多肽的小尺寸和稳健性赋予其优于基于常规单克隆抗体的疗法的几个优点。此类优点包括在配制剂、施用方式(比如替代施用途径)、以高于抗体的摩尔剂

量施用以及没有Fc介导的副作用方面的优点。特别是在治疗急性炎症性病症时,本文所述多肽的短血浆半衰期可能比具有长停留时间的单克隆抗体更有优势。考虑本披露的药剂用于口服、经呼吸道(包括吸入和吹入)、局部、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、经皮、肌内、鼻内、口腔含化、舌下或栓剂施用,比如特别地用于经呼吸道、静脉内或皮下施用。

[0253] 在本披露的另一个方面,提供了如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,用作药物、预后剂和/或诊断剂。在一个实施方案中,提供了用于TSLP相关障碍或疾病(比如炎症性疾病、自身免疫性疾病或癌症疾病)的治疗、诊断或预后的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。

[0254] 在一个实施方案中,所述诊断用途在体内进行。在另一个实施方案中,所述诊断用途在体外进行。在一个实施方案中,所述预后用途在体内进行。在另一个实施方案中,所述预后用途在体外进行。

[0255] 在一个实施方案中,提供了所述TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,用作药物。在更特定的实施方案中,提供了如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,用作调节TSLP功能(比如调节体内TSLP功能)的药物。如本文所用,术语“调节”是指改变活性,比如部分地抑制或完全抑制TSLP功能。

[0256] 在一个实施方案中,提供了用于TSLP相关障碍的治疗的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。

[0257] 在一个实施方案中,提供了用于TSLP相关障碍的诊断的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。在更特定的实施方案中,所述诊断用途在体内进行。在另一个特定的实施方案中,所述诊断用途在体外进行。

[0258] 在一个实施方案中,提供了用于TSLP相关障碍的预后的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。在更特定的实施方案中,所述预后用途在体内进行。在另一个特定的实施方案中,所述预后用途在体外进行。

[0259] 如本文所用,术语“TSLP相关障碍或疾病”是指任何障碍、疾病或病症,其中TSLP作用发挥作用和/或其中TSLP的调节(抑制)可以是有利的。这样的障碍、疾病或病症可以选自以下组成的组:呼吸系统疾病、皮肤疾病、过敏、眼病、胃肠疾病和癌症。

[0260] 非限制性实例包括哮喘、特应性皮炎、特应性角结膜炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性食管炎、慢性阻塞性肺疾病、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)/查尔格-施特劳斯(Churg-Strauss)综合征、乳腺癌、结节性痒疹和大疱性类天疱疮。

[0261] 应理解的是所述TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物可以用作唯一诊断或预后剂或作为陪伴诊断和/或预后剂。

[0262] 在相关的方面,提供了治疗TSLP相关障碍的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。在所述方法的更特定的实施方案中,如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物在体内调节TSLP功能。技术人员将理解,与如本文所述用于治疗疾病或障碍的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的使用相关的任何描述对于相关的治疗方法同样相关。为了简洁起见,这里将不再重复这样的描述。

[0263] 在本披露的另一方面,提供了检测TSLP的体外方法,该方法包括提供怀疑含有TSLP的样品,使所述样品与如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物接触,

并检测TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的结合,以指示样品中TSLP的存在。

[0264] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括中间洗涤步骤,用于在接触样品后去除未结合的多肽、融合蛋白、缀合物或组合物。

[0265] 在本披露的另一个方面,提供了用于确定受试者中TSLP存在的诊断或预后方法,该方法包括以下步骤:

[0266] a) 使受试者或从受试者分离的样品与如本文所述的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物接触;以及

[0267] b) 获得对应于所述受试者或所述样品中结合的该TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的量的值。

[0268] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括在接触受试者或样品之后和获得值之前用于去除未结合的多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的中间洗涤步骤。

[0269] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括将所述值与参考进行比较的步骤。所述参考可以是数值、阈值或视觉指示器,例如基于颜色反应。技术人员将理解,与参考进行比较的不同方式是本领域已知的,并且可能是适用的。

[0270] 在这种方法的一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物受试者,比如人受试者。在一个实施方案中,所述方法在体内进行。在另一个实施方案中,所述方法在体外进行。

[0271] 在本文披露的治疗、诊断和预后的不同医疗用途和方法的某些实施方案中,所述TSLP相关障碍选自以下组成的组:炎症性疾病、自身免疫性疾病和癌症疾病。因此,所述TSLP相关障碍可以选自呼吸系统疾病、皮肤疾病、过敏、眼病、胃肠道疾病和癌症。

[0272] 在本披露的上下文中也是TSLP相关障碍的实施方案,对TSLP具有亲和力的多肽被认为具有治疗性、诊断或预后相关性,这些类别内的特定适应证的实例是哮喘、特应性皮炎、特应性角结膜炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性食管炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)/查尔格-施特劳斯综合征、乳腺癌、结节性痒疹和大疱性类天疱疮。

[0273] 在本披露前述治疗性方面的任一项所述的另一个实施方案中,TSLP相关障碍选自以下组成的组:冷球蛋白血症、肺纤维化、特发性肺纤维化、内瑟顿(Netherton)综合症、动脉粥样硬化、系统性硬化症、扁平苔藓、胰腺癌、贝赛特氏(Behçet)病、疱疹性湿疹、嗜酸性细胞性胃肠炎、多发性硬化症、川崎病引起的血栓、IgG4相关疾病和子宫内膜异位。

[0274] 在Tsilingiri等人、Varricchi等人Gauvreau等人及Markovic和Savvides的综述中发现关于TSLP及其作为用于治疗干预的靶标或作为用于诊断和/或预后的生物标志物的作用的更多信息,这些综述均在以上背景部分中提及。

[0275] 虽然已经参考各种示例性方面和实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的范围的情况下,可以进行各种改变并且可以用等同物来替换其要素。另外,在不脱离本发明的实质范围的情况下,可以进行许多修改以使特定情况或分子适应本发明的传授内容。因此,意图是本发明不限于所设想的任何特定实施方案,而是本发明将包括落入所附权利要求的范围内的所有实施方案。

附图说明

[0276] 图1示出了对于在两种不同支架中N-或C-末端带His标签的Z变体,如实施例3中所

述收集的圆二色性 (CD) 光谱的实例。(A) ZTP631 (SEQ ID NO:631) 和 (C) ZTP637 (SEQ ID NO:637) 的溶解曲线;在 (B) ZTP631 和 (D) ZTP637 热诱导变性之前 (黑线) 和之后 (灰线) 收集 CD 光谱。

[0277] 图2示出了如实施例3所述当对通过Biacore测量的与固定化人TSLP的相互作用进行分析时,针对带His₆标签的Z变体ZTP631 (SEQ ID NO:631) 获得的传感图的实例。以11nM (实线)、33nM (虚线) 和100nM (点线) 的浓度注射ZTP631。

[0278] 图3示出了如实施例4所述通过所示Z变体对人PBMC中TSLP诱导的TARC产生的浓度依赖性抑制。

[0279] 图4示出了对于在两种不同支架中成熟的C-末端带His标签的Z变体,如实施例7中所述收集的圆二色性 (CD) 光谱的实例。(A) ZTP876 (SEQ ID NO:876) 和 (C) ZTP967 (SEQ ID NO:967) 的溶解曲线;在 (B) ZTP876 和 (D) ZTP967 的热诱导变性之前 (黑线) 和之后 (灰线) 收集 CD 光谱。

[0280] 图5示出了如实施例7所述当对通过Biacore测量的与固定化TSLP的相互作用进行分析时,针对成熟Z-ABD变体获得的传感图的三个实例。在SCK实验中,以3.3、10、30和90nM 的连续浓度,分别注入ZTPA028 (SEQ ID NO:1000) (实线)、ZTPA029 (SEQ ID NO:1001) (虚线) 和ZTPA030 (SEQ ID NO:1002) (点线)。

[0281] 图6示出了在针对来自不同物种的TSLP的Biacore动力学分析中获得的传感图的实例,表明与食蟹猴TSLP结合,但不与大鼠或小鼠TSLP结合。将浓度为4nM (实线)、16nM (虚线) 和64nM (点线) 的TSLP注射到与ABD融合的HSA捕获的ZTPA001 (SEQ ID NO:973) 上。

[0282] 图7示出了用TSLP结合Z变体ZTPA104 (SEQ ID NO:1076;小图A) 和ZTPA001 (SEQ ID NO:973;小图B) 以及用IL-17A结合对照多肽 (小图C) 进行的点印迹的结果。将Z变体用膜温育,在该膜上应用全部来源于人的高丰度的血浆蛋白;HSA (1)、IgG (2)、 α -2-巨球蛋白 (3)、 α 1-抗胰蛋白酶 (4)、补体组分3c (C3c) (5)、结合球蛋白 (6)、 α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (7)、C4补体 (8)、IgE (9)、血红素结合蛋白 (10)、甲状腺素转运蛋白 (11)、来自IgG (12) 的Fc片段、全铁转铁蛋白 (holo-transferrin) (13)、纤维蛋白原 (14)、IgA (15)、IgM (16);结构上与IL-2相关的细胞因子家族;IL-2 (17)、IL-4 (19)、IL-7 (21)、IL-9 (22)、IL-15 (23) 和IL-21 (25);不相关的细胞因子;IL-3 (18)、IL-5 (20) 和IL-17A (24);和TSLP蛋白;sfTSLP (26)、全长TSLP未切割的 (27)、全长TSLP切割的 (28)。使用抗Z多克隆抗体对膜进行显影,产生阳性结合事件的点。小图D示出了在ZTPA104与10倍过量的HSA一起预温育后,使用小图A-C中的蛋白质子集进行的点印迹的结果:HSA (1)、IgG (2)、补体组分3c (C3c) (5)、 α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (7)、C4补体 (8)、IgE (9)、来自IgG (12) 的Fc片段、全铁转铁蛋白 (13)、纤维蛋白原 (14)、IgA (15)、IgM (16)、sfTSLP (26)、全长TSLP未切割的 (27)、全长TSLP切割的 (28)。

[0283] 图8示出了根据对ZTPA002 (SEQ ID NO:974;浅灰色圆圈)、ZTPA001 (SEQ ID NO:973;深灰色三角形) 和ZTPA093 (SEQ ID NO:1065;黑色菱形) 进行的分析,来自实施例8中所述的PathHunter® eXpress IL7R/CRLF2细胞测定的示例性结果的图表。结果以抑制性谱曲线呈现,其中y轴上是如通过EnSpire多模态读取器测量的相对光单位 (RLU),并且x轴上是抑制剂浓度。

[0284] 图9示出了用ZTPA001 (SEQ ID NO:973) i.v. 施用的单个食蟹猴的血清浓度与时间的曲线,并如实施例9 (A) 和10 (B) 中所述进行分析。

[0285] 图10示出了在实施例10中所述的TSLP诱导的食蟹猴模型中细胞因子和趋化因子的产生。示出了在注射TSLP之前2h,在注射不存在(图的左侧)或存在(图的右侧)ZTPA001 (SEQ ID NO:973)的情况下,在静脉内注射62.5 μ g/kg TSLP后4和8h血清中IL-2(A)、IL-5(B)、TARC(C)和MDC(D)的水平。细胞因子/趋化因子血清水平以pg/mL表示;LLOQ=定量下限。

[0286] 图11示出了大鼠中ZTPA001 (SEQ ID NO:973;实心圆圈)和ZTPA104 (SEQ ID NO:1076;实心正方形)的平均血清浓度与时间的曲线。仅当给定时间点处的所有值(n=3)均高于LLOQ时,平均值才包含在图中。

[0287] 图12示出了在通过吸入施用后评估的雄性(正方形)和雌性(圆形)食蟹猴中(A)BAL液和(B)肺组织匀浆中ZTPA001 (SEQ ID NO:973)的浓度。在左肺(L)或右肺(R)之间或在组织取样位置(即近端(proximal/prox)或远端(distal)之间没有观察到差异。

[0288] 图13示出了在通过吸入施用后评估的单个食蟹猴中ZTPA001 (SEQ ID NO:973)血浆浓度与时间的曲线。

[0289] 图14示出了通过吸入施用后评估的来自食蟹猴的血浆样品中ZTPA001 (SEQ ID NO:973)的TSLP结合能力。展示两次分析的数据并将其描绘为一式两份的平均值 \pm 标准差。

实施例

[0290] 总结

[0291] 以下实施例披露了基于噬菌体展示技术,开发靶向人胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)的新颖Z变体分子。对如本文所述的所选的多肽进行测序,并将其氨基酸序列列于序列列表中,序列标识符为SEQ ID NO:1-875。这些实施例进一步描述了这些所选TSLP结合多肽、其变体和衍生物以及包含它们的融合蛋白的表征,并展示了它们的体外和体内功能性。

[0292] 实施例1

[0293] TSLP结合Z变体的选择和筛选

[0294] 总结

[0295] 在本实施例中,使用两种不同的Z变体噬菌体文库,将重组产生的人TSLP用作噬菌体展示选择中的靶标。对所选克隆进行DNA测序,在大肠杆菌(E.coli)中产生,并针对TSLP在ELISA(酶联免疫吸附测定)中进行测定。

[0296] 材料和方法

[0297] 靶蛋白的生物素化:根据制造者的建议,使用No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-生物素(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific)),按10倍摩尔过量,将重组产生的人TSLP(R&D系统公司(R&D Systems),目录号1398-TS/CF;SEQ ID NO:1079)生物素化。将反应在4 $^{\circ}$ C下进行2.5h,然后在室温(RT)下温育1h。在透析盒中进行生物素化,在生物素化后,将该透析盒直接用于缓冲液交换为磷酸盐缓冲液(PBS:Dulbecco's Gibco DPBS;9.6mM磷酸盐、138mM NaCl、2.67mM KCl,pH 7.4)。

[0298] TSLP结合Z变体的噬菌体展示选择:基本上如Grönwall等人,2007JBiotecnol [生物技术杂志]128:162-183中所述,将细菌噬菌体上展示的、分别在噬菌粒pAY02592或pAY04242上构建的蛋白Z的随机变体的两个不同文库用于选择TSLP结合多肽。在这些文库中,将白蛋白结合结构域(ABD,来自链球菌菌株G148的蛋白G的结构域GA3;SEQ ID NO:

1078) 用作与Z变体的融合配偶体。这些文库被分别表示为Zlib006Naive.II和Zlib008Naive.II,并且具有 1.5×10^{10} 个和 2.9×10^{10} 个文库成员(Z变体)大小。

[0299] 使用来自文库的甘油储备液的大肠杆菌RRI Δ M15细胞(Rüther等人,1982Nucleic Acids Res [核酸研究]10:5765-5772),基本上如先前所述进行从噬菌粒文库Zlib006Naive.II产生噬菌体储备液(参见例如,PCT公开WO 2017/072280)。

[0300] 如下所述进行来自噬菌粒文库“Naive.II”的噬菌体储备液的生产。将来自含有噬菌粒文库Zlib008Naive.II的甘油储备液的大肠杆菌XL-1Blue细胞(安捷伦科技有限公司(Agilent technologies),目录号200268)接种在补充有11g/L葡萄糖一水合物、100 μ g/mL羧苄青霉素和10mg/mL四环素盐酸盐的20L TSB+YE培养基[30g/L胰蛋白酶大豆肉汤;5.0g/L酵母提取物]中。使培养物在37 $^{\circ}$ C下于发酵罐(贝拉赫生物技术公司(Belach Bioteknik),BR20)中生长。当细胞在600nm (OD_{600})处达到光密度为0.62时,使用10倍摩尔过量的M13K07辅助噬菌体(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),目录号N0315S)感染大约4L的培养物。将细胞温育30min,随后将发酵罐用以下填充至20L:培养介质(3.05g/L $(NH_4)_2SO_4$; 6.1g/L酵母提取物;3.65g/L K_2HPO_4 ;5.45g/L KH_2PO_4 ;2.29g/L $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$;0.1mL/L Breox FMT30消泡剂);16mL微量元素溶液[129mM $FeCl_3$;36.7mM $ZnSO_4$;10.6mM $CuSO_4$; 78.1mM $MnSO_4$;94.1mM $CaCl_2$,溶解于1.2M HCl中];10.4mL维生素溶液[500mg/L DL-泛酸,钙盐;500mg/L胆碱氯化物;500mg/L叶酸;1000mg/L肌醇;500mg/L烟酰胺;50mg/L核黄素;500mg/L盐酸硫胺素];36.8ml的30g/L盐酸硫胺素;53mL的1.217M $MgSO_4$;16mL的100mg/mL羧苄青霉素;14.4mL的25% NH_4OH 。将培养物温育60min。添加20mL 50mg/mL卡那霉素和2mL 1M异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)。将温度降低至30 $^{\circ}$ C。开始葡萄糖限制的补料分批培养,其中将600g/L葡萄糖溶液进料至反应器(开始时为15g/h,其中20h后线性增加至75g/h,并然后恒定补料直至收获)。通过自动添加25% NH_4OH 将pH控制在7,补充空气(10L/min),并设定搅拌器以保持溶解氧的水平高于30%。在用IPTG诱导23h后收获培养物。通过离心去除培养物中的细胞。

[0301] 对于两个文库,使用聚乙二醇/氯化钠(PEG/NaCl)从上清液中沉淀噬菌体颗粒两次,过滤并溶解于PBS和甘油中,如Grönwall等人同上中所述。将噬菌体储备液储存在-80 $^{\circ}$ C下直至使用。

[0302] 在轨道1、3、4和6的溶液中使用轨道2、5和7中链霉亲和素珠(SA珠,Dynabeads M-280链霉亲和素,赛默飞世尔科技公司)的固相进行针对生物素化的TSLP的选择。在轨道1、2、4和5中,在37 $^{\circ}$ C下以及在轨道3、6和7中,在RT下进行选择。随着选择的进行,根据靶标浓度和洗涤次数和/或洗涤时间进一步划分轨道。

[0303] 为了减少背景结合物的量,在循环1-3中使用SA珠进行预选择,并且在循环4中使用中性抗生物素蛋白珠(NA珠,Sera-Mag SpeedBeads中性抗生物素蛋白涂覆的磁性颗粒,思拓凡公司)。在预选择期间,在RT下,将噬菌体储备液与涂覆的珠倒置温育30-60min。将预选择或选择中使用的珠用补充有3%牛血清白蛋白(BSA,西格玛公司(Sigma))和0.1% Tween20(PBSTB)的PBS预封闭,并且使用的所有试管均为不粘型(AM12450不粘型无RNA酶微量离心管,Ambion)。

[0304] 在RT或37 $^{\circ}$ C下,在补充有1.5 μ M人血清白蛋白(HSA,Recombunin,诺维信公司(Novozyme)) (PBSTBH)的PBSTB的溶液中进行选择。用于选择的时间为60-120min,随后在SA

珠或NA珠之间交替捕获靶-噬菌体颗粒复合物。对于固相选择,在选择之前,生物素化的TSLP已固定在SA珠上。最后,将具有靶-噬菌体颗粒复合物的不同珠用补充有0.1% Tween-20 (PBST0.1%)的PBS洗涤。

[0305] 除了以上之外,还进行了循环三中的一些轨道操作,其中在溶液中进行选择,随后在的96孔高结合聚苯乙烯板(康宁公司(Corning) 3690)的孔中捕获靶-噬菌体颗粒复合物,该板涂覆有在碳酸盐缓冲液(西格玛公司(Sigma))中稀释至5 μ g/mL的中性抗生物素蛋白蛋白质(NA皮尔斯公司(NAPierce),目录号31000)。随后将这些板用PBST0.1%严格洗涤。

[0306] 在最后的循环中,用洗脱物感染对数期细菌并稀释,然后铺展到补充有0.2g/L氨苄青霉素的TBAB板(30g/L胰蛋白胨血琼脂基质,OXOID)上,以形成待ELISA筛选中使用的单菌落。

[0307] 表2示出了选择策略的综述,该策略描述了在连续循环中随着靶浓度的降低和洗涤次数的增加而增加的严格性。除非另外说明,否则使用PBST进行洗涤1min。如WO 2009/077175所述进行洗脱。

[0308] 表2:使用两个主要文库针对TSLP进行选择的综述

[0309]

循环	选择轨道	来自一个或多个文库或选择轨道的噬菌体储备液	靶标浓度 (nM)	溶液 (S) 或固相类型的选择: NA 珠 (B), 聚苯乙烯板 (P) 中的 SA	洗涤次数	选择和洗涤期间的温度
1	1	Zlib008Naive.II	100	S	2	37°C
1	2	Zlib008Naive.II	100	B	2	37°C
1	3	Zlib008Naive.II	100	S	2	RT
1	4	Zlib006Naive.II	100	S	2	37°C
1	5	Zlib006Naive.II	100	B	2	37°C
1	6	Zlib006Naive.II	100	S	2	RT
1	7	Zlib006Naive.II	100	B	2	RT
2	8	1, 2	50	S	4	37°C
2	9	1, 2	50	B	4	37°C
2	10	1, 2	20	S	6	37°C
2	11	3	50	S	4	RT
2	12	3	50	B	4	RT
2	13	3	20	S	6	RT
2	14	4, 5	50	S	4	37°C
2	15	4, 5	50	B	4	37°C
2	16	4, 5	20	S	6	37°C
2	17	6, 7	50	S	4	RT
2	18	6, 7	50	B	4	RT
2	19	6, 7	20	S	6	RT
3	20	8, 9, 10	20	S	6	37°C
3	21	8, 9, 10	5	S	8	37°C
3	22	11, 12, 13	20	S	6	RT
3	23	11, 12, 13	5	S	8	RT
3	24	9, 12	10	S, P	10	37°C
3	25	9, 12	10	S, P	20	37°C
3	26	9, 12	10	S, P	40	37°C
3	27	14, 15, 16	20	S	6	37°C
3	28	14, 15, 16	5	S	8	37°C
3	29	17, 18, 19	20	S	6	RT
3	30	17, 18, 19	5	S	8	RT
3	31	15, 18	10	S, P	10	37°C

循环	选择轨道	来自一个或多个文库或选择轨道的噬菌体储备液	靶标浓度 (nM)	溶液 (S) 或固相类型的选择: NA 珠 (B), 聚苯乙烯板 (P) 中的 SA	洗涤次数	选择和洗涤期间的温度	
[0310]	3	32	15, 18	10	S, P	20	37°C
	3	33	15, 18	10	S, P	40	37°C
	4	34	20	5	S	8	37°C
	4	35	20	1	S	10	37°C
	4	36	21	1	S	10	37°C
	4	37	21	0.1	S	12	37°C
	4	38	22	5	S	8	RT
	4	39	23	1	S	10	RT
	4	40	27	5	S	8	37°C
	4	41	27	1	S	10	37°C
	4	42	28	1	S	10	37°C
	4	43	28	0.1	S	12	37°C
	4	44	29	5	S	8	RT
	4	45	30	1	S	10	RT

[0311] 噬菌体颗粒的扩增和制备:如下进行不同选择循环之间的噬菌体颗粒的扩增。将大肠杆菌菌株XL1-Blue(安捷伦科技公司(Agilent technologies),目录号200268)用于噬菌体扩增,并且在第一个循环中以100倍过量使用M13K07辅助噬菌体,并且随后的循环中以50倍使用。在37°C下,将XL-1Blue在补充有1%葡萄糖和1 μ g/ml四环素的TSB培养基(胰蛋白酶大豆肉汤,30g/L)中培养至早期对数期,并之后用噬菌体颗粒进行感染。与噬菌体颗粒量相比,使用10-100倍过量的细菌。在37°C下感染30min,之后通过添加补充有1%葡萄糖、1 μ g/mL四环素和200 μ g/mL羧苄青霉素的TSB培养基将培养基体积加倍。在37°C下温育大约1h后,添加辅助噬菌体,并在37°C下温育1.5h。将重复感染的细菌以3500 \times g沉淀,并重悬浮于50mL(第一个循环后100mL)补充有25 μ g/mL卡那霉素和0.1mM IPTG(异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷)的TSB+YE培养基中,并在30°C下温育过夜。将过夜培养物沉淀,并将上清液中的噬菌体颗粒用PEG/NaCl沉淀两次。最后,将噬菌体颗粒重悬浮于选择缓冲液中,然后进入下一个选择循环。在最后的循环中,用洗脱物感染对数期细菌并稀释,然后铺展到补充有0.2g/L氨苄青霉素的TBAB板(30g/L胰蛋白酶血琼脂基质,0xoid)上,以形成用于在ELISA筛选中使用的单菌落。

[0312] 用于ELISA的Z变体的产生:通过将来自选择的单菌落接种到深孔板(Nunc)中补充有100 μ g/mL氨苄青霉素和1mM IPTG的1.2mL TSB-YE培养基中来产生Z变体。将板在37°C下旋转温育22-24h。通过离心使细胞沉淀,重悬浮于用铝箔密封的150 μ L PBST0.05%(补充有0.05%Tween20的PBS)中,并且在82°C的水浴中温育20min。将板快速地减速旋转以除去铝箔上的液滴,并然后使用96孔过滤板(默克密理博公司(Merck Millipore))对热处理的悬浮液进行过滤步骤。最终过滤的具有提取物的可溶部分的上清液(热处理的(HT)裂解液)含有与ABD融合的Z变体,表示为AQHDEALE-[ZTP####]-VDYV-[ABD]-YVPG(SEQ ID NO:1125;

Grönwall等人同上)。ZTP###是指单个序列,58个氨基酸残基,TSLP结合Z变体。

[0313] 测序:所有单独挑选的克隆均经过测序程序。从单个菌落中扩增PCR片段,测序并基本上如WO 2015/189430中所述进行分析。

[0314] Z变体针对TSLP的ELISA筛选:在ELISA测定中,对Z变体与TSLP的结合进行分析。在4℃下,将半面积96孔ELISA板(康宁公司(Corning))用稀释于PBS中的50μL 2μg/mL抗ABD山羊抗体(内部生产)涂覆过夜。将抗体溶液倒出,并在RT下将孔用100μL的PBS(赛默飞世尔科技公司)中的Blocker®酪蛋白封闭1h。弃去封闭溶液,并将50μL HT裂解液(以1:8稀释在PBST0.05%中)添加至孔中,并在RT下温育1h。作为阴性对照,添加仅使用单独的ABD部分制备的HT裂解液。将上清液倒出,并将孔用PBST0.05%洗涤4次。然后,分别向每个孔中添加50μL生物素化的TSLP(以10nM的浓度,稀释于PBS的Blocker®酪蛋白中)。将板在RT下温育2h,然后按以上所述洗涤。将以1:30,000稀释于PBS中Blocker®酪蛋白中的链霉亲和素缀合的HRP(赛默飞世尔科技公司)添加至孔中,并将板温育45min。如上所述洗涤后,将50μL TMB底物(1-步骤Ultra TMB-ELISA Pierce,赛默飞世尔科技公司)添加至孔中,并根据制造商的建议处理板。使用多孔板读取器(EnSpire,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量在450nm处的吸光度。此外,使用以上提及的步骤和试剂对结合物进行ELISA测定,但其中所有步骤在37℃下进行。而且,使用上述方案将结合物的子集进行ELISA测定,但生物素化的TSLP浓度如下:3.3nM、1.7nM或0.37nM。

[0315] 结果

[0316] TSLP结合Z变体的噬菌体展示选择:在三至四个循环的针对生物素化TSLP的噬菌体展示选择后,获得单个克隆。

[0317] 测序:在三个或四个选择循环后,对获得的克隆进行测序。每个变体被赋予一个唯一的识别号###,并且单个变体被称为ZTP###。58个氨基酸残基长的Z变体的氨基酸序列列于序列列表中,为SEQ ID NO:631-644、809-828和846-875。推导的TSLP结合基序在每个序列中从残基8延伸至残基36。预测在这些Z变体的每一个中构成完整三螺旋束的49个氨基酸残基长多肽的氨基酸序列从残基7延伸至残基55。

[0318] Z变体针对TSLP的ELISA筛选:将三个和四个选择循环后获得的克隆在96孔板中制成可溶性粗样品,并在ELISA中筛选TSLP结合活性。结合物示出在10nM TSLP的靶浓度下给出在0.5和3.2AU之间的应答,对应于空白对照的至少3.5倍。在37℃下进行的ELISA给出与在RT下进行的ELISA大致相同的结果。示出以3.3nM、1.7nM或0.37nM的浓度,针对生物素化的TSLP测定的结合物分别给出如下应答:在1.9和3.2AU之间,其中空白对照为0.08AU;在0.3和3.0AU之间,其中空白对照为0.095AU;并且在0.06和1.5AU之间,其中空白对照为0.06AU。

[0319] 实施例2

[0320] TSLP结合Z变体的产生

[0321] 总结

[0322] 该实施例描述了用于亚克隆和产生带His标签的Z变体和与白蛋白结合结构域融合的Z变体的一般程序,这些程序将在随后的表征实验中使用。

[0323] 材料和方法

[0324] 具有His₆标签的Z变体的亚克隆:从Zlib006Naive.II文库载体pAY02592扩增编码

Z变体ZTP632 (SEQ ID NO:632)、ZTP634 (SEQ ID NO:634)、ZTP633 (SEQ ID NO:633)、ZTP635 (SEQ ID NO:635)、ZTP636 (SEQ ID NO:636)和ZTP631 (SEQ ID NO:631)的DNA。从Zlib008Naive.II文库载体pAY04242扩增编码Z变体ZTP637 (SEQ ID NO:637)和ZTP638 (SEQ ID NO:638)的DNA。将用于构建具有N-末端His₆标签的单体Z变体分子的亚克隆策略应用于Zlib006Naive.II文库成员,并且将具有C-末端His₆标签的亚克隆策略应用于Zlib008Naive.II文库,两者均使用标准分子生物学技术,并且基本上如PCT公开WO 2009/077175中所述。将Z基因片段亚克隆到T7启动子驱动的表达载体中,分别产生编码的序列MGSSHHHHHLQ-[ZTP###]-VD (SEQ ID NO:1126)和[ZTP###]-LEHHHHH (SEQ ID NO:1127)。

[0325] 与ABD融合的Z变体的亚克隆:将编码Z变体ZTP631 (SEQ ID NO:631)的基因克隆到定制的质粒中,该质粒是从ATUM (纽瓦克市,加利福尼亚州)订购的。将Z变体克隆为与ABD变体PP013 (SEQ ID NO:1077)的融合蛋白。由表达载体编码的构建体呈[ZTP631]-ASGS-[PP013] (ZTPA092;SEQ ID NO:1064)格式。

[0326] TSLP结合Z变体的表达:Z变体的产生基本按如下方式完成:用含有每个相应TSLP结合Z变体的经序列验证的基因片段的质粒转化大肠杆菌T7E2细胞 (金博瑞公司 (GeneBridges)),并使用EnPresso方案 (Enpresso GmbH)在50mL规模下在37°C下进行培养。为诱导蛋白质表达,在培养8h后将IPTG添加至终浓度为0.5mM,并将温度设置为30°C。诱导后,培养物温育16h,然后通过离心收获细胞。

[0327] 具有His₆标签的TSLP结合Z变体的纯化:将大约1-2g的每种细胞沉淀重悬浮于补充有Benzonase® (默克公司 (Merck))的结合缓冲液 (20mM磷酸钠、0.5M NaCl、20mM咪唑, pH 7.4)。在细胞破裂后,通过离心除去细胞碎片,并将每种上清液施加到1mL His GraviTrap IMAC柱 (通用医疗公司 (GE Healthcare))上。将污染物通过用洗涤缓冲液 (20mM磷酸钠、0.5M NaCl、60mM咪唑、pH 7.4)洗涤来除去,并随后将Z变体用洗脱缓冲液 (20mM磷酸钠、0.5M NaCl、500mM咪唑, pH 7.4)洗脱。通过反相色谱 (RPC),对Z变体进行第二次纯化步骤,对于该纯化,将每个Z变体加载到1mL Resource 15RPC柱 (通用医疗公司)上,用RPC溶剂A (0.1%三氟乙酸 (TFA)、10%乙腈 (ACN)、90%水)进行预平衡。在用RPC溶剂A洗涤柱后,将结合蛋白用18mL的0-60% RPC溶剂B (0.1% TFA、80% ACN、20%水)的线性梯度洗脱。然后使用PD-10脱盐柱,将缓冲液交换为DPBS (康宁公司)。

[0328] 通过在280nm处的吸光度测量确定蛋白质浓度。使用Amicon Ultra-4, Ultracel-3K过滤器 (默克密理博公司),将浓度小于大约1mg/ml的样品进行浓缩。通过用考马斯蓝染色的SDS-PAGE对纯度进行分析,并且使用LC/MS分析确认每种经纯化的Z变体的身份。

[0329] 与ABD融合的TSLP结合Z变体的纯化:将大约5g的细胞沉淀重悬浮于补充有Benzonase® (默克公司)的TST-缓冲液 (25mM Tris-HCl、1mM EDTA、200mM NaCl、0.05% Tween20, pH 8.0)中。在细胞破裂、通过离心澄清和过滤 (0.45μm过滤器)后,将上清液施加到重力流柱上,其中将5mL琼脂糖用抗ABD配体 (内部生产)固定。在用TST缓冲液和5mM NH₄Ac pH 5.5缓冲液洗涤后,将ABD融合的Z变体用0.1M HAc洗脱。然后通过RPC对洗脱物进行第二次纯化步骤。将10% ACN添加至每种洗脱物,然后加载到用溶剂A (10% ACN、0.1% TFA、90% milli-Q超纯水)平衡的3mL Resource RPC柱 (通用医疗公司)上,并使用54mL的0-60%溶剂B (80% ACN、0.1% TFA、20% milli-Q超纯水)的梯度洗脱。通过SDS-PAGE和HPLC-MS分析洗脱的级分并将其合并。使用PD-10脱盐柱,将洗脱物的缓冲液交换为DPBS。如上所

述对具有His₆标签的Z变体进行蛋白质浓度测定以及纯度和身份的分析。

[0330] 结果

[0331] TSLP结合Z变体的产生:成功克隆了具有His₆标签或与ABD融合的TSLP结合Z变体,并在大肠杆菌中表达为可溶性基因产物。每个DNA构建体都通过DNA测序进行验证。每个最终蛋白质制剂的SDS-PAGE分析示出,这些主要含有TSLP结合Z变体。通过HPLC-MS分析确认了每个Z变体的正确身份和分子量。

[0332] 实施例3

[0333] 初级TSLP结合Z变体的表征

[0334] 总结

[0335] 在该实例中,就二级结构、稳定性和结合谱而言,对N-末端带His₆标签的Z变体ZTP632(SEQ ID NO:632)、ZTP634(SEQ ID NO:634)、ZTP633(SEQ ID NO:633)、ZTP635(SEQ ID NO:635)、ZTP636(SEQ ID NO:636)和ZTP631(SEQ ID NO:631);以及C-末端带His₆标签的Z变体ZTP637(SEQ ID NO:637)和ZTP638(SEQ ID NO:638)进行表征。通过圆二色性(CD)光谱学分析熔化温度和二级结构含量。将Biacore用于表征Z变体与TSLP的相互作用。

[0336] 材料和方法

[0337] 圆二色性(CD)光谱学分析:将如实施例2所述产生的His₆-Z和Z-His₆变体在PBS中稀释至0.5mg/mL。在20°C下获得在250-195nm处的CD谱。此外,进行可变温度测量(VTM)以确定熔化温度(T_m)。在VTM中,在温度从20°C升至90°C时(其中温度斜率为5°C/min),在221nm处测量吸光度。在加热程序后,在20°C下获得新的CD谱,以研究Z变体的重新折叠能力。CD测量是在Jasco J-810分光偏振仪(杰斯科斯堪的纳维亚公司(Jasco Scandinavia AB))上,使用具有光程长度为1mm的比色皿进行的。

[0338] Biacore亲和力分析:使用Biacore 8K仪器(思拓凡公司),确定TSLP结合His₆-Z和Z-His₆变体对TSLP的亲和力(K_p)。在实验中,将人TSLP固定在一个CM5芯片表面(思拓凡公司)的羧化葡聚糖层上,直至固定水平约为210-280RU。使用胺偶联化学,根据制造商的方案,并且使用HBS-EP+(思拓凡公司)作为运行缓冲液来进行固定。在分析物注射期间,将一个流动池表面激活和失活以用作空白。在动力学实验中,将HBS-EP+用作运行缓冲液,并且流速为30μL/min。将分析物(即,His₆-Z或Z-His₆变体)分别在HBS-EP+缓冲液中稀释至浓度为100、33和11nM,并注射到流动池。注射分析物浓度2min后,随后为10min的解离时间。通过一次注射再生缓冲液(10mM甘氨酸,pH 1.5,思拓凡公司)使表面再生,并在下一轮注射之前设置10min的等待期。在每个分析物循环之前或接近每个分析物循环时,运行HBS-EP+空白循环,用于背景扣除。使用Biacore 8K评估软件(思拓凡公司)和Langmuir 1:1模型进行靶结合分析。在动力学拟合之前对所有数据应用了双重参考,即减去从空白表面和从空白循环(注射缓冲液而不是分析物)中获得的应答。

[0339] 结果

[0340] CD分析:对于具有His₆标签的八个TSLP结合Z变体确定的CD光谱示出所有的变体在20°C下均具有α-螺旋结构,正如根据在208和222nm处的典型最小值判断。在将加热至90°C之前和之后测量的光谱叠加时,所有Z变体都出现了可逆折叠。将熔化温度(T_m)总结在表3中。His₆-ZTP631和ZTP637-His₆的示例性CD光谱在图1中示出。

[0341] 表3:熔化温度(T_m)

[0342]	Z变体	SEQ ID NO	T _m (°C)
	ZTP631	631	51
	ZTP637	637	69
	ZTP638	638	65
	ZTP632	632	61
	ZTP634	634	58
	ZTP633	633	54
	ZTP635	635	48
	ZTP636	636	65

[0343] **Biacore亲和力分析:**在Biacore 8K仪器中,通过将各种浓度的经纯化的Z变体注射具有固定的TSLP的表面上,对His₆-Z和Z-His₆变体与TSLP的相互作用进行分析。表4给出了基于在TSLP表面上注射的每种TSLP结合物的三种浓度(分别为11、33和100nM)的数据,解离平衡常数(K_d)的总结。图2中展示了对于一个TSLP结合多肽(ZTP631, SEQ ID NO:631)获得的传感图的实例。

[0344] 表4:亲和力常数

[0345]	Z变体	SEQ ID NO	K _d (M)
	ZTP631	631	2.9×10^{-9}
	ZTP637	637	3.0×10^{-9}
	ZTP638	638	3.0×10^{-9}
	ZTP632	632	5.6×10^{-9}
	ZTP634	634	1.5×10^{-9}
	ZTP633	633	2.4×10^{-9}
	ZTP635	635	1.7×10^{-9}
	ZTP636	636	6.0×10^{-9}

[0346] 实施例4

[0347] 体外封闭测定中TSLP结合多肽的表征

[0348] 总结

[0349] 本实施例描述了对所选Z变体在阻断TSLP诱导的胸腺和激活调节的趋化因子(TARC)在人外周血单核细胞(PBMC)中产生的影响方面的能力的评估。

[0350] 材料和方法

[0351] 将100,000个PBMC/孔接种在96孔培养板(格瑞纳生物公司(Greiner Bio One))的测定培养基[RPMI 1640(Gibco)、5%人血清(BIOIVT)和1% Pen-Strep(龙沙公司(Lonza))]中。在向细胞中添加之前,在RT下,将连续滴定的带His标签的Z变体(在细胞测定板中,以10至0.0002 μ M终浓度的七个步骤中,在测定培养基中进行稀释)和TSLP(细胞测定板中1ng/mL终浓度)预温育1h。将具有添加试剂的细胞在37°C下于CO₂培养箱中温育24h。通过从每个孔中转移120 μ L上清液至V型底稀释板(格瑞纳生物公司),以400 \times g离心5min。之后将2 \times 60 μ L转移至两个一式两份的U型底板(格瑞纳生物公司),并将这些板密封并储存在-80°C下直至进一步分析。使用人CCL17/TARC-DuoSet®ELISA(R&D系统公司,目录号DY364)测量TARC水平。基本上如制造商所述进行ELISA,但存在以下的例外:a)使用半面积

ELISA板;b)使用所述体积的一半;和c)在175 μ L洗涤缓冲液中将这些板洗涤4次。使用EnSpire板读取器,测量在450nm处的吸光度。

[0352] 结果

[0353] Z变体ZTP631(SEQ ID NO:631)、ZTP632(SEQ ID NO:632)、ZTP633(SEQ ID NO:633)、ZTP634(SEQ ID NO:634)、ZTP635(SEQ ID NO:635)、ZTP636(SEQ ID NO:636)、ZTP673(SEQ ID NO:637)和ZTP638(SEQ ID NO:638)示出以浓度依赖性方式阻断人PBMC中TSLP诱导的TARC产生(图3)。

[0354] 实施例5

[0355] TSLP结合Z变体的成熟文库的设计和构建

[0356] 总结

[0357] 在该实施例中,基于实施例2、3和4中所述的TSLP结合变体,设计新文库。成熟文库含有大约 5.9×10^9 个单个克隆。

[0358] 材料和方法

[0359] 亲和力成熟TSLP文库的设计:基于如实施例1-4中所述选择、生产和表征的TSLP结合Z变体的序列设计了新的文库。根据主要基于SEQ ID NO:631-644、809-828和846-875中定义的Z变体的结合基序的策略,Z分子支架中13个表面暴露的位置偏向某些氨基酸残基。新文库的设计在表5中示出,其中指示了13个随机位置的每个位置中使用的氨基酸百分比。

[0360] 表5:TSLP成熟文库的设计

[0361]

		BM 中的位置												
		2	3	4	6	7	10	11	17	18	20	21	25	28
氨基酸		全长 Z 变体中的位置												
		9	10	11	13	14	17	18	24	25	27	28	32	35
A	Ala	100	0	0	0	16.7	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
C	Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0362]	D Asp	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	E Glu	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	F Phe	0	0	0	0	16.7	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	G Gly	0	0	0	0	0	0	0	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	H His	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	I Ile	0	0	0	0	16.7	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	K Lys	0	0	0	0	0	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	L Leu	0	0	0	100	16.7	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	M Met	0	0	0	0	16.7	0	0	0	5.6	0	5.6	5.6	0
	N Asn	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	P Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Q Gln	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	R Arg	0	0	0	0	0	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	100
	S Ser	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	T Thr	0	0	14.3	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	V Val	0	100	0	0	16.7	0	6.3	5.9	5.6	0	5.6	5.6	0
	W Trp	0	0	0	0	0	100	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0
	Y Tyr	0	0	0	0	0	0	6.3	5.9	5.6	14.3	5.6	5.6	0

[0363] 使用TRIM技术生成了具有互补的3' -末端的两个寡核苷酸,一个正向互补和一个反向互补。这些寡核苷酸是从艾拉生物技术有限公司 (Ella Biotech GmbH) (德国马丁斯里德) 订购的。

[0364] 文库的构建基本上如早期所述在标记为pAY02592的载体中进行(例如,PCT公开W0 2017/072280),但存在以下例外。使用大约230ng/电穿孔转化到电感受态XL-1Blue细胞中。在电穿孔后将细胞汇集,在37°C下于恢复培养基(鲁西根公司(Lucigen))中温育60min,之后在补充有10µg/mL四环素和100µg/mL羧苄青霉素的3L培养基TSB-YE培养基中进行培养。基本上如W0 2009/077175中所述,通过测序对文库质量和氨基酸的分布进行验证。

[0365] **噬菌体储备液的制备:**将来自含有噬菌粒文库的甘油储备液的细胞接种到2L补充有100µg/mL羧苄青霉素、10µg/mL四环素和1%葡萄糖的TSB中,并且以80rpm且在37°C下进行培养。当培养物达到600nm (OD₆₀₀) 处光密度为0.7时,使用50倍摩尔过量的M13K07辅助噬菌体感染该培养物,并将细胞在37°C下温育1.5h。将细胞沉淀并重悬浮于2L补充有100µg/mL羧苄青霉素、25µg/mL卡那霉素和0.1mM IPTG的TSB+YE中。将培养物在30°C下且以70rpm温育,并在21h后收获。通过离心(10,700×g,30min,在4°C下)除去培养物中的细胞。使用PEG/NaCl,将噬菌体颗粒从上清液沉淀两次,并如实施例1中所述进行过滤,并最终溶解于PBSB和甘油中。将噬菌体储备液储存在-80°C下直至在选择中使用。

[0366] 结果

[0367] **文库构建:**新文库是基于实施例1-4中所述的TSLP结合变体集设计的。所设计的文库的理论大小为 4.7×10^8 个Z变体。在通过转化为大肠杆菌后,通过滴定确定文库的实际大小。XL-1Blue细胞为 5.9×10^9 个转化子。通过对96个转化子进行测序并通过将其实际序列与理论设计进行比较来测试文库质量。对单个文库成员的序列分析验证了密码子的分布符合理论设计。文库被命名为Zlib006TSLP.I。

[0368] 实施例6

[0369] 亲和力成熟的TSLP结合Z变体的选择和筛选

[0370] 总结

[0371] 在本实施例中,使用Z变体的TSLP成熟噬菌体文库,将TSLP用作噬菌体展示选择中的靶标。对所选克隆进行DNA测序,在大肠杆菌周质部分中产生,并在ELISA和Biacore中针对不同的靶蛋白进行测定。

[0372] 材料和方法

[0373] 蛋白质的生物素化:如实施例1中所述,使用No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-生物素将人TSLP生物素化。

[0374] TSLP结合Z变体的噬菌体展示选择:使用新产生的成熟文库的噬菌体储备液进行噬菌体展示选择。针对生物素化的TSLP的选择在所有轨道的溶液中进行,并且基本上如实施例1中所述,但具体条件如表6所述。

[0375] 使用在循环1、3和4中作为固相的经链霉亲和素涂覆的珠(Sera-Mag SpeedBeads 链霉亲和素-涂覆的磁性颗粒,思拓凡公司),同时在循环2中使用中性抗生物素蛋白珠,进行洗涤。在一些轨道中,通过在96孔高结合聚苯乙烯板(Corning)的孔中捕获靶-噬菌体颗粒复合物来进行洗涤步骤,该板涂覆有在碳酸盐缓冲液中稀释至5mg/mL的SA蛋白(密理博公司(Millipore))。在过夜进行的洗涤中,在洗涤缓冲液中添加非生物素化的TSLP。在37°C下或在RT下,并且使用预封闭的管(Protein LowBind,艾本德公司(Eppendorf))进行选择。为了降低非特异性结合的程度,使用在特定循环和轨道中使用的相应固相在循环1-3中进行预选择。此外,在一些轨道中,将噬菌体储备液在70°C下预热15min,随后在离心机中以13,000rpm减速旋转,然后用于选择。

[0376] 随着选择的进行,根据靶标浓度和洗涤次数和/或洗涤时间进一步划分轨道。

[0377] 表6:使用成熟文库针对TSLP进行选择的综述

循环	选择轨道	来自文库或选择轨道的噬菌体储备液	预热的噬菌体储备液	靶标浓度 (nM)	短洗涤 (1 min) 的次数	长洗涤 (30 min) 的次数	过夜洗涤 (17.5 h) 的次数	选择和洗涤期间的温度
1	1	Zlib006TSLP.I		50	3			37°C
1	2	Zlib006TSLP.I	是	50	3			37°C
1	3	Zlib006TSLP.I		50	3			RT
2	4	1		25	6			37°C
2	5	1		10	10			37°C
2	6	2	是	25	6			37°C
2	7	2	是	10	10			37°C
2	8	3		25	6			RT
3	9	4		10	10	1		37°C
3	10	5		1	16	4		37°C
3	11	6	是	10	10	1		37°C
3	12	7	是	1	16	4		37°C
3	13	8		10	10	1		RT
4	14	9		2	16	1		37°C
4	15	10		0.25	24	1		37°C
4	16	9 + 10		0.25	32	4	1	37°C
4	17	11	是	2	16	1		37°C
4	18	12	是	0.25	24	1		37°C
4	19	11 + 12	是	0.25	32	4	1	37°C
4	20	9 - 13		0.25	32	4	1	37°C
4	21	9 - 13		0.25	32	4	1	RT
4	22	13		1	24	4		RT
3	23	4 - 8		10	45	1		37°C
1	24	Zlib006TSLP.I		10	45	1		37°C

[0379] 噬菌体颗粒的扩增和制备:基本上如实施例1中所述,进行噬菌体储备液制备和选择循环之间的噬菌体扩增。在最后的循环中,用洗脱物感染对数期细菌,并铺展到补充有0.2g/L氨苄青霉素的TBAB板上,以形成用于在ELISA筛选中使用的单菌落。

[0380] 用于ELISA的Z变体的产生:产生Z变体,并如实施例1中所述制备每个单个变体的HT裂解液。最终过滤的具有提取物的可溶部分的上清液含有与ABD融合的Z变体,表示为AQHDEALE-[ZTP###]-VDYV-[ABD]-YVPG (SEQ ID NO:1125;Grönwall等人同上)。ZTP###是指单个,58个氨基酸残基Z变体。

[0381] Z变体的ELISA筛选:在一组ELISA测定中,对Z变体与TSLP的结合进行分析。分别针对浓度为1、0.2、0.04和0nM的生物素化的TSLP对每个Z变体进行分析。除了使用高结合384孔板(格瑞纳生物公司),基本上如实施例1所述进行ELISA。此外,对所选的结合物的子集进行ELISA,其中使用0.2nM的靶浓度。将所有样品一式三份运行。此外,对又一个所选的结合物子集进行ELISA,使用0.2nM的靶浓度,并且其中将所有样品一式三份运行。作为阴性对照,在所有板上使用含有融合蛋白ABD但不含Z融合配偶体(即AQHDEALEVDYV-[ABD]-YVPG (SEQ ID NO:1128))的HT裂解液。使用多孔板读取器(EnSpire(珀金埃尔默公司))测量在450nm处的吸光度。

[0382] 测序:在ELISA筛选的同时,对所有克隆进行测序。从单个菌落中扩增PCR片段,并实施例1所述进行测序和分析。

[0383] 结果

[0384] TSLP结合Z变体的噬菌体展示选择:在一至四个循环的针对生物素化TSLP的噬菌体展示选择后,获得单个克隆。

[0385] Z变体的ELISA筛选:在一至四个选择循环后获得的克隆在96孔板中产生,并针对TSLP筛选结合活性。在第一次ELISA中,所有克隆分别针对浓度为1、0.2、0.04和0nM的TSLP运行。在随后的两次ELISA测定中,将针对0.2nM TSLP的结合物子集一式三份进行测定。如果第一组中的应答在0.2nM TSLP(高于0.26AU)时为背景应答的3倍,还有在另一个浓度下有可靠的靶标依赖性应答,或如果在后两种ELISA中的任一种中平均应答为背景应答的3倍(分别高于0.195AU或0.293AU),则认为结合物为阳性。

[0386] 测序:在一个至四个选择循环后,对获得的克隆进行测序。每个变体被赋予一个唯一的识别号###,并且单个变体被称为ZTP###。58个氨基酸残基长的Z变体的氨基酸序列列于序列列表中,为SEQ ID NO:1-630、646-808和829-845。推导的TSLP结合基序在每个序列中从残基8延伸至残基36。预测在这些Z变体的每一个中构成完整三螺旋束的49个氨基酸残基长多肽的氨基酸序列从残基7延伸至残基55。

[0387] 实施例7

[0388] 成熟的TSLP结合Z变体的产生和表征

[0389] 总结

[0390] 本实施例描述了成熟的Z变体的克隆、产生和表征。将CD光谱学用于确定熔化温度并评估二级结构含量。将SPR用于确定靶结合亲和力和动力学值以及分析与来自不同物种的TSLP的结合。在点印迹测定中分析特异性以评估与所选高丰度血浆蛋白或其他相关或不相关蛋白的任何潜在的脱靶结合。TSLP是细胞因子的白介素2(IL-2)家族的成员,该家族还包括IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21。IL-2细胞因子家族的每个成员由四个 α 螺旋束组成,并共享共同的细胞因子受体 γ 链。然而,氨基酸序列相似性较低,但为了确认此处所选的Z变体对TSLP的特异性,IL-2细胞因子家族中的所有细胞因子都包括在点印迹测定中。此外,不相关的IL-17A细胞因子也包括在特异性测定中。

[0391] 材料和方法

[0392] 与ABD融合的Z变体的亚克隆:基于ELISA测定中的评分选择的克隆子集从特威斯特生物科学公司(Twist Biosciences)(旧金山,加利福尼亚州)订购,作为定制载体中的克隆基因。在从特威斯特生物科学公司订购的基因中,分别将Z变体的位置1和2(最初分别为V和D)中的N-末端氨基酸突变为氨基酸残基A和E(SEQ ID NO:876-966)。然后,这些Z变体中的一组在支架位置发生进一步突变,如下所示:Y5F、N52S和D53E(SEQ ID NO 967-972)。将合成的Z变体亚克隆到含有ABD变体PP013(SEQ ID NO:1077)的表达载体中。由表达载体编码的构建体呈[ZTP###]-ASGS-[PP013]格式,并表示为ZTPA###(SEQ ID NO:973-1070)。此外,两个Z变体ZTP970(SEQ ID NO:970)和ZTP876(SEQ ID NO:876)亚克隆为具有一组不同的接头的与ABD的融合物。根据实施例2中所描述的方法制备构建体,并且呈以下格式:[ZTP970]-A(EAAAK)₂-AGS-[PP013](ZTPA099;SEQ ID NO:1071)、[ZTP970]-A(EAAAK)₄-AGS-[PP013](ZTPA100;SEQ ID NO:1072)、[ZTP970]-(KEAAA)₂-KAK-[PP013](ZTPA101;SEQ ID

NO:1073)、[ZTP970]-(KEAAA)₂-[PP013](ZTPA102;SEQ ID NO:1074)、[ZTP970]-(GGGGS)₃-GS-[PP013](ZTPA103;SEQ ID NO:1075)和GS-[PP013]-GGGGS-[ZTP876](ZTPA104;SEQ ID NO:1076)。一个Z变体(SEQ ID NO:645)是与PP013融合产生的,呈[ZTP645]-ASGS-[PP013]格式(ZTPA105;SEQ ID NO:1129)。

[0393] 与His₆融合的Z变体的亚克隆:根据实施例2中描述的方法,用His₆标签亚克隆Z变体的子集。克隆的变体呈[ZTP####]-LEHHHHHH(SEQ ID NO:1127)格式。

[0394] TSLP结合Z变体的表达:TSLP结合Z变体的表达如实施例2中所述进行,或以24孔板格式以较小规模进行。24孔格式的生产遵循与实施例2中所述相同的程序,除了使用3mL培养体积并在添加IPTG后将温度保持在37℃。

[0395] 在96孔板格式中与ABD融合的TSLP结合Z变体的纯化:将大约0.1mg细胞沉淀重悬浮于含有3mM EDTA的TST缓冲液中,通过90℃热处理和随后的DENARASE®(c-LEcta)(在5mM MgSO₄中)处理来破坏细胞,随后离心,并最终通过3.0/0.2μm过滤器(颇尔公司(Pa11))过滤。将澄清的裂解物冷冻保存,并且当解冻后通过0.45μm过滤板(AcroPrep),然后施加到预先装有100μL抗ABD配体(内部生产)的1mL过滤板(1.2μm,Acroprep)上。在用TST缓冲液和5mM NH₄Ac pH 5.5缓冲液洗涤后,将ABD融合的Z变体用0.1M HAc洗脱。使用离心力进行所有的洗涤和洗脱步骤。使用PD MultiTrap G-25脱盐板(思拓凡公司),进行缓冲液交换为DPBS。

[0396] 通过在280nm处的吸光度测量确定蛋白质浓度。使用LC/MS分析,确认每种经纯化的Z变体的身份。

[0397] 与ABD融合的TSLP结合Z变体的纯化:将约4g细胞沉淀重悬浮于补充有DENARASE®(c-Lecta)的TST缓冲液中。在细胞破裂、通过离心澄清和过滤(0.45μm过滤器)后,将上清液施加到重力流柱上,其中将2×1mL琼脂糖用抗ABD配体(内部生产)固定。在用TST缓冲液和5mM NH₄Ac pH 5.5缓冲液洗涤后,将ABD融合的Z变体用0.1M HAc洗脱。然后通过RPC对洗脱物进行第二次纯化步骤。将10% ACN添加至每种洗脱物,然后加载到用溶剂A(10% ACN、0.1% TFA、90% milli-Q超纯水)平衡的1mL Resource RPC柱(思拓凡公司)上,并使用18mL的0-60%溶剂B(80% ACN、0.1% TFA、20% milli-Q超纯水)的梯度洗脱。通过SDS-PAGE和HPLC-MS分析洗脱的级分并将其合并。使用PD-10脱盐柱(思拓凡公司),将洗脱物的缓冲液交换为DPBS。

[0398] 通过在280nm处的吸光度测量确定蛋白质浓度。使用Amicon Ultra-4,Ultracel-3K(默克密理博公司),将浓度小于大约1mg/mL的样品进行浓缩。通过用考马斯蓝染色的SDS-PAGE对纯度进行分析,并且使用LC/MS分析确认每种经纯化的Z变体的身份。

[0399] 与His₆融合的TSLP结合Z变体的纯化:使用如实施例2所述的IMAC策略纯化克隆为与C-末端His₆的融合物的Z变体。

[0400] CD分析:基本上如实施例3所述,将克隆为Z-His₆的Z变体的子集进行CD分析。

[0401] Biacore动力学筛选:使用Biacore 8K仪器,确定了在本实施例中使用的96孔策略产生的Z-ABD变体,以及在实施例2中产生的Z-ABD变体ZTPA092(SEQ ID NO:1064),与TSLP结合的亲和力和动力学值。如实施例3中所述,将TSLP固定在CM5芯片的表面上,给出固定水平约为510-550RU。将单循环动力学(SCK)方法(一个循环中一系列分析物注射,其中循环之间没有再生)用于注射相应Z-ABD变体。在每个分析物循环之前,运行HBS-EP+空白循环,用于

背景扣除。分别以3.3、10、30和90nM将Z变体注射到用固定有TSLP的传感器芯片表面。将四种浓度的分析物分别注射240s后,接着是15min的解离时间。流速为30 μ L/min,并将HBS-EP+用作运行缓冲液。通过三次注射再生缓冲液(10mM甘氨酸,pH 1.5)来再生表面,接着是等待期,然后是下一轮注射。将获得的传感图减去参考,并用Biacore Insight Evaluation软件使用Langmuir 1:1结合模型进行分析以确定动力学常数;缔合速率常数(k_{on})、解离速率常数(k_{off})和解离平衡常数(K_D)。

[0402] 针对来自不同物种的TSLP进行Biacore动力学分析:使用Biacore 8K仪器,确定了Z-ABD变体ZTPA002 (SEQ ID NO:974)、ZTPA001 (SEQ ID NO:973)和ZTPA093 (SEQ ID NO:1065)与来自以下不同的物种的一组TSLP的亲合力和动力学值:食蟹猴(cynoTSLP,义翘神州公司,目录号90911-C08H)、大鼠(rTSLP,美博斯公司(MyBiosource),目录号MBS2010776)和小鼠(mTSLP,R&D系统公司,目录号555-TS-010/CF)。使用胺偶联试剂盒2型(思拓凡公司),将10mM乙酸钠(pH 4.5)作为固定缓冲液,并且将HBS-EP+作为运行缓冲液,均根据制造商的说明书,将HSA在固定缓冲液中稀释至10 μ g/mL,并通过胺化学固定在CM5传感器芯片上。将每个通道的两个流动池均(按顺序)固定化为约6500RU。

[0403] 将具有配体捕获的多循环动力学(MCK)用于评估结合特性。通过以5 μ L/min注射20nM持续150s,将Z变体在流动池2中捕获在固定化HSA上(捕获应答约为50-100RU),随后在流动池1和2中以4nM、16nM和64nM的浓度系列注射分析物。在HBS-EP+运行缓冲液中评估结合相互作用。缔合时间为180s(30 μ L/min),并且解离时间为460s(30 μ L/min)。在分析之前,从传感图中减去参比池(流动池1)和空白循环注射(HBS-EP+)。再生缓冲液为10mM HCl(两个脉冲,30s/30 μ L/min)。

[0404] 点印迹分析:评估了Z-ABD变体ZTPA104 (SEQ ID NO:1076)和ZTPA001 (SEQ ID NO:973)与呈两种不同形式的全长人TSLP:hTSLP未切割的(阿克罗生物系统公司(Acro Biosystems),目录号TSP-H52Ha)和hTSLP切割的(阿克罗生物系统公司,目录号TSP-H52Hb)以及与短形式的TSLP(sfTSLP;SEQ ID NO:1080;在奥马克公司(Almac),英国克雷加文合成)的结合。另外,针对一组不同的高丰度血浆蛋白来测定Z变体:HSA(Recombunin Elite,奥博迪克公司(Albumedix),目录号205-005);人IgG(西格玛公司(Sigma),目录号G4386); α -2-巨球蛋白(人A2M,义翘神州公司(Sino Biological),目录号10952-H08B); α 1-抗胰蛋白酶(SERPINA1 Human,普罗派克公司(ProSpec),目录号PR0-529);补体组分3c(C3c,拜力生物公司(Lee Biosolutions),目录号194-32);结合球蛋白(普罗派克公司(ProSpec),目录号PR0-567); α 1-抗胰凝乳蛋白酶(SERPINA3,菲拉德/肯恩技术公司(Fitzgerald/Kem-En-Tech),目录号30-AC47);C4补体(补体技术公司(Complement Technology),目录号A105);IgE(菲拉德/肯恩技术公司(Fitzgerald/Kem-En-Tech),目录号31-A101);血红素结合蛋白(人HPX,义翘神州公司,目录号10870-H08H);甲状腺素转运蛋白(TTR,义翘神州公司,目录号12091-H08H);IgG Fc片段(杰克逊免疫学研究所/北欧生物站点(Jackson ImmunoResearch/Nordic BioSite),目录号009-060-008);人全铁转铁蛋白(西格玛公司,目录号T4132);纤维蛋白原(阿博卡单抗公司(Abcam),目录号81752);IgA(贝西尔实验室/北欧生物站点(Bethyl Laboratories/Nordic Biosite),目录号P80-102);IgM(西格玛公司,目录号I8260);结构上与IL-2相关的细胞因子家族:(IL-2,派普泰克公司(Peprotech),目录号200-02);IL-4(R&D系统公司,目录号6507-IL/CF);IL-7(通过研究合

作获得); IL-9 (R&D系统公司, 目录号209-ILB-010/CF); IL-15 (派普泰克公司, 目录号200-15); 和IL-21 (R&D系统公司, 目录号8879-IL-010/CF), 以及不相关的IL-3 (R&D系统公司, 目录号203-IL-010/CF)、IL-5 (R&D系统公司, 目录号205-IL-025/CF) 和IL-17A (派普泰克公司, 目录号200-17)。将硝酸纤维素膜分成三个区域, 由此将蛋白质应用于膜上以在膜上形成相同的部分。将1 μ L每种蛋白质 (0.1mg/mL) 固定在每个部分的预定位置处。在RT下, 用Blocker[®]酪蛋白将膜封闭2h。去除封闭溶液, 并将膜切成三个相同的条带。将每个条带在RT下与2 μ g/mL的两种不同TSLP结合Z变体ZTPA104 (SEQ ID NO:1076) 和ZTPA001 (SEQ ID NO:973) 中的一种, 或作为对照多肽包括的IL-17A结合Z变体 (均稀释于Blocker[®]酪蛋白); 或仅Blocker[®]酪蛋白 (阴性对照) 温育1h, 并然后在PBST中洗涤4 \times 2min。通过以下方法检测结合的Z变体: 首先添加5 μ g/mL山羊抗Z变体Ig抗体 (内部生产), 在RT下1h, 并然后在PBST中洗涤4 \times 2min。然后, 添加1:10000稀释的抗山羊抗体-HRP缀合物 (DAKO, 目录号P0449), 并在RT下温育1.5h, 并在PBST中洗涤5 \times 5min。在Blocker[®]酪蛋白中进行所有稀释, 并且用轻柔摇动的方式实施所有温育和洗涤步骤。通过添加大约5mL SuperSignal[™]West Pico PLUS (赛默飞世尔科技公司) 开发信号, 随后温育5min。使用发光图像分析仪 (Luminescent Image Analyzer) (富士胶卷公司 (Fuji Film), 富士胶卷) 检测所得化学发光, 并在曝光20s后拍摄照片。

[0405] 此外, 将相同的方案用于进行如上所述的另一项测定, 但在存在HSA的情况下并针对源自人血浆或血清的蛋白质子集: IgG、补体组分3c (C3c)、 α 1-抗胰凝乳蛋白酶、C4补体、IgE、来自IgG的Fc片段、全铁转铁蛋白、纤维蛋白原、IgA和IgM; 以及针对HSA、sfTSLP、全长TSLP未切割的和全长TSLP切割的。将Z变体ZTPA104 (SEQ ID NO:1076) 稀释于补充有10倍摩尔过量的HSA的Blocker[®]酪蛋白中, 并在RT下温育30min, 然后针对硝酸纤维素膜上的蛋白质进行测定。

[0406] 结果

[0407] TSLP结合Z变体的产生: 与ABD融合的TSLP结合Z变体在大肠杆菌中表达为可溶性基因产物。每个最终蛋白质制剂的SDS-PAGE分析示出, 这些主要含有TSLP结合Z变体。通过HPLC-MS分析确认了每个Z变体的正确身份和分子量。

[0408] CD分析: 对于具有C-末端His₆标签的TSLP结合Z变体确定的CD光谱示出所有的变体在20 $^{\circ}$ C下均具有 α -螺旋结构, 正如根据在208和222nm处的典型最小值判断。在将加热至90 $^{\circ}$ C之前和之后测量的光谱叠加时, 所有Z变体都出现了可逆折叠。将熔化温度 (T_m) 总结在表7中。对于Z变体ZTP876和ZTP967, 示例性CD光谱在图4中示出。

[0409] 表7: 熔化温度 (T_m)

Z 变体	SEQ ID NO	Tm (°C)
ZTP878	878	49
ZTP879	879	57
ZTP880	880	52
ZTP881	881	71
ZTP882	882	52
ZTP883	883	52
ZTP884	884	52
ZTP885	885	60
ZTP886	886	68
ZTP887	887	52
ZTP888	888	55
ZTP889	889	57
[0410] ZTP890	890	66
ZTP891	891	57
ZTP892	892	55
ZTP893	893	57
ZTP894	894	52
ZTP895	895	52
ZTP896	896	55
ZTP877	877	70
ZTP876	876	74
ZTP897	897	52
ZTP898	898	52
ZTP899	899	52
ZTP900	900	46
ZTP901	901	55
ZTP967	967	72

[0411] Biacore动力学筛选: 将与ABD融合的相应Z变体以不同浓度注射到具有固定的TSLP的表面上, 并分析它们的结合。表8中呈现了经计算的动力学参数的总结。对于Z-ABD变体ZTPA028、ZTPA029和ZTPA030, 在图5中示出了示例性传感图。

[0412] 表8: 与TSLP结合的Z变体的动力学常数

[0413]

Z 变体	SEQ ID NO	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (M)
ZTPA092	1064	4.8×10^5	1.6×10^{-3}	3.2×10^{-9}
ZTPA028	1000	3.8×10^5	1.5×10^{-3}	4.1×10^{-9}
ZTPA029	1001	3.3×10^5	1.5×10^{-3}	4.6×10^{-9}
ZTPA030	1002	5.8×10^5	1.5×10^{-3}	2.6×10^{-9}
ZTPA054	1026	5.9×10^5	1.8×10^{-3}	3.1×10^{-9}
ZTPA003	975	3.7×10^5	1.6×10^{-3}	4.4×10^{-9}
ZTPA055	1027	5.7×10^5	1.7×10^{-3}	2.9×10^{-9}
ZTPA056	1028	3.7×10^5	1.2×10^{-3}	3.4×10^{-9}
ZTPA057	1029	4.6×10^5	1.2×10^{-3}	2.6×10^{-9}
ZTPA058	1030	4.6×10^5	9.1×10^{-4}	2.0×10^{-9}
ZTPA059	1031	3.0×10^5	8.0×10^{-4}	2.7×10^{-9}
ZTPA060	1032	1.1×10^5	3.4×10^{-4}	2.9×10^{-9}
ZTPA061	1033	3.2×10^5	9.3×10^{-4}	2.9×10^{-9}
ZTPA062	1034	5.4×10^5	1.2×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA004	976	3.1×10^5	1.2×10^{-3}	3.9×10^{-9}
ZTPA031	1003	3.2×10^5	9.8×10^{-4}	3.0×10^{-9}
ZTPA063	1035	5.1×10^5	1.2×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA032	1004	6.2×10^5	1.5×10^{-3}	2.5×10^{-9}
ZTPA033	1005	3.2×10^5	7.1×10^{-4}	2.2×10^{-9}
ZTPA005	977	3.5×10^5	1.4×10^{-3}	4.0×10^{-9}
ZTPA006	978	1.5×10^5	3.6×10^{-4}	2.4×10^{-9}
ZTPA034	1006	3.4×10^5	1.3×10^{-3}	3.7×10^{-9}
ZTPA007	979	4.1×10^5	2.0×10^{-3}	4.8×10^{-9}
ZTPA035	1007	3.2×10^5	1.5×10^{-3}	4.7×10^{-9}
ZTPA008	980	3.4×10^5	1.6×10^{-3}	4.8×10^{-9}
ZTPA036	1008	4.6×10^5	1.2×10^{-3}	2.6×10^{-9}
ZTPA009	981	3.1×10^5	1.5×10^{-3}	4.7×10^{-9}
ZTPA010	982	6.2×10^5	1.1×10^{-3}	1.8×10^{-9}
ZTPA011	983	1.1×10^5	3.6×10^{-4}	3.1×10^{-9}
ZTPA012	984	3.3×10^5	1.4×10^{-3}	4.2×10^{-9}
ZTPA037	1009	3.1×10^5	6.9×10^{-4}	2.3×10^{-9}
ZTPA038	1010	4.1×10^5	9.1×10^{-4}	2.2×10^{-9}
ZTPA013	985	4.7×10^5	1.1×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA014	986	5.4×10^5	1.6×10^{-3}	2.9×10^{-9}
ZTPA015	987	1.3×10^5	3.4×10^{-4}	2.6×10^{-9}
ZTPA016	988	7.0×10^5	1.5×10^{-3}	2.1×10^{-9}

[0414]

ZTPA039	1011	2.7×10^5	7.2×10^{-4}	2.7×10^{-9}
ZTPA017	989	4.7×10^5	2.2×10^{-3}	4.7×10^{-9}
ZTPA018	990	3.4×10^5	1.1×10^{-3}	3.2×10^{-9}
ZTPA040	1012	5.5×10^5	1.4×10^{-3}	2.5×10^{-9}
ZTPA041	1013	3.9×10^5	1.1×10^{-3}	2.8×10^{-9}
ZTPA019	991	4.3×10^5	2.3×10^{-3}	5.4×10^{-9}
ZTPA020	992	3.0×10^5	1.4×10^{-3}	4.6×10^{-9}
ZTPA021	993	3.7×10^5	8.1×10^{-4}	2.2×10^{-9}
ZTPA042	1014	5.6×10^5	2.5×10^{-3}	4.5×10^{-9}
ZTPA043	1015	4.4×10^5	1.1×10^{-3}	2.5×10^{-9}
ZTPA002	974	1.5×10^5	4.0×10^{-4}	2.7×10^{-9}
ZTPA044	1016	5.8×10^5	1.3×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA045	1017	3.2×10^5	8.9×10^{-4}	2.7×10^{-9}
ZTPA046	1018	3.0×10^5	1.7×10^{-3}	5.7×10^{-9}
ZTPA064	1036	4.2×10^5	9.7×10^{-4}	2.3×10^{-9}
ZTPA065	1037	3.0×10^5	9.4×10^{-4}	3.1×10^{-9}
ZTPA001	973	1.1×10^5	3.6×10^{-4}	3.4×10^{-9}
ZTPA047	1019	3.2×10^5	1.1×10^{-3}	3.3×10^{-9}
ZTPA066	1038	3.8×10^5	1.0×10^{-3}	2.8×10^{-9}
ZTPA048	1020	4.6×10^5	1.5×10^{-3}	3.2×10^{-9}
ZTPA049	1021	1.0×10^5	4.0×10^{-4}	4.0×10^{-9}
ZTPA050	1022	2.7×10^5	9.7×10^{-4}	3.6×10^{-9}
ZTPA022	994	2.6×10^5	1.2×10^{-3}	4.5×10^{-9}
ZTPA051	1023	4.5×10^5	9.9×10^{-4}	2.2×10^{-9}
ZTPA052	1024	3.5×10^5	1.6×10^{-3}	4.7×10^{-9}
ZTPA027	999	1.0×10^5	3.3×10^{-4}	3.3×10^{-9}
ZTPA067	1039	7.1×10^5	3.3×10^{-3}	4.6×10^{-9}
ZTPA053	1025	4.2×10^5	1.3×10^{-3}	3.2×10^{-9}
ZTPA068	1040	3.7×10^5	1.3×10^{-3}	3.5×10^{-9}
ZTPA069	1041	4.7×10^5	1.5×10^{-3}	3.2×10^{-9}
ZTPA070	1042	6.8×10^5	1.5×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA071	1043	5.9×10^5	1.6×10^{-3}	2.8×10^{-9}
ZTPA072	1044	5.4×10^5	1.2×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA073	1045	3.0×10^5	2.6×10^{-3}	8.7×10^{-9}
ZTPA074	1046	5.5×10^5	1.3×10^{-3}	2.3×10^{-9}
ZTPA075	1047	5.8×10^5	1.4×10^{-3}	2.4×10^{-9}
ZTPA023	995	5.2×10^5	2.0×10^{-3}	3.8×10^{-9}
ZTPA076	1048	2.4×10^5	7.4×10^{-4}	3.1×10^{-9}

[0415]	ZTPA077	1049	4.6×10^5	9.8×10^{-4}	2.1×10^{-9}
	ZTPA078	1050	3.4×10^5	1.1×10^{-3}	3.3×10^{-9}
	ZTPA024	996	5.1×10^5	1.3×10^{-3}	2.6×10^{-9}
	ZTPA025	997	5.7×10^5	1.9×10^{-3}	3.3×10^{-9}
	ZTPA079	1051	3.1×10^5	5.7×10^{-4}	1.8×10^{-9}
	ZTPA080	1052	3.6×10^5	1.3×10^{-3}	3.6×10^{-9}
	ZTPA081	1053	5.0×10^5	1.3×10^{-3}	2.6×10^{-9}
	ZTPA082	1054	1.9×10^5	1.2×10^{-3}	5.9×10^{-9}
	ZTPA083	1055	4.2×10^5	1.4×10^{-3}	3.3×10^{-9}
	ZTPA084	1056	5.0×10^5	1.2×10^{-3}	2.5×10^{-9}
	ZTPA085	1057	3.6×10^5	1.3×10^{-3}	3.5×10^{-9}
	ZTPA086	1058	2.5×10^5	1.1×10^{-3}	4.3×10^{-9}
	ZTPA087	1059	2.8×10^5	1.2×10^{-3}	4.2×10^{-9}
	ZTPA026	998	3.9×10^5	1.3×10^{-3}	3.4×10^{-9}
	ZTPA088	1060	4.1×10^5	2.2×10^{-3}	5.4×10^{-9}
	ZTPA089	1061	3.7×10^5	8.6×10^{-4}	2.3×10^{-9}
	ZTPA090	1062	3.7×10^5	1.2×10^{-3}	3.3×10^{-9}
	ZTPA091	1063	3.9×10^5	1.2×10^{-3}	3.2×10^{-9}

[0416] 针对来自不同物种的TSLP进行Biacore动力学分析:使用Biacore 8K仪器中的捕获策略,确定了Z-ABD变体ZTPA002(SEQ ID NO:974)、ZTPA001(SEQ ID NO:973)和ZTPA093(SEQ ID NO:1065)与分别来自食蟹猴、大鼠和小鼠的TSLP结合的亲和力和动力学值。将HSA固定化,然后注射相应Z-ABD和随后来自不同物种的TSLP。表9给出了基于在Z-ABD表面上注射的食蟹猴TSLP蛋白的三种浓度(4、16和64nM)的数据,经计算的动力学参数的总结。在大鼠或小鼠中,未检测到与TSLP的结合。图6中展示了对于一个TSLP结合多肽(ZTPA001,SEQ ID NO:973)获得的传感图实例。

[0417] 表9:与食蟹猴TSLP结合的Z变体的动力学常数

Z 变体	SEQ ID NO	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
ZTPA002	974	5.0×10^5	1.4×10^{-3}	2.8×10^{-8}
ZTPA001	973	4.1×10^5	1.4×10^{-3}	3.4×10^{-8}
ZTPA093	1065	1.2×10^5	3.8×10^{-3}	3.3×10^{-8}

[0419] 点印迹分析:使用点印迹测定评估了ZTPA104和ZTPA001的特异性。允许这些Z-ABD变体与含有28种不同蛋白质点的硝酸纤维膜结合,这些蛋白质包括两种形式的全长hTSLP(未切割的或切割的)和sfTSLP,16种丰度血浆蛋白以及六种结构上相关的细胞因子和三种不相关的细胞因子。与作为阴性对照的IL-17A结合Z变体相比,Z-ABD变体(ZTPA104和ZTPA001)的结果在图7A-C中示出。为研究在图7A-C中看到的针对从血浆或血清中纯化的一些蛋白质的弱点(点5、7、14和16)是否可能是由于与剩余痕量的HSA的结合,还针对这些蛋白质进行了在10倍摩尔过量的HSA的存在下的结合,并将该分析的结果在图7D中示出。在该

点印迹中,经测试的蛋白质中仅能检测到针对全长hTSLP和HSA的结合。

[0420] 实施例8

[0421] 在体外效力测定中TSLP结合多肽的表征

[0422] 总结

[0423] 将**PathHunter®** eXpress IL7R/CRLF2二聚化测定(欧陆集团(Eurofins)/迪思沃X公司(DiscoverX))用于评估靶向TSLP的多肽的效力。**PathHunter®**二聚化测定检测TSLP诱导的IL-7受体 α 链(IL-7R α)和TSLP受体 α 链1(TSLP-R;由CRLF编码)的二聚化。该测定使用酶互补技术(EFC),该技术基于两个重组 β -半乳糖苷酶的酶片段(酶受体(EA)和酶供体(ED)),它们各自与两个TSLP受体亚基之一融合。TSLP与一个受体亚基的结合会诱导受体二聚化和随后的酶片段互补,从而产生可以在底物水解时产生化学发光信号的活性酶。

[0424] 材料和方法

[0425] 在测定当天,将10,000个细胞/孔接种在白色96孔TC板(欧陆集团/迪思沃X公司)中的细胞铺板25试剂(Cell Plating 25Reagent)(欧陆集团/迪思沃X公司)中,并在37°C下于CO₂培养箱中温育4h。在此期间,在含有Recombunin Elite(奥博迪克公司)的细胞铺板25试剂中连续滴定与ABD变体PP013(SEQ ID NO:1077)融合的Z变体。将TSLP(R&D系统公司,目录号1398-TS/CF,SEQ ID NO:1079)稀释至终浓度为1ng/mL。将连续滴定的多肽和TSLP靶蛋白一起预温育30min,然后添加至细胞。将10 μ L混合的多肽和TSLP蛋白添加至细胞,将其在37°C下温育16h。温育后,将110 μ L Flash检测试剂(Flash细胞测定缓冲液和Flash底物试剂的1:4混合物,均来自欧陆集团/迪思沃X公司)添加至每个孔,并将板在RT下在黑暗中温育1h。在EnSpire多模态读取器(珀金埃尔默公司)中测量发光信号。

[0426] 结果

[0427] 所有测试的与ABD融合的TSLP结合Z变体均示出抑制TSLP诱导的二聚化的效力。表10中呈现了经计算的在0.03和23nM之间的IC₅₀值。通过说明的方式,图8中示出了代表性图表。

[0428] 表10:由**PathHunter®** eXpress IL7R/CRLF2二聚化测定计算的IC₅₀值

[0429]

Z-ABD 变体	SEQ ID NO	IC50 (nM)
ZTPA092	1064	4.2 ¹
ZTPA003	975	9.1
ZTPA004	976	7
ZTPA005	977	22.8
ZTPA006	978	0.5 ¹
ZTPA007	979	13.9
ZTPA008	980	8.4
ZTPA009	981	10.3
ZTPA010	982	2.7
ZTPA011	983	0.6 ¹
ZTPA012	984	17.2
ZTPA013	985	9.3
ZTPA014	986	14.3
ZTPA015	987	0.4 ¹
ZTPA016	988	9.6
ZTPA017	989	8.9
ZTPA018	990	5.1
ZTPA019	991	19
ZTPA020	992	20.3
ZTPA021	993	5.3
ZTPA002	974	0.4 ²
ZTPA001	973	0.5 ²
ZTPA022	994	15.9
ZTPA027	999	0.4 ¹
ZTPA023	995	12.2
ZTPA024	996	16.5
ZTPA025	997	14
ZTPA026	998	13.5
ZTPA093	1065	0.5 ¹
ZTPA094	1066	0.5
ZTPA095	1067	0.6
ZTPA096	1068	0.5
ZTPA097	1069	0.6
ZTPA098	1070	0.5
ZTPA099	1071	1.5
ZTPA100	1072	4.2
ZTPA101	1073	2.9

[0430]	ZTPA102	1074	0.9
	ZTPA103	1075	0.9
	ZTPA104	1076	0.03

[0431] ¹两个IC₅₀测定的平均值

[0432] ²三个IC₅₀测定的平均值

[0433] 实施例9

[0434] 在非人灵长类动物中ZTPA001的药代动力学研究

[0435] 总结

[0436] 本实施例描述了向食蟹猴静脉内(i.v.)施用ZTPA001 (SEQ ID NO:973)的单剂量药代动力学(PK)研究。在给药后长达三周采集血液样品,并使用基于抗体的夹心PK-ELISA进行分析。

[0437] 材料和方法

[0438] NHP中的PK研究:在第1天,以1.33mg/kg,通过i.v.推注注射向非初治的、非禁食的食蟹猴(n=3;5.0-5.3kg)施用ZTPA001。对于每次注射,使用的剂量体积为0.5mL/kg。在以下时间点处采集血液样品(0.5mL):给药前,给药后10和30min和1、6、10、26、50、72和96h,以及第6、7、8、11、13、15、18和22天。在离心前,使血液样品在RT下凝结至少30min。离心后,提取血清,等分并储存在-70°C下,直至进一步分析。

[0439] 通过ELISA对ZTPA001的定量:将96孔半面积板用在PBS(50μL/孔)中的小鼠抗Z单克隆抗体(2μg/mL)涂覆,并在4°C下温育过夜。将板在PBST中洗涤,并在22°C下用Blocker®酪蛋白(赛默飞世尔科技公司)封闭1.5h。将ZTPA001标准品在Blocker®酪蛋白的1%食蟹猴血清池中以1.5倍稀释系列(50-1.3pM)进行滴定。将血清样品在Blocker®酪蛋白中以1:100稀释,随后在1%食蟹猴血清池中1:50稀释,并且在1%食蟹猴血清池中以1:4连续稀释。将校准标准品和稀释的血清样品添加至涂覆的ELISA板(50μL/孔),并在22°C下温育1.5h。在用PBST洗涤后,添加兔抗ABD多克隆抗体(2μg/mL)。在22°C下温育1.5h,将板用PBST洗涤,并且将100ng/mL HRP缀合的驴抗兔IgG(杰克逊免疫研究公司(Jackson Immuno Research),目录号711-035-152)添加至每个孔。再温育一个小时后,并随后在PBST中进行洗涤,将这些板在RT下用TMB(50μL/孔)显影15min,并通过添加0.2M H₂SO₄(50μL/孔)终止反应。在微孔板读取器(珀金埃尔默公司LF)中测量在450nm处的吸光度。

[0440] 对PK特性的评估:使用Phoenix WinNonlin 8.3版中的线性上升对数下降外推法,通过非隔室分析评估ZTPA001血清浓度与时间的曲线。

[0441] 结果

[0442] 图9A示出了单次i.v.给药后,食蟹猴中ZTPA001的PK特性。在食蟹猴1和2中,终末半衰期被确定为3-4天,其中至最后观察时间点的浓度与时间曲线下面积为11h*mg/mL。

[0443] 实施例10

[0444] 在非人灵长类动物中ZTPA001的机制证明研究

[0445] 总结

[0446] 本实施例描述了向食蟹猴i.v.施用ZTPA001的单剂量机制证明(POM)研究。在ZTPA001给药后长达三周采集血液样品,并使用基于抗体的夹心PK-ELISA进行分析。在中尺度探索公司(Meso Scale Discovery)平台(MSD)上确定了细胞因子和趋化因子水平。

[0447] 材料和方法

[0448] NHP中的POM研究: 分别在第1、8和16天, 以6.25、31.25和62.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 通过i.v.推注向非禁食的雌性食蟹猴 ($n=3$; 3.5-4.1kg; 一只为初治的和两只非初治的) 施用TSLP。对于每次注射, 使用的剂量体积为0.5mL/kg。在给药前以及在施用TSLP后4、8、24和48h获得血清样品。在第30天, 在第1天, 以单次1.33mg/kg剂量通过i.v. (推注) 施用ZTPA001。在i.v.施用ZTPA001后两小时, 经由i.v.注射施用62.5 μg TSLP。对于每次注射, 使用的剂量体积为0.5mL/kg。在以下时间点采集血液样品 (0.5mL), 用于确定ZTPA001血清浓度: 给药前, ZTPA001给药后10和130min (TSLP给药后10min) 和3、6、10、26、50、72和96h以及第8、11、15、18和22天。在给药前以及在TSLP施用后4、8、24和48h获得血液样品, 用于确定细胞因子和趋化因子水平。在离心前, 使血液样品在RT下凝结至少30min。离心后, 提取血清, 等分并储存在-70°C下, 直至进一步分析。

[0449] 通过ELISA对ZTPA001的定量: 如实施例9中所述进行分析。

[0450] 对PK特性的评估: 使用Phoenix WinNonlin 8.3版中的线性上升对数下降外推法, 通过非隔室分析评估ZTPA001血清浓度与时间的曲线。

[0451] 通过MSD对细胞因子和趋化因子进行定量: 对给药前, 施用TSLP后4、8、24和48h, 在第1、8、16和30天获得的血清进行细胞因子和趋化因子分析。使用V-PLEX Plus NHP细胞因子24-Plex试剂盒 (中尺度探索公司 (Meso Scale Discovery), 罗克维尔市, 马里兰州, 目录号K15058G), 并且在MESO QuickPlex SQ 120读取器 (中尺度探索公司, 罗克维尔市, 马里兰州) 上进行分析, 测量细胞因子 (IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23p40、IL-15、IL-16、IL-17A、TNF- β 、VEGF-A、IFN- γ 、GM-CSF) 和趋化因子 (MIP-1 β 、嗜酸性粒细胞趋化因子-3、TARC、IP-10、MIP-1 α 、IL-8HA、MCP-1、MDC、MCP-4)。将血清样品以1:4稀释, 并根据制造商的说明书分别分析细胞因子组1 (NHP) 试剂盒、促炎性组1 (NHP) 试剂盒和趋化因子组1 (NHP) 试剂盒。通过MSD Discovery Workbench 4.0版评估细胞因子和趋化因子血清浓度。

[0452] 结果

[0453] 图9B示出了在单次i.v.给药后, 食蟹猴中ZTPA001血清浓度与时间的关系。平均终末半衰期被确定为4天, 其中至最后可定量浓度的时间的浓度与时间曲线下平均面积为5.7h*mg/mL。在NHP PoM研究中测量的24种细胞因子和趋化因子中, 其中16种 (IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12/IL-23p40、IL-15、IL-16、VEGF-A、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TARC、IP-10、MCP-1、MDC和MCP-4) 高于LOD (检测限) 和LLOQ (定量下限) 从而符合接受标准。细胞因子和趋化因子中的八种 (IL-1 β 、IL-10、IL-17A、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、嗜酸性粒细胞趋化因子3和IL-8HA) 不符合接受标准, 因为它们低于LOD或LLOQ。以6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量施用TSLP不会导致细胞因子/趋化因子水平的上调。以31.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 施用TSLP导致几种细胞因子/趋化因子的产生增加, 最显著的是IL-2、TARC、MDC、MCP-1和MCP-4。最高剂量62.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TSLP触发了几种促炎性和哮喘相关的细胞因子/趋化因子的上调, 最显著的是: IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-16、TARC、MDC、MCP-1、MCP-4和IP-10, 其中在施用4-8h后达到最高浓度。单次静脉注射ZTPA001会导致这些促炎性细胞因子和趋化因子的几种减少。图10呈现了在不存在或存在ZTPA001的情况下, 在施用TSLP后, 哮喘相关细胞因子和趋化因子的血清浓度与时间的曲线, 该图示出ZTPA001的单次i.v.给药导致哮喘相关细胞因子的降低。

[0454] 实施例11

[0455] 在大鼠中,ZTPA001和ZTPA104的药代动力学研究

[0456] 总结

[0457] 本实施例描述了向斯普拉格道利大鼠静脉内(i.v.)施用ZTPA001(SEQ ID NO: 973)和ZTPA104(SEQ ID NO:1076)的单剂量药代动力学(PK)研究。在给药后长达三周采集血液样品,并使用基于抗体的夹心PK-ELISA分析血清浓度。

[0458] 材料和方法

[0459] 大鼠中的PK研究:在第1天,以1.2mg/kg通过i.v.注射,向雄性斯普拉格道利大鼠(查尔斯河实验室公司(Charles River),德国;n=6/测试项目)分别施用ZTPA001和ZTPA104。对于每次注射,使用的剂量体积为5mL/kg。由于8mL/kg血液采样限制,因此将血液采样时间点分为如下两组:组A(n=3/测试项目)在给药前,在给药后5min和1、8、72、168、264、408和504h出血;和组B(n=3/测试项目)在给药前,在给药后30min和3、24、120、216、336和456h出血。在离心前,使血液样品在RT下凝结至少30min。离心后,提取血清,等分并储存在-80°C下,直至进一步分析。

[0460] 通过ELISA定量:基本上如实施例9中所述进行ELISA测定,但存在以下例外:例外1:在Blocker®酪蛋白的1%大鼠血清池(斯普拉格道利;Bio IVT)中,将ZTPA001标准品以1.5倍稀释系列(50-0.87pM)进行滴定。将血清样品在Blocker®酪蛋白中以1:100稀释,随后在1%大鼠血清池中以1:5连续稀释。例外2:在Blocker®酪蛋白的1%大鼠血清池中,将ZTPA104标准品以1.5倍稀释系列(25-0.43pM)进行滴定。将血清样品在Blocker®酪蛋白中以1:100稀释,随后在1%大鼠血清池中以1:100稀释(除给药前采集的样品外)并且在1%大鼠血清池中以1:5连续稀释。对于ZTPA001,定量下限(LLQ)为1.03ng/mL,并且对于ZTPA104为0.52ng/mL。

[0461] 对PK特性的评估:使用Phoenix WinNonlin 8.3版中的线性上升对数下降外推法,通过非隔室分析评估平均ZTPA001和ZTPA104血清浓度与时间曲线。从分析中排除LLQ下的浓度值。

[0462] 结果

[0463] 图11示出了在单次i.v.给药后,大鼠中ZTPA001和ZTPA104的PK特性。这两种多肽示出相似的PK特性,其中最高血清浓度(C_{max})为41和35 μ g/mL,至最后可定量血清浓度或外推至无穷大的时间的剂量标准化浓度与时间曲线下面积(AUC/剂量)分别为1.2和1.1h*kg/mL,并且对于ZTPA001和ZTPA104终末半衰期($t_{1/2}$)分别为29和36h。

[0464] 实施例12

[0465] 在非人灵长类动物中ZTPA001的吸入研究

[0466] 总结

[0467] 本实施例描述了经由吸入向食蟹猴重复施用ZTPA001(SEQ ID NO:973)的研究。在ZTPA001的最后一次给药后大约24h采集血液、支气管肺泡灌洗液(BAL)和肺组织样品,并通过LC-MS/MS分析化合物浓度。通过ELISA确认了系统分布的ZTPA001的保留TSLP结合功能性。

[0468] 材料和方法

[0469] NHP中的吸入研究:以标称的1.2、6.7或12mg/kg,经由每日1小时吸入,持续7剂,向

食蟹猴(3.2-4.7kg;每剂量水平一只雄性和一只雌性)施用ZTPA001。使用喷射雾化器生成测试气雾剂以促进通过面罩吸入。在第1天(第一次施用)和第7天(最后一次施用)的以下时间点处,在K₂EDTA血液管中采集血液样品(0.5ml):在给药前、给药后立即以及在施用结束后1、3、7和23h。在血液采集的2h内,在4℃下,通过以2000×g离心10min获得血浆。离心后,提取血浆,等分并储存在-70℃下,直至进一步分析。在结束时,获得近端和远端肺的支气管肺泡灌洗液(BAL)和组织样品,并冷冻储存在-70℃下,直至进行生物分析。

[0470] ZTPA001的定量:通过液体色谱法串联质谱(LC-MS/MS)确定血浆、肺组织匀浆和BAL液浓度。将SMART Digest Trypsin试剂盒(赛默飞世尔科技公司,目录号60113-01)用于消化样品。将独特的特征胰蛋白酶肽用于进行定量,并将相应的稳定同位素标记肽用作内标。

[0471] 对PK特性的评估:使用Phoenix WinNonlin 8.3版中的线性上升对数下降外推法,通过非隔室分析评估平均ZTPA001血清浓度与时间的曲线。

[0472] TSLP结合ELISA:选择了四个具有高血浆水平的样品,在人TSLP结合ELISA中进行测试。这些样品是在第7天,施用结束后23h采集的,并且来自被施用标称剂量为6.7mg/kg的一只雄性和一只雌性猴子,以及被施用标称剂量为12mg/kg的一只雄性和一只雌性猴子。将血浆样品的TSLP结合能力与在与样品相同的范围内掺入食蟹猴血浆的ZTPA001(低掺入)或掺入更高浓度的ZTPA001(高掺入)进行了比较。还包括未掺入的空白血浆的阴性对照。

[0473] 将两个半面积测定板在4℃下用PBS中的1μg/mL重组人TSLP(RnD系统公司(RnD Systems),目录号1398-TC/CF)涂覆过夜。在第二天,将板用PBST 0.05%洗涤,并在22℃下、于PBS中的Blocker®酪蛋白中封闭1h。同时,将样品和对照稀释于基质(在补充有1%食蟹猴血浆的PBS中的Blocker®酪蛋白):将样品和低掺入对照各自稀释至100nM,并且将高掺入对照稀释至5000nM。对于所有样品和对照进行一式两份稀释,并在基质中进行3倍稀释系列。将样品添加至封闭板的孔中,在22℃下温育1h,并在PBST 0.05%中进行洗涤。将单克隆小鼠抗ABD Ig用于初级检测,并且将抗小鼠Ig-HRP用于二级检测。用TMB底物将板显影,并随后通过添加0.2M H₂SO₄停止反应。使用EnSpire板读取器,测量在450nm处的吸光度。

[0474] 结果

[0475] 通过吸入重复施用ZTPA001导致高BAL液和肺组织水平,并且在第一次给药后已经观察到血清/血浆的分布。在开始每天七次吸入给药中的最后一次后24h,较高的剂量导致BAL中ZTPA001浓度升高(图12A)。在肺组织匀浆中,ZTPA001浓度变化较大,但一般而言,在1.2mg/kg/天剂量组中的浓度最低(图12B)。未观察到左肺或右肺之间或组织取样位置(近端或远端)之间的差异。图13示出了在第一次(第1天)和最后一次(第7天)每日施用ZTPA001后,食蟹猴中ZTPA001血浆浓度与时间的关系。在第1天,血浆中的ZTPA001浓度随时间逐渐增加,其中在吸入结束后的23h,即给药前第2天达到最大浓度。在第7天,重复施用进一步增加了ZTPA001血浆浓度。

[0476] 在人TSLP结合ELISA中评估了在来自四种不同动物的四种所选血浆样品(示出了ZTPA001的高浓度,如通过LC-MS/MS确定的)中ZTPA001的TSLP结合能力。测试样品、低掺入对照和高掺入对照的滴定曲线重叠良好(图14),即所有四个测试样品都展示出与经掺入的对照相似的与人TSLP的结合。对于阴性对照,没有检测出与TSLP的结合。这表明ZTPA001在雾化、吸入和全身分布后均保留了与人TSLP的结合功能。此外,因为抗ABD抗体用于在TSLP

ELISA中检测ZTPA001,结果还表明ZTPA001多肽的ABD部分是完整的。

[0477] 实施方案的分项清单

[0478] 1. 一种TSLP结合多肽,其包含TSLP结合基序BM,该基序由选自以下的氨基酸序列组成:

[0479] i) EAVX₄ALX₇EIW X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LRD

[0480] (SEQ ID NO:1081)

[0481] 其中,彼此独立地,

[0482] X₄选自D、E和H;

[0483] X₇选自I、L、M和V;

[0484] X₁₁选自A、D、E、K、N、Q、R、S和T;

[0485] X₁₆选自N和T;

[0486] X₁₇选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0487] X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0488] X₂₀选自H、N、Q、T、W和Y;

[0489] X₂₁选自D、E、G、H、K、M、N、Q和R;

[0490] X₂₅选自A、H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且

[0491] X₂₆选自K和S;

[0492] 以及

[0493] ii) 与i)中定义的序列具有至少93%同一性的氨基酸序列。

[0494] 2. 根据项目1所述的TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,

[0495] X₄选自D、E和H;

[0496] X₇选自I、L、M和V;

[0497] X₁₁选自A、D、E、K、N、Q、R、S和T;

[0498] X₁₆选自N和T;

[0499] X₁₇选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0500] X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0501] X₂₀选自H、N、Q、T、W和Y;

[0502] X₂₁选自D、E、G、H、K、M、N、Q和R;

[0503] X₂₅选自A、H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且

[0504] X₂₆选自K和S。

[0505] 3. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,

[0506] X₄选自E和H;

[0507] X₇选自I、L和V;

[0508] X₁₁选自A、D、E、Q、R、S和T;

[0509] X₁₆选自N和T;

[0510] X₁₇选自A、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0511] X₁₈选自A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y;

[0512] X₂₀选自H、N、Q、W和Y;

[0513] X₂₁选自D、E、H、K、M、N、Q和R;

- [0514] X_{25} 选自H、I、K、L、Q、R、V和Y;并且
- [0515] X_{26} 选自K和S。
- [0516] 4. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,
- [0517] X_4 选自E和H;
- [0518] X_7 选自I、L和V;
- [0519] X_{11} 选自A、D、E、Q、S和T;
- [0520] X_{16} 是T;
- [0521] X_{17} 选自D、E、G、H、N、Q、R、S、W和Y;
- [0522] X_{18} 选自A、D、E、F、G、H、I、L、N、Q、R、S、T、W和Y;
- [0523] X_{20} 选自H、W和Y;
- [0524] X_{21} 选自D、E、H、N和Q;
- [0525] X_{25} 选自I、L、R、V和Y;并且
- [0526] X_{26} 是K。
- [0527] 5. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,
- [0528] X_4 是E;
- [0529] X_7 选自I和V;
- [0530] X_{11} 选自A、D、E、Q、S和T;
- [0531] X_{16} 是T;
- [0532] X_{17} 选自D、E、G、H、N、Q、R和Y;
- [0533] X_{18} 选自A、D、E、F、G、I、L、N、Q、R、S、T和Y;
- [0534] X_{20} 选自H、W和Y;
- [0535] X_{21} 选自D、E、H、N和Q;
- [0536] X_{25} 选自I、L、V和Y;以及
- [0537] X_{26} 是K。
- [0538] 6. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中,在序列i)中,
- [0539] X_4 是E;
- [0540] X_7 是V;
- [0541] X_{11} 选自A和T;
- [0542] X_{16} 是T;
- [0543] X_{17} 是R;
- [0544] X_{18} 选自D和E;
- [0545] X_{20} 是W;
- [0546] X_{21} 是Q;
- [0547] X_{25} 是Y;以及
- [0548] X_{26} 是K。
- [0549] 7. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中序列i)满足八个条件I-VIII中的至少四个:
- [0550] I. X_4 是E或H;
- [0551] II. X_7 选自I、L和V;

- [0552] III. X_{11} 选自A、D、E、Q、S和T;
- [0553] IV. X_{16} 是T;
- [0554] V. X_{20} 选自H、W和Y;
- [0555] VI. X_{21} 选自D、E、H、N和Q;
- [0556] VII. X_{25} 选自I、L、R、V和Y;以及
- [0557] VIII. X_{26} 是K。
- [0558] 8. 根据项目7所述的TSLP结合多肽,其中序列i)满足八个条件I-VIII中的至少五个。
- [0559] 9. 根据项目8所述的TSLP结合多肽,其中序列i)满足八个条件I-VIII中的至少六个。
- [0560] 10. 根据项目9所述的TSLP结合多肽,其中序列i)满足八个条件I-VIII中的至少七个。
- [0561] 11. 根据项目10所述的TSLP结合多肽,其中序列i)满足八个条件I-VIII中的全部。
- [0562] 12. 根据项目1-5中任一项所述的TSLP结合多肽,其中 X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{20} 是W。
- [0563] 13. 根据项目1-5中任一项所述的TSLP结合多肽,其中 X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{21} 是Q。
- [0564] 14. 根据项目1-5中任一项所述的TSLP结合多肽,其中 X_4 是E, X_7 是V,并且 X_{25} 是Y。
- [0565] 15. 根据项目1所述的TSLP结合多肽,其中结合基序序列对应于选自由SEQ ID NO: 1-875组成的组的序列中位置8至位置36的序列。
- [0566] 16. 根据项目15所述的TSLP结合多肽,其中序列i)对应于选自由SEQ ID NO:1-645组成的组的序列中位置8至位置36的序列。
- [0567] 17. 根据项目16所述的TSLP结合多肽,其中序列i)对应于选自由SEQ ID NO:1-91组成的组的序列中位置8至位置36的序列。
- [0568] 18. 根据项目17所述的TSLP结合多肽,其中序列i)对应于选自由SEQ ID NO:1-27组成的组的序列中位置8至位置36的序列。
- [0569] 19. 根据项目18所述的TSLP结合多肽,其中序列i)对应于选自由SEQ ID NO:1-2组成的组的序列中位置8至位置36的序列。
- [0570] 20. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其中所述结合基序形成三螺旋束蛋白结构域的一部分。
- [0571] 21. 根据项目20所述的TSLP结合多肽,其中所述结合基序在所述三螺旋束蛋白结构域内基本上形成具有互连环的两个螺旋的部分。
- [0572] 22. 根据项目20或21所述的TSLP结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域选自细菌受体结构域。
- [0573] 23. 根据项目20-22中任一项所述的TSLP结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域选自来自金黄色葡萄球菌的蛋白A或其衍生物的结构域。
- [0574] 24. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其包含结合模块(BMod),其氨基酸序列选自:
- [0575] iii) $K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ$ (SEQ ID NO:1082);
- [0576] 其中
- [0577] [BM]是如项目1-19中任一项所定义的TSLP结合基序;

- [0578] X_a 选自A和S;
- [0579] X_b 选自E和N;
- [0580] X_c 选自A、S和C;
- [0581] X_d 选自E、N和S;
- [0582] X_e 选自D、E和S;
- [0583] X_f 选自A和S;以及
- [0584] iv) 与iii)中定义的序列具有至少91%同一性的氨基酸序列。
- [0585] 25. 根据项目24所述的TSLP结合多肽,其中序列iii)对应于选自由SEQ ID NO:1-875组成的组的序列中位置7至位置55的氨基酸序列。
- [0586] 26. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:
- [0587] v) YA-[BMod]-AP(SEQ ID NO:1083);
- [0588] 其中[BMod]是如项目24或25所定义的;以及
- [0589] vi) 与v)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0590] 27. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:
- [0591] vii) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDQAPK(SEQ ID NO:1097);
- [0592] 其中[BM]是如项目1-19中任一项所述定义的;以及
- [0593] viii) 与vii)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0594] 28. 根据项目27所述的TSLP结合多肽,其中序列vii)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1-636、639-644和646-875。
- [0595] 29. 根据项目1-25中任一项所述的TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:
- [0596] ix) AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSAQAPK(SEQ ID NO:1095);
- [0597] 其中[BM]是如项目1-19中任一项所述定义的;以及
- [0598] x) 与ix)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0599] 30. 根据项目29所述的TSLP结合多肽,其中序列ix)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:637和SEQ ID NO:638。
- [0600] 31. 根据项目1-26中任一项所述的TSLP结合多肽,其包含选自以下的氨基酸序列:
- [0601] xi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDQAPK(SEQ ID NO:1093);
- [0602] 其中[BM]是如项目1-19中任一项所述定义的;以及
- [0603] xii) 与xi)中定义的序列具有至少86%同一性的氨基酸序列。
- [0604] 32. 根据项目31所述的TSLP结合多肽,其中序列xi)选自由以下组成的组:SEQ ID NO:645和876-972。
- [0605] 33. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,该结合多肽能够与TSLP结合,使得与TSLP相互作用的 K_D 值为至多 $1 \times 10^{-6}M$,例如至多 $5 \times 10^{-7}M$ 、例如至多 $1 \times 10^{-7}M$ 、例如至多 $5 \times 10^{-8}M$ 、例如至多 $1 \times 10^{-8}M$ 。
- [0606] 34. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽,其在C-末端和/或N-末端处包含另外的氨基酸。
- [0607] 35. 根据项目34所述的TSLP结合多肽,其中所述另外的一个或多个氨基酸改善该多肽的产生、纯化、体外或体内稳定化、偶联或检测。
- [0608] 36. 根据任一前述项目所述呈多聚体形式的TSLP结合多肽,其包含至少两个TSLP

结合多肽单体单元,其氨基酸可以是相同的或不同的。

[0609] 37. 根据项目36所述的TSLP结合多肽,其中所述TSLP结合多肽单体单元共价偶联在一起。

[0610] 38. 根据项目36所述的TSLP结合多肽,其中所述TSLP结合多肽单体单元被表达为融合蛋白。

[0611] 39. 根据项目36-38中任一项所述的TSLP结合多肽,该结合多肽呈二聚体形式。

[0612] 40. 一种融合蛋白或缀合物,其包含

[0613] -由根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽组成的第一部分;以及

[0614] -由具有所期望生物活性的多肽组成的第二部分。

[0615] 41. 根据项目40所述的融合蛋白或缀合物,其中所述期望的生物活性是治疗活性。

[0616] 42. 根据项目40所述的融合蛋白或缀合物,其中所述期望的生物活性是结合活性。

[0617] 43. 根据项目40所述的融合蛋白或缀合物,其中所述期望的生物活性是酶活性。

[0618] 44. 根据项目42所述的融合蛋白或缀合物,其中所述期望的结合活性是白蛋白结合活性,其增加融合蛋白或缀合物的体内半衰期。

[0619] 45. 根据项目44所述的融合蛋白或缀合物,其中所述第二部分包含链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域或其衍生物。

[0620] 46. 根据项目45所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含选自SEQ ID NO:973-1076和1129组成的组的氨基酸序列。

[0621] 47. 根据项目46所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含选自SEQ ID NO:973-1076组成的组的氨基酸序列。

[0622] 48. 根据项目47所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含选自SEQ ID NO:973-999和1064-1076组成的组的氨基酸序列。

[0623] 49. 根据项目48所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含选自SEQ ID NO:973、974、1065和1076组成的组的氨基酸序列。

[0624] 50. 根据项目49所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含选自SEQ ID NO:973和1076组成的组的氨基酸序列。

[0625] 51. 根据项目50所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含SEQ ID NO:973的氨基酸序列。

[0626] 52. 根据项目50所述的融合蛋白或缀合物,该融合蛋白或缀合物包含SEQ ID NO:1076的氨基酸序列。

[0627] 53. 根据项目42所述的融合蛋白或缀合物,其中所述结合活性起作用以阻断生物活性。

[0628] 54. 根据项目41所述的融合蛋白或缀合物,其中该第二部分是治疗活性多肽。

[0629] 55. 根据项目40-43和53-54中任一项所述的融合蛋白或缀合物,其中该第二部分选自以下组成的组:人内源性酶、激素、生长因子、趋化因子、细胞因子和淋巴因子。

[0630] 56. 根据项目40-43中任一项所述的融合蛋白或缀合物,其中该第二部分选自以下组成的组:抗体及其抗原结合片段。

[0631] 57. 根据项目56所述的融合蛋白或缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段选自以下组成的组:全长抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、单链Fab(scFab)片段、Fc片

段、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、(scFv)₂、scFv-Fc构建体和结构域抗体。

[0632] 58. 根据项目57所述的融合蛋白或缀合物,其中所述至少一种抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:全长抗体、Fab片段和scFv片段。

[0633] 59. 根据项目58所述的融合蛋白或缀合物,其中所述至少一种抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

[0634] 60. 根据40-59项目中任一项所述的融合蛋白,其中该第二部分进一步包含接头。

[0635] 61. 根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物,该TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物进一步包含标记,例如选自由以下组成的组:荧光染料和金属、发色染料、化学发光化合物、生物发光蛋白质、酶、放射性核素和放射性颗粒。

[0636] 62. 一种多核苷酸,该多核苷酸编辑根据任一前述项目所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物。

[0637] 63. 一种表达载体,其编码根据项目62所述的多核苷酸。

[0638] 64. 一种宿主细胞,其包含根据项目63所述的表达载体。

[0639] 65. 生产根据项目1-60中任一项所述的多肽、融合蛋白或缀合物的方法,该方法包括

[0640] -在允许所述多肽从所述表达载体表达的条件下,培养根据项目64所述的宿主细胞;以及

[0641] -分离所述多肽。

[0642] 66. 一种组合物,该组合物包含根据项目1-61中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物,以及至少一种药学上可接受的赋形剂或载剂。

[0643] 67. 根据项目1-60中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据项目66所述的组合物,用于口服、经呼吸道、局部、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、经皮、肌内、鼻内、口腔含化、舌下或栓剂施用,比如用于经呼吸道、静脉内或皮下施用。

[0644] 68. 根据项目1-60中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据项目66所述的组合物,其用作药物、诊断剂或预后剂。

[0645] 69. 根据项目68所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其用作药物。

[0646] 70. 根据项目68所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其用作诊断剂和/或预后剂。

[0647] 71. 根据项目69所述用作药物的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其中所述多肽、融合蛋白、缀合物或组合物调节体内TSLP功能。

[0648] 72. 根据项目68-71中任一项所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其用于TSLP相关障碍的治疗、预后或诊断。

[0649] 73. 根据项目72所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其中所述TSLP相关障碍选自炎症性疾病、自身免疫性疾病和癌症疾病。

[0650] 74. 根据项目72或73所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物,其中所述TSLP相关障碍选自由以下组成的组:呼吸系统疾病、皮肤疾病、过敏、眼病、胃肠疾病和癌症。

[0651] 75. 根据项目72-74中任一项所述使用的TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合

物,其中所述TSLP相关障碍或疾病选自自由以下组成的组:哮喘、特应性皮炎、特应性角结膜炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性食管炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)/查尔格-施特劳斯综合征、乳腺癌、结节性痒疹和大疱性类天疱疮。

[0652] 76.一种治疗TSLP相关障碍的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1-60中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据项目66所述的组合物。

[0653] 77.根据项目76所述的方法,其中所述TSLP相关障碍选自炎症性疾病、自身免疫性疾病和癌症疾病。

[0654] 78.根据项目77所述的方法,其中所述TSLP相关障碍选自自由以下组成的组:呼吸系统疾病、皮肤疾病、过敏、眼病、胃肠疾病和癌症。

[0655] 79.根据项目78所述的方法,其中所述TSLP相关障碍或疾病选自自由以下组成的组:哮喘、特应性皮炎、特应性角结膜炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、慢性鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性食管炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、嗜酸性肉芽肿性多血管炎(EGPA)/查尔格-施特劳斯综合征、乳腺癌、结节性痒疹和大疱性类天疱疮。

[0656] 80.一种体外检测TSLP的方法,该方法包括提供怀疑含有TSLP的样品,使所述样品与根据项目1-61中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据项目66所述的组合物接触,并检测该TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的结合,以指示该样品中TSLP的存在。

[0657] 81.一种用于确定受试者中TSLP存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0658] a)使该受试者或从该受试者分离的样品与根据项目1-61中任一项所述的TSLP结合多肽、融合蛋白或缀合物或根据项目66所述的组合物接触,以及

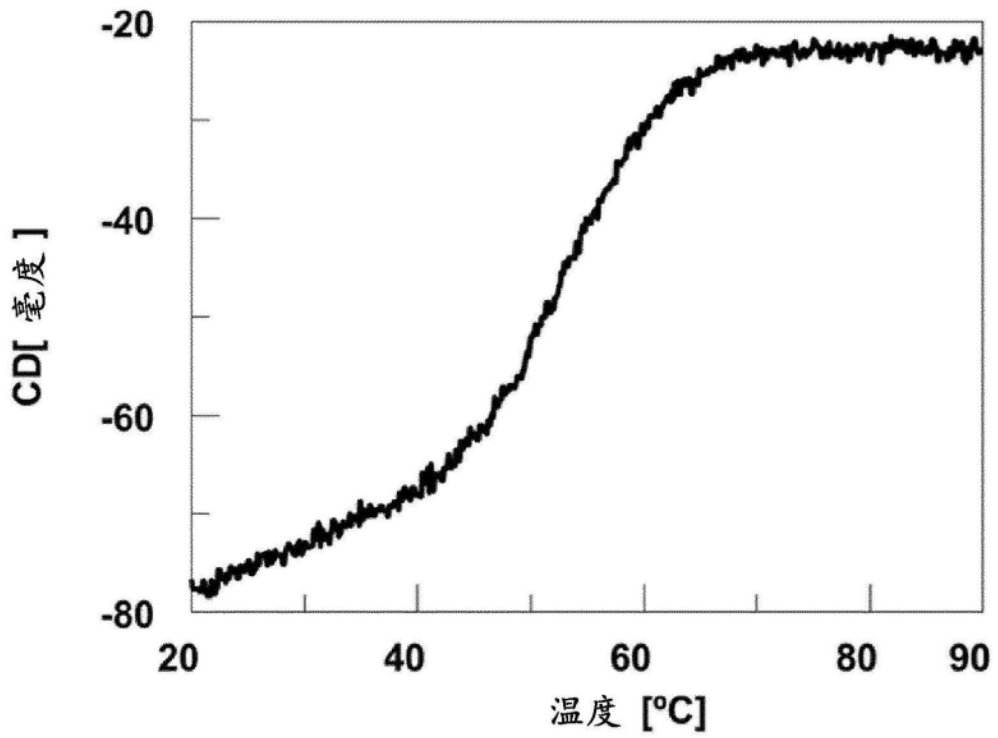
[0659] b)获得对应于所述受试者或所述样品中结合的该TSLP结合多肽、融合蛋白、缀合物或组合物的量的值。

[0660] 82.根据项目81所述的方法,该方法进一步包括将所述值与参考进行比较的步骤。

[0661] 83.根据项目81或82所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物受试者,比如人受试者。

[0662] 84.根据项目81-83中任一项所述的方法,其中该方法在体内进行。

A



B

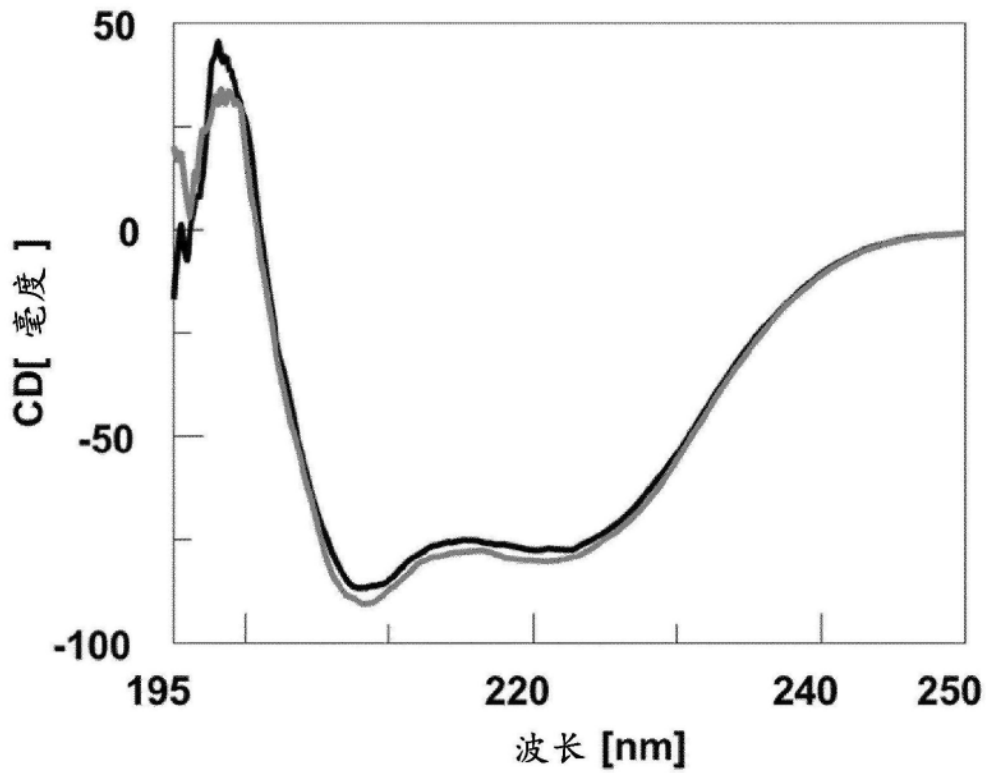
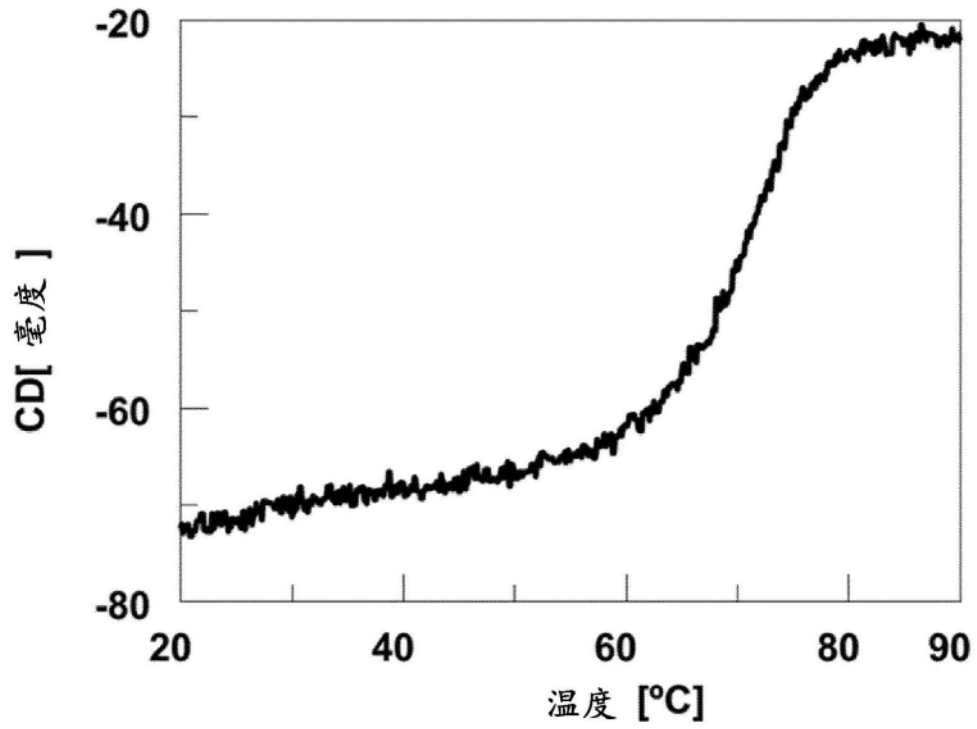


图1A-B

C



D

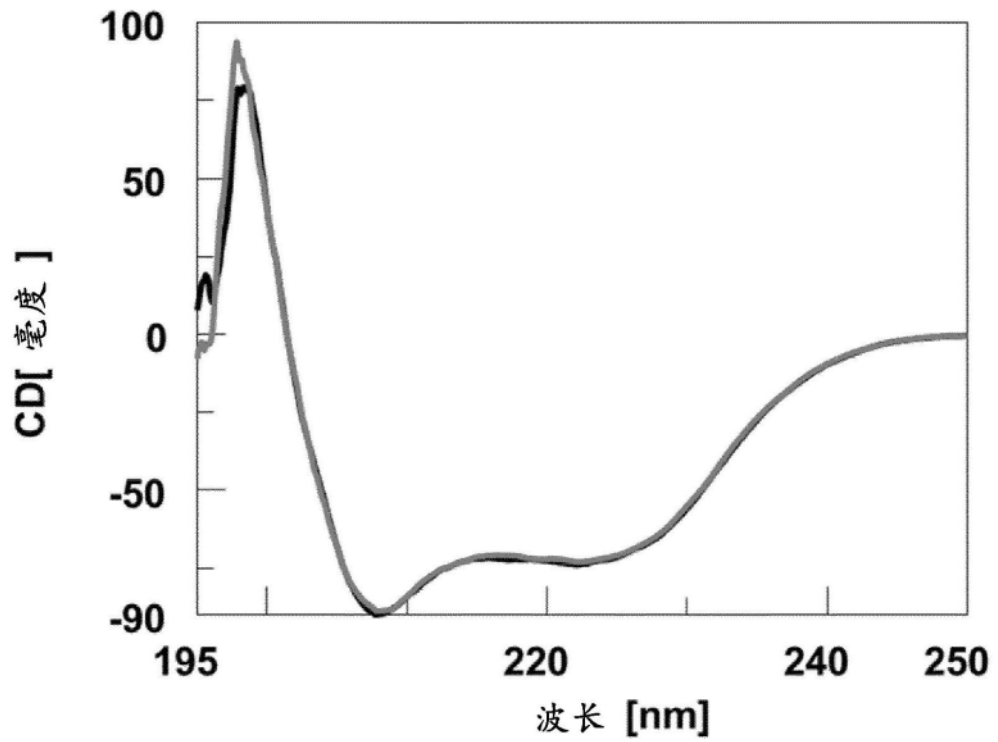


图1C-D

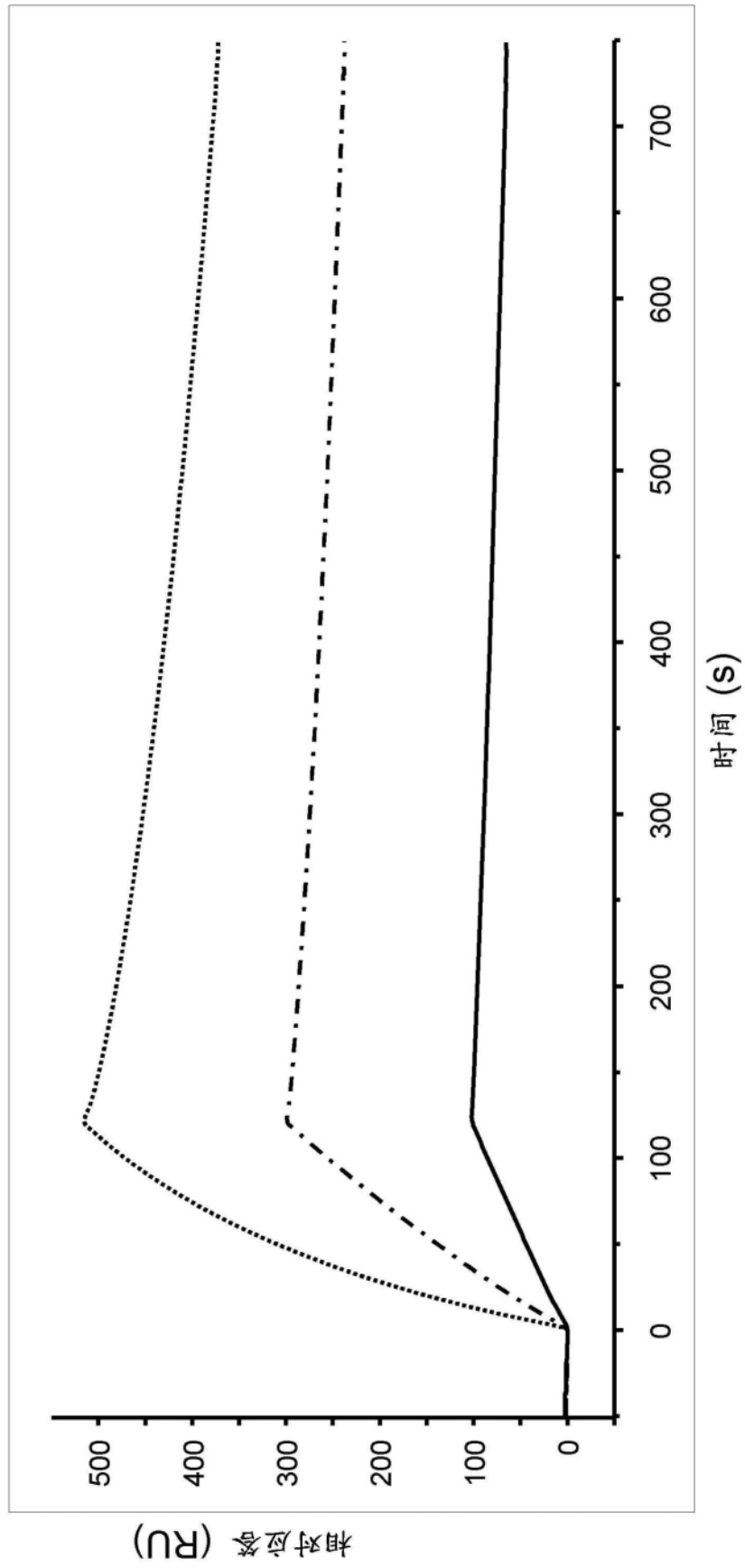


图2

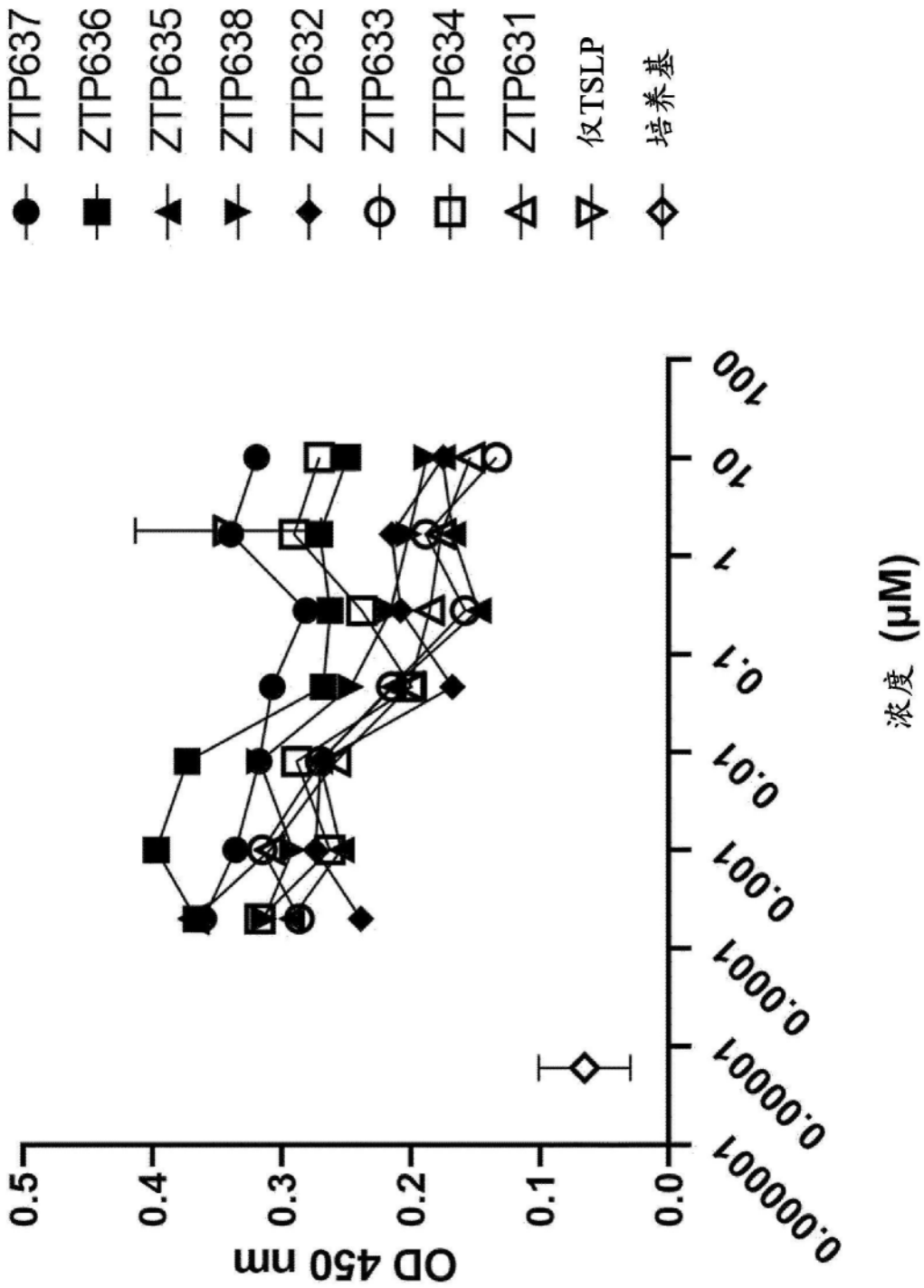
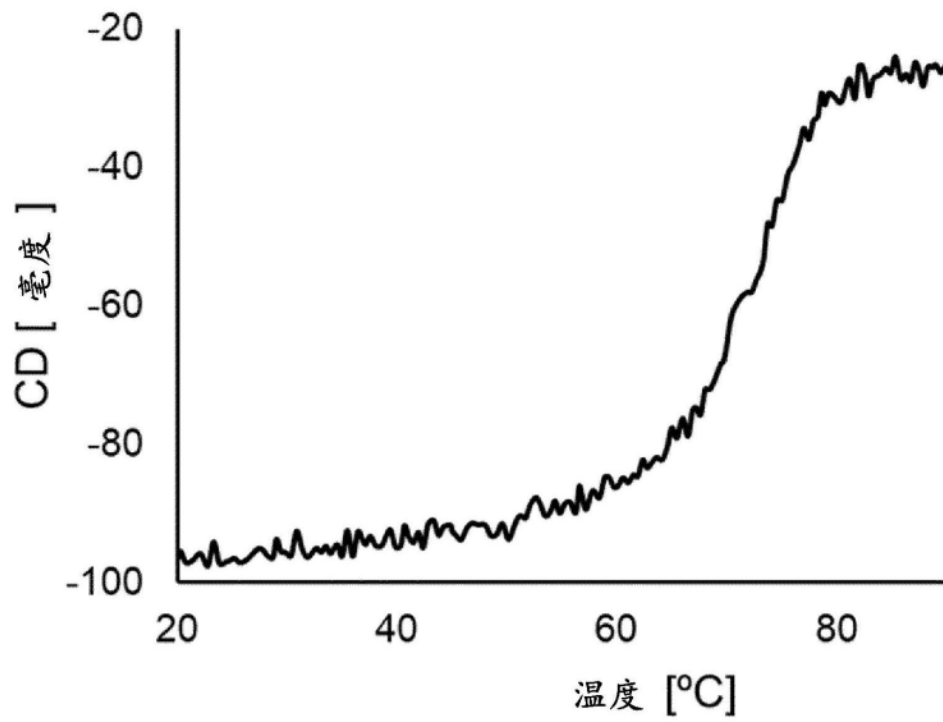


图3

A



B

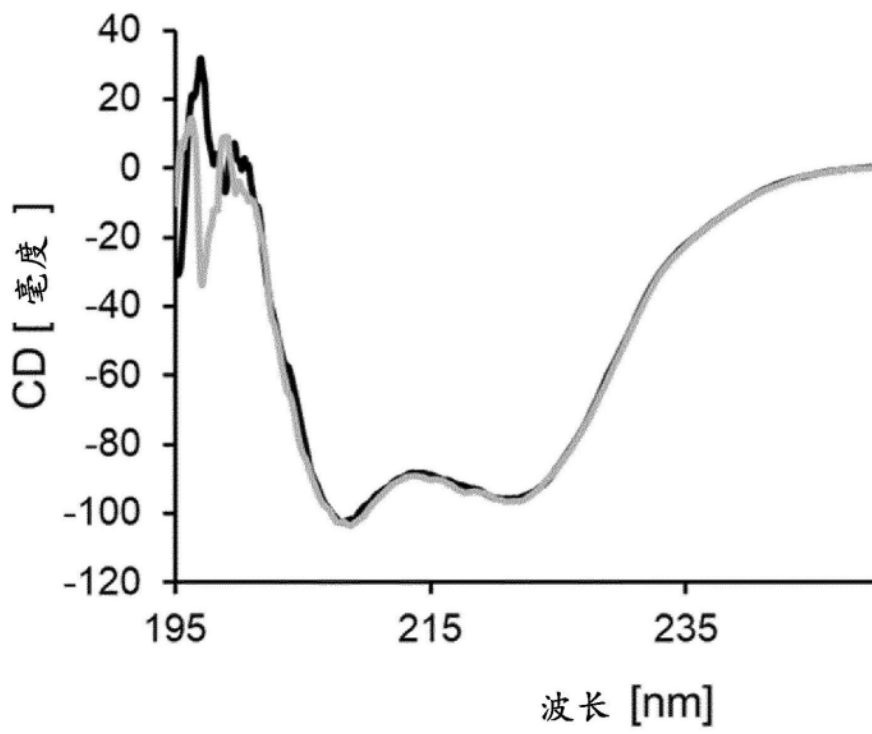
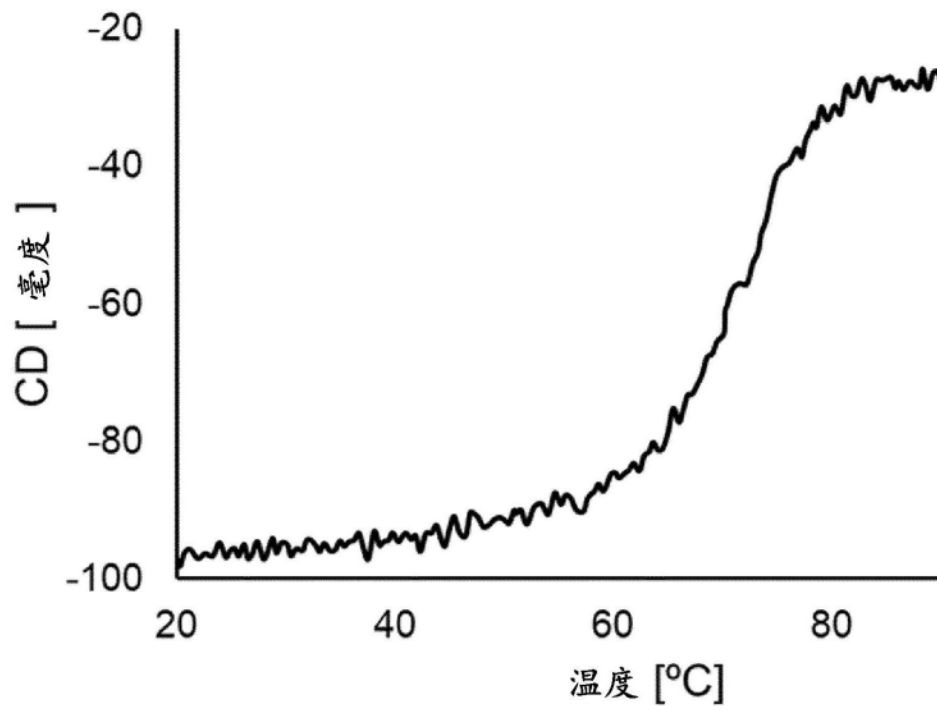


图4A-B

C



D

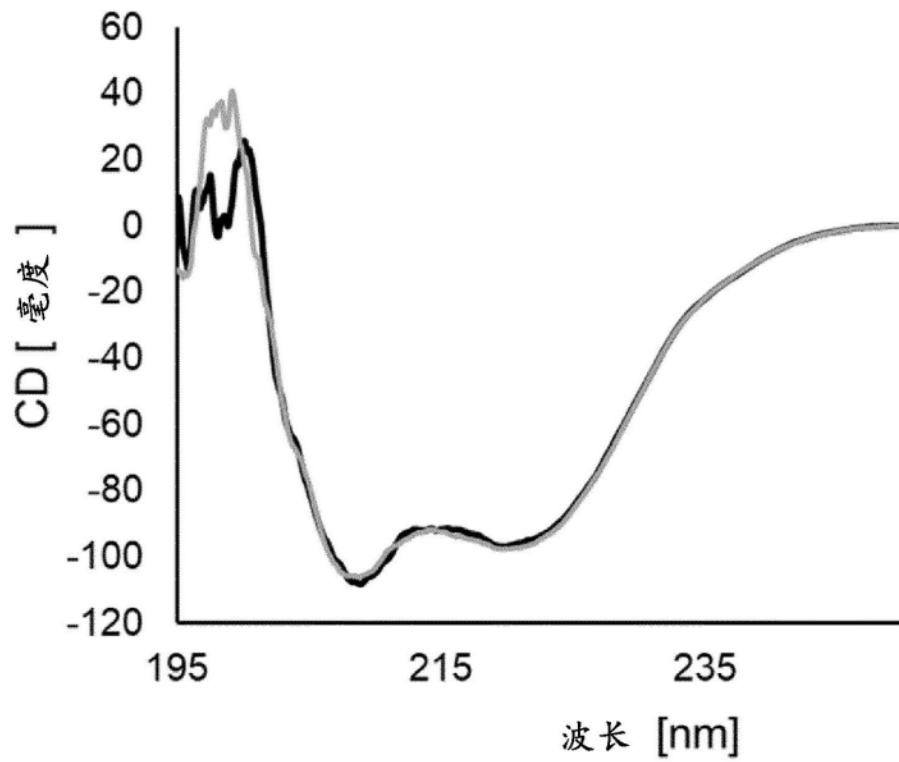


图4C-D

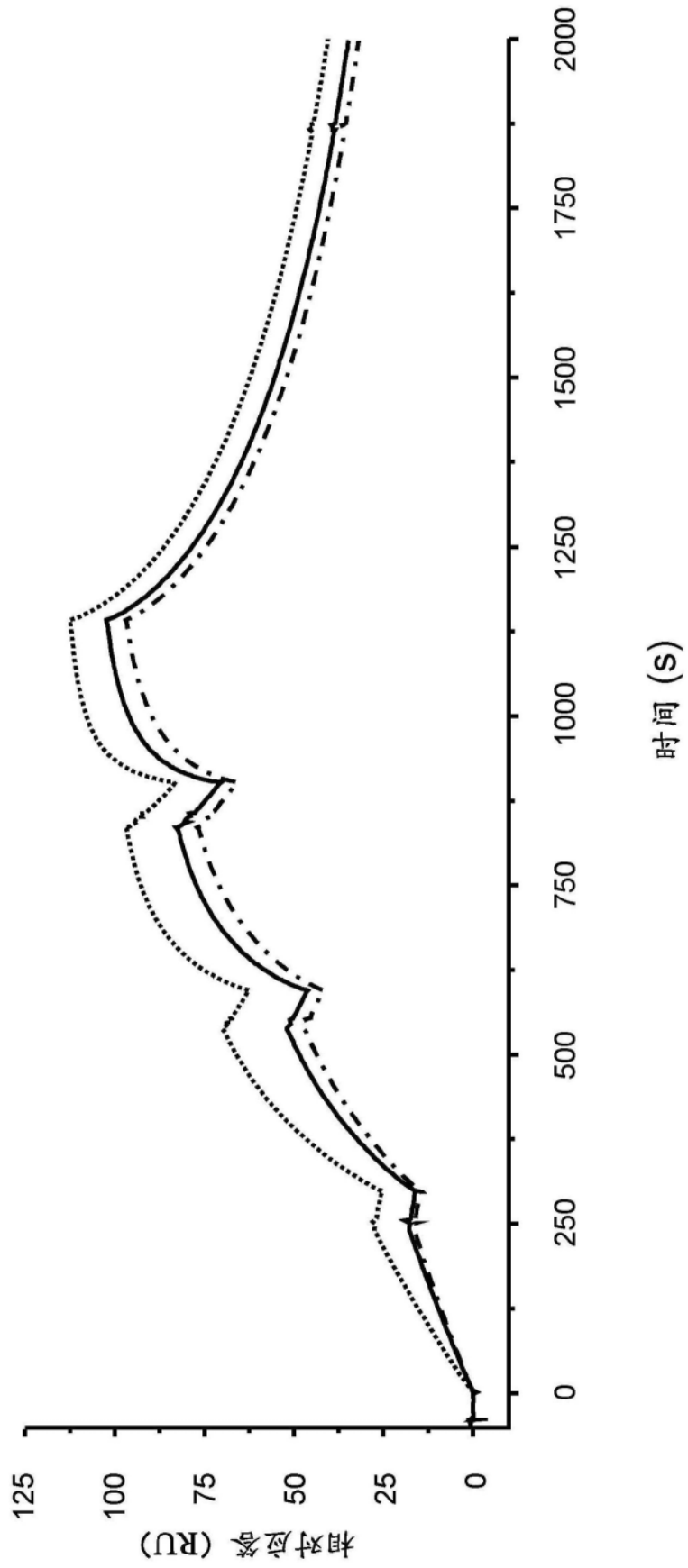


图5

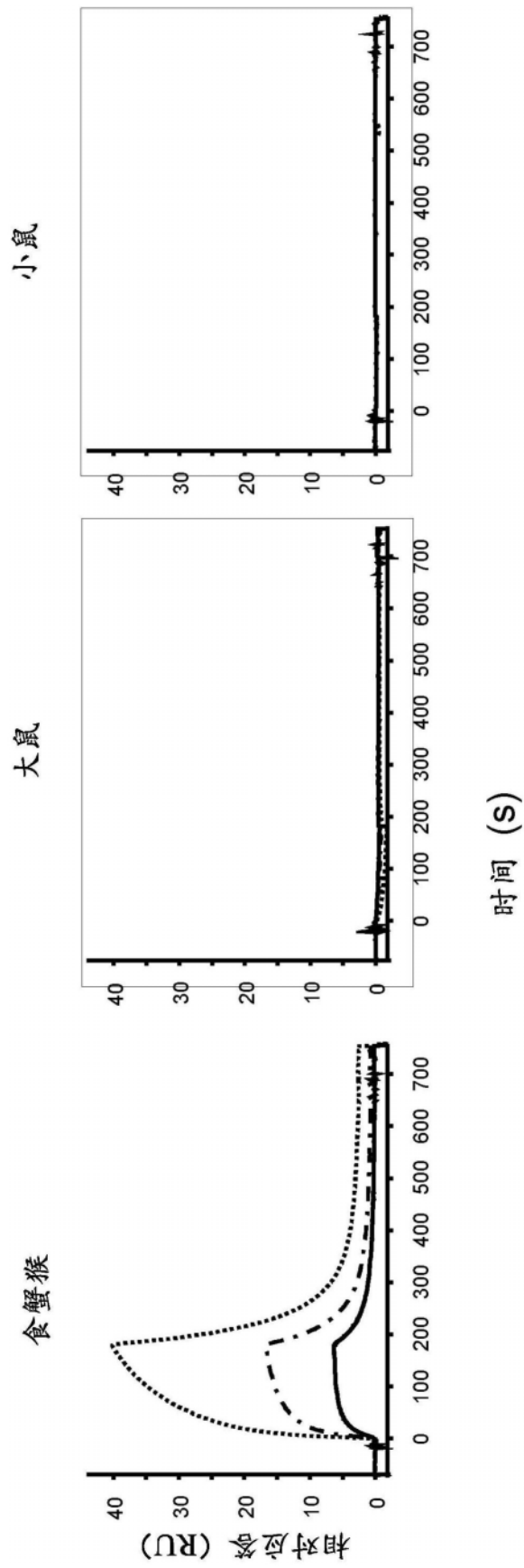


图6

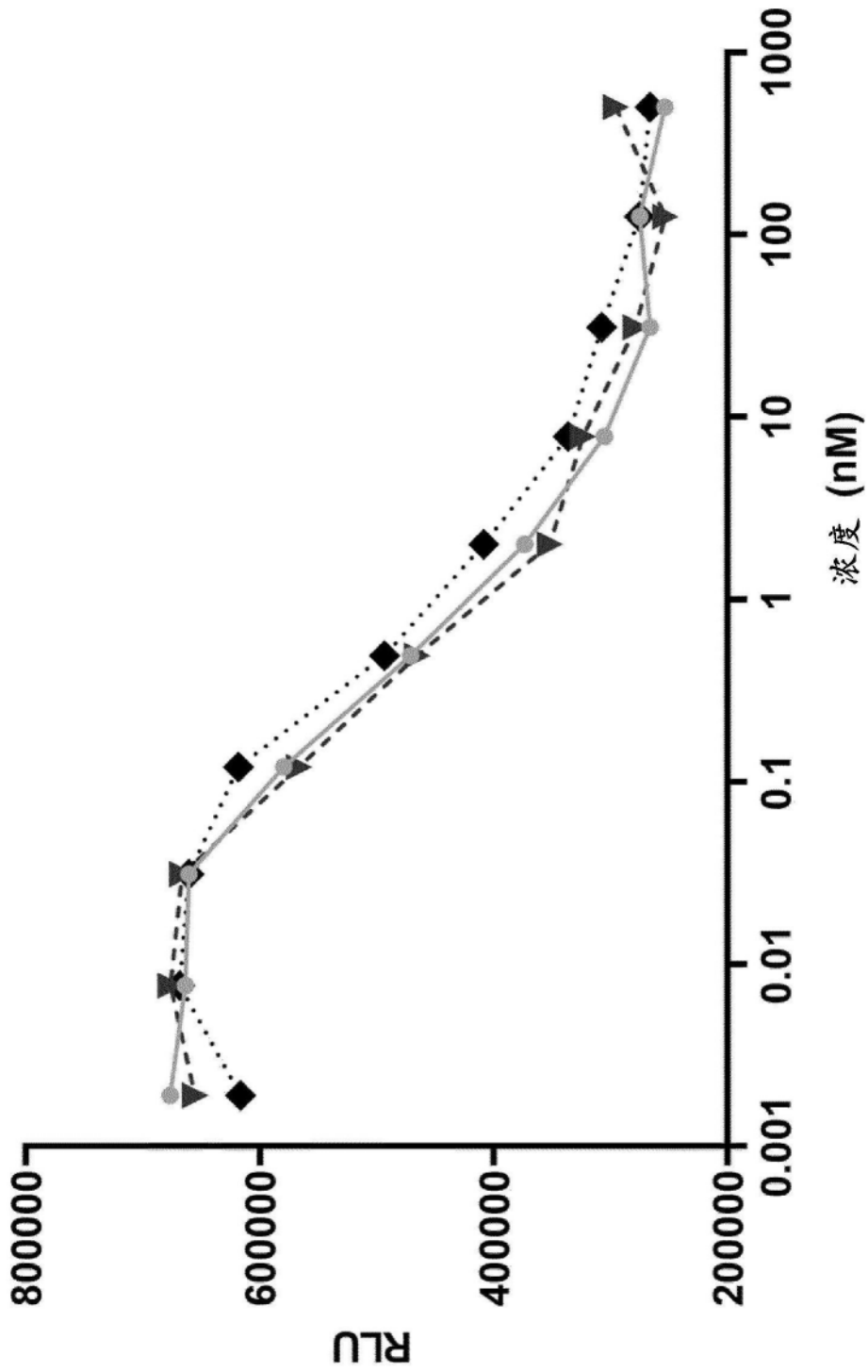
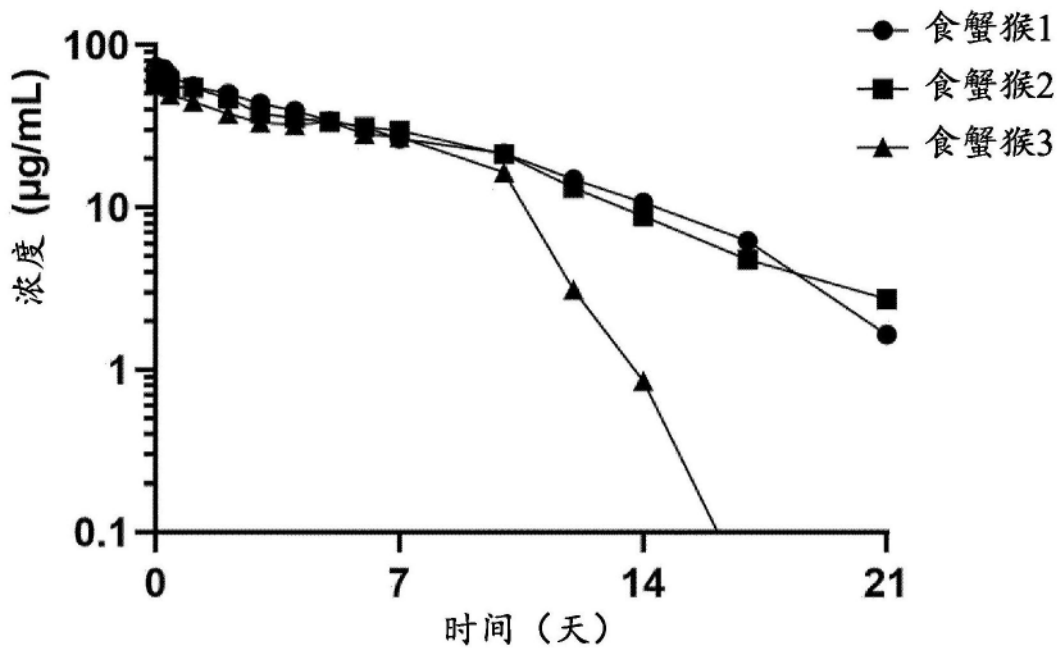


图8

A



B

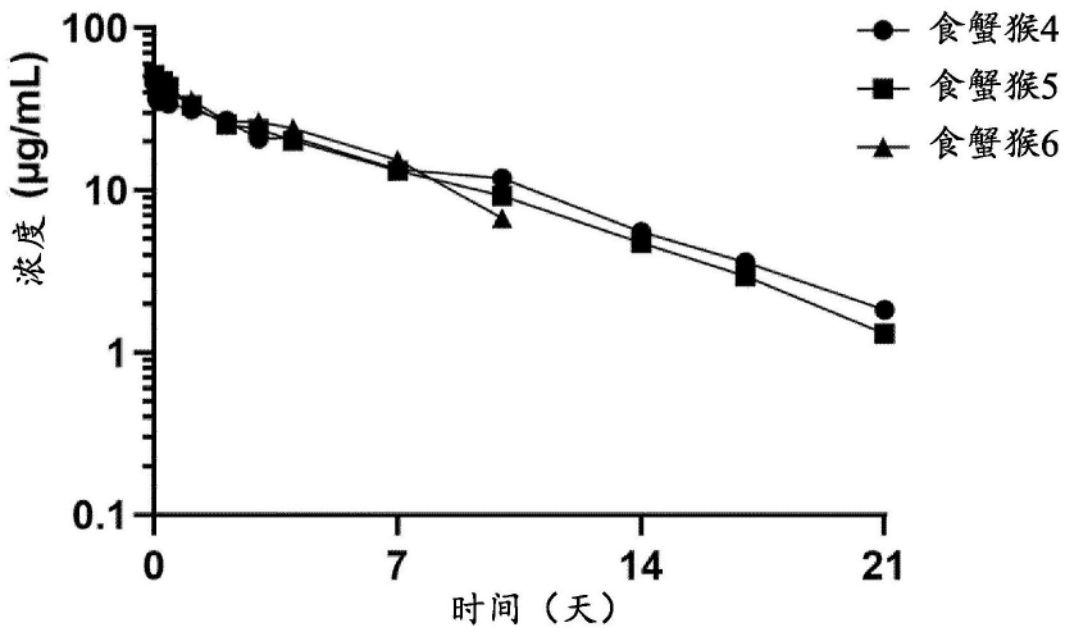


图9A-B

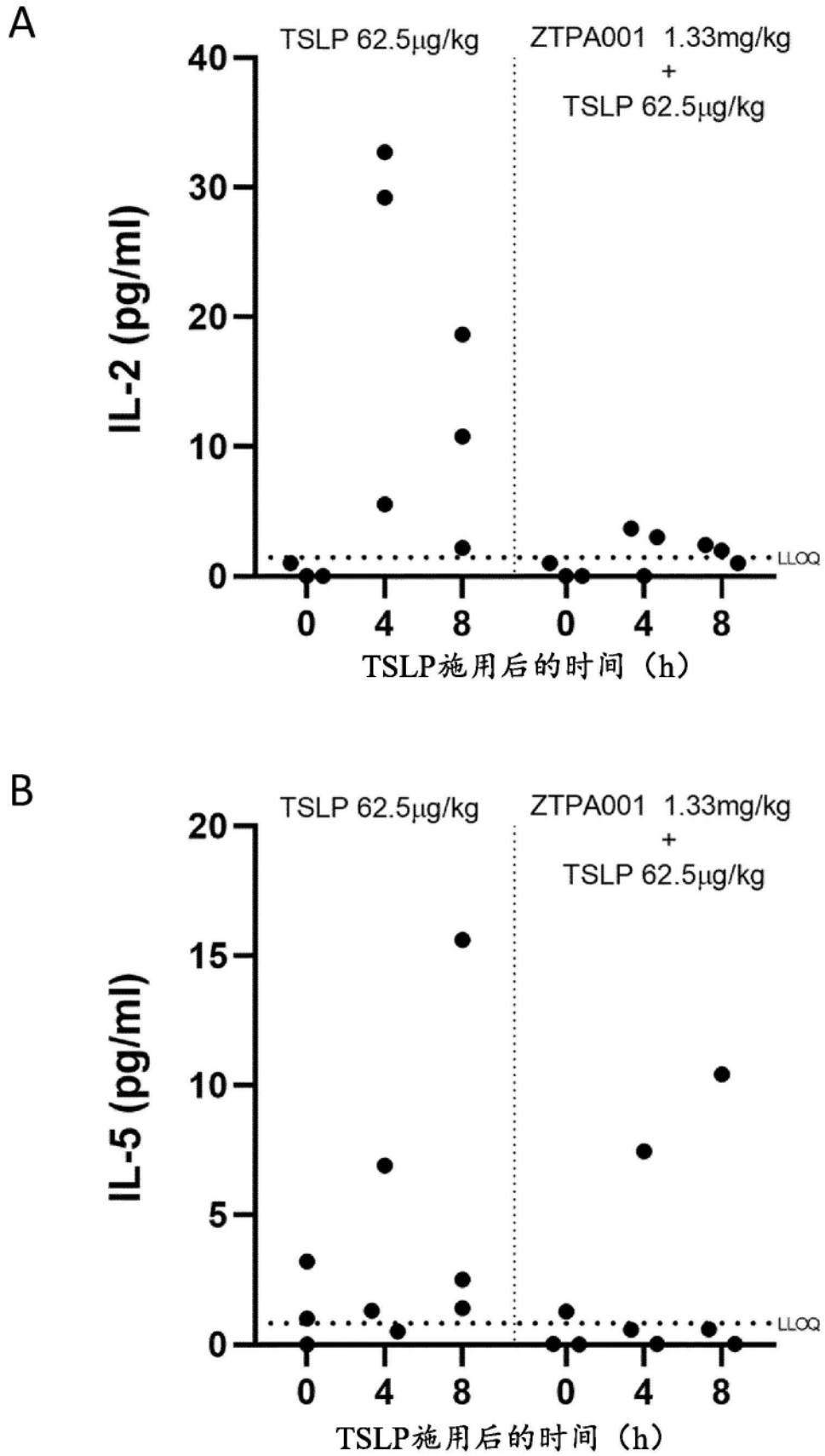


图10A-B

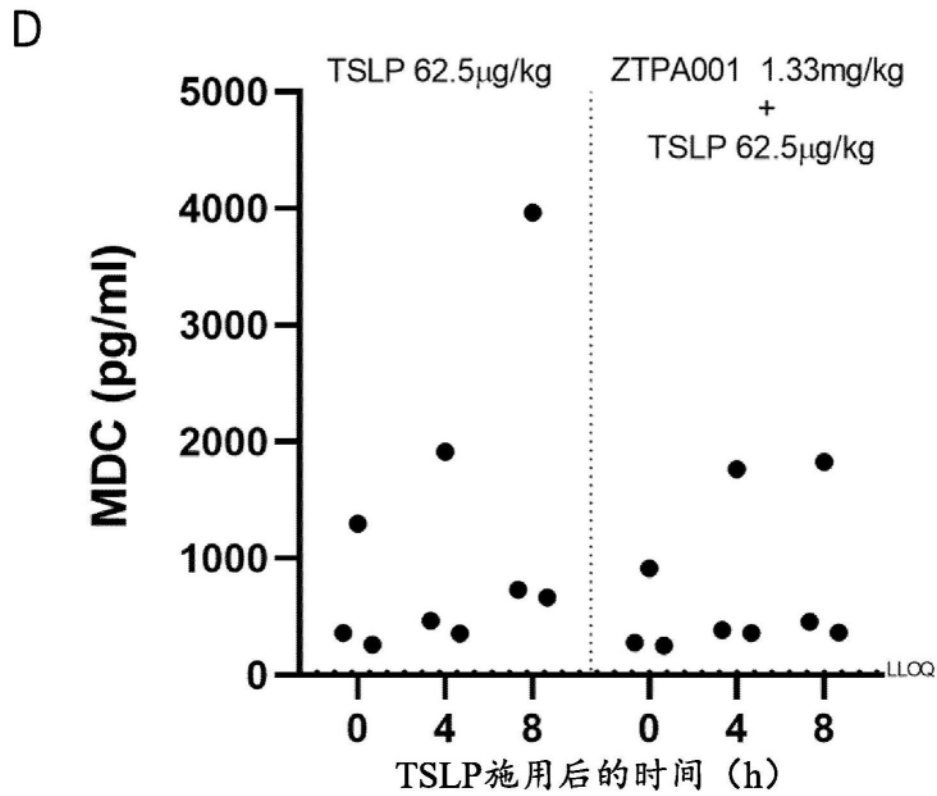
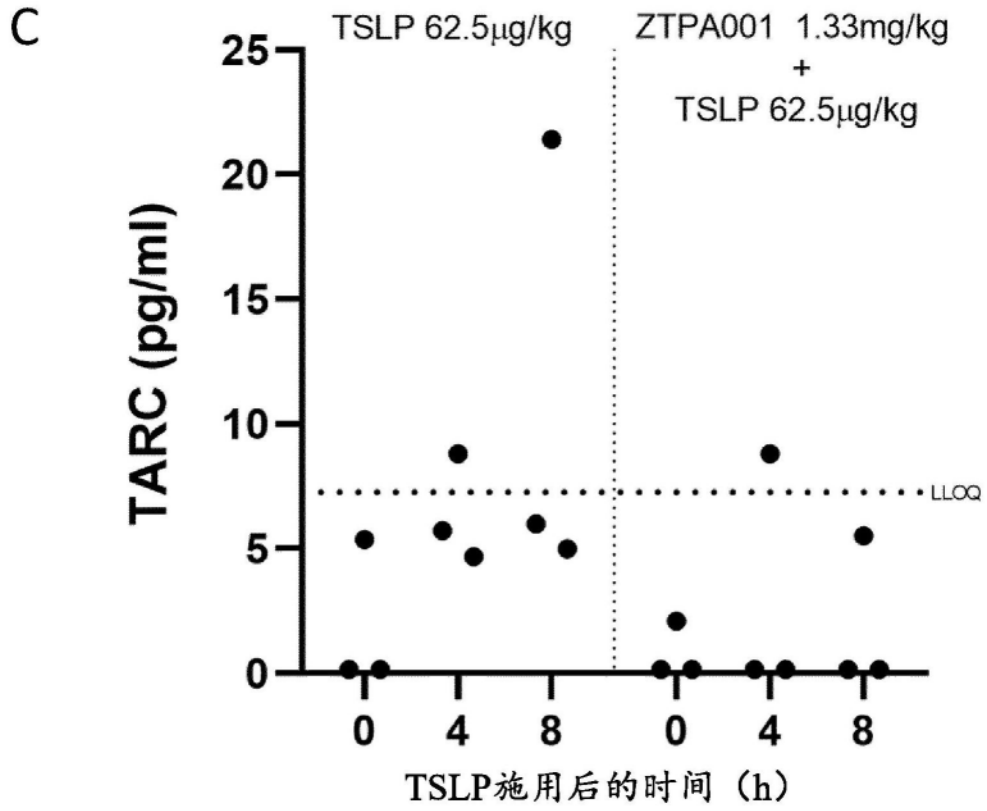


图10C-D

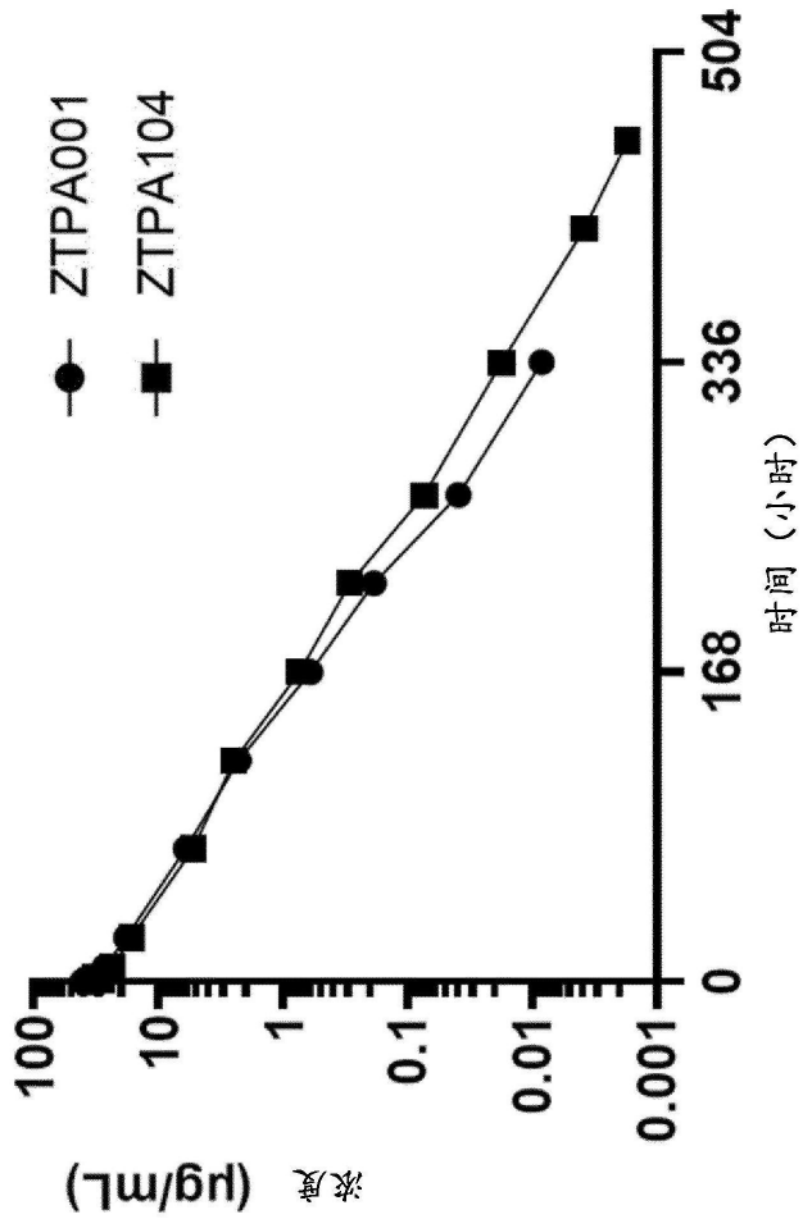


图11

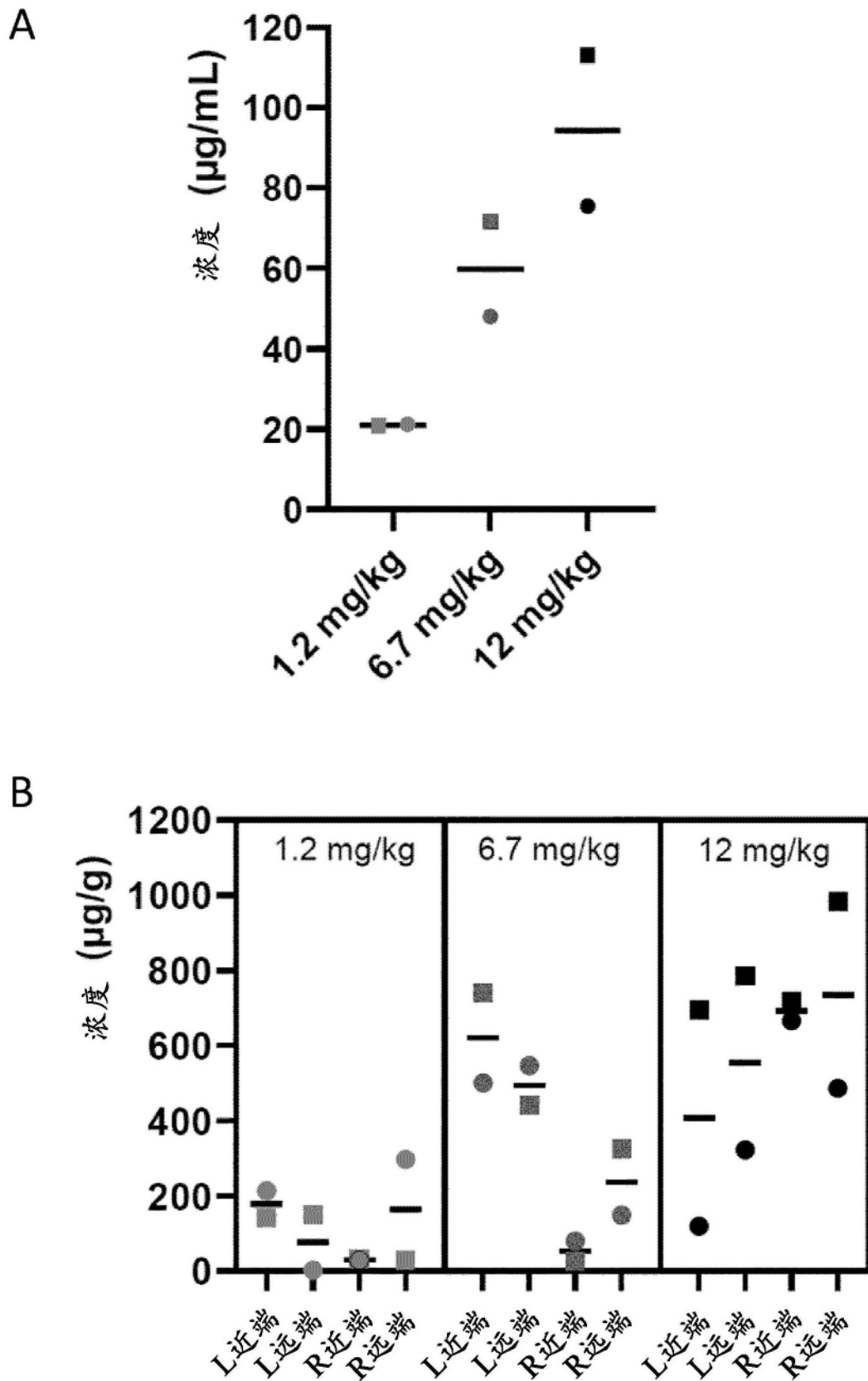


图12

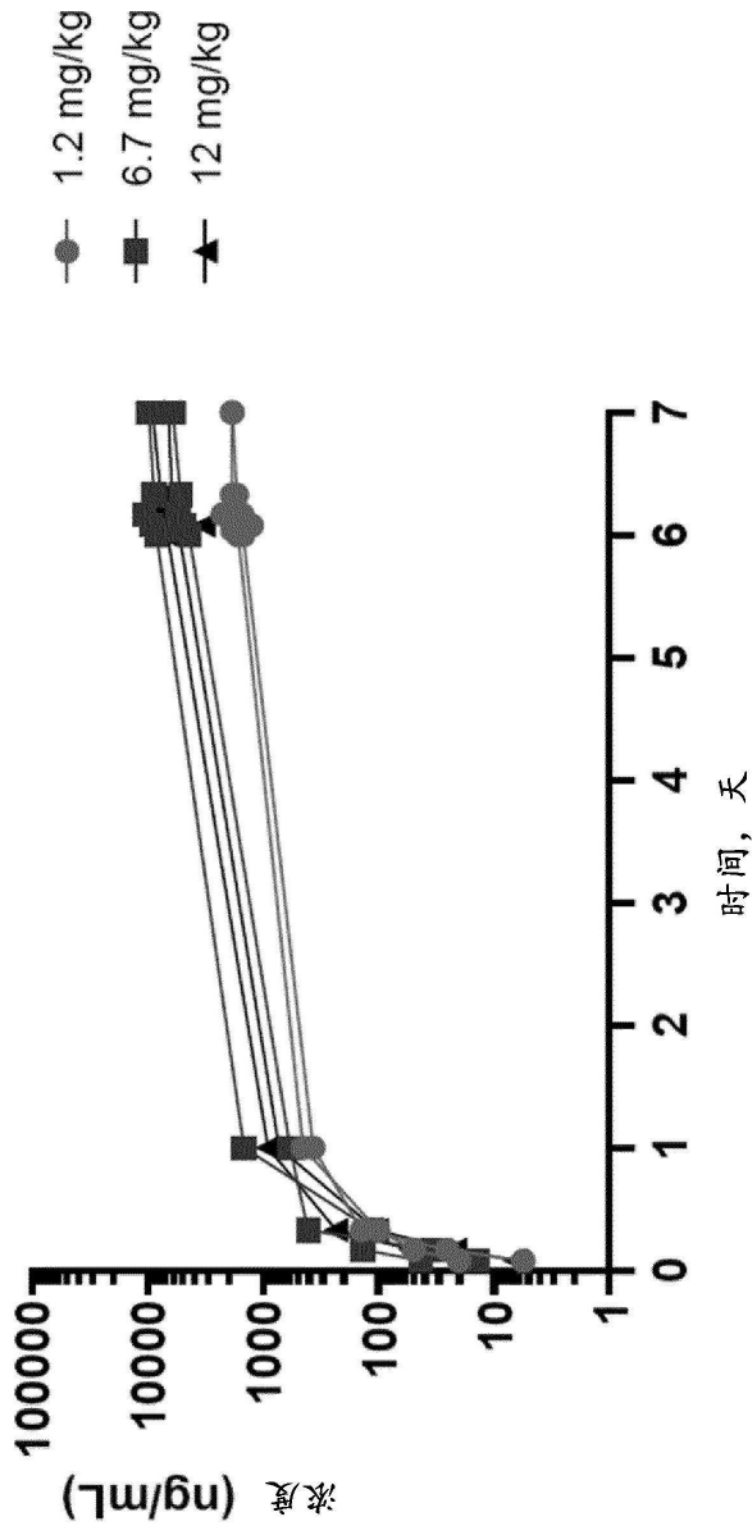


图13

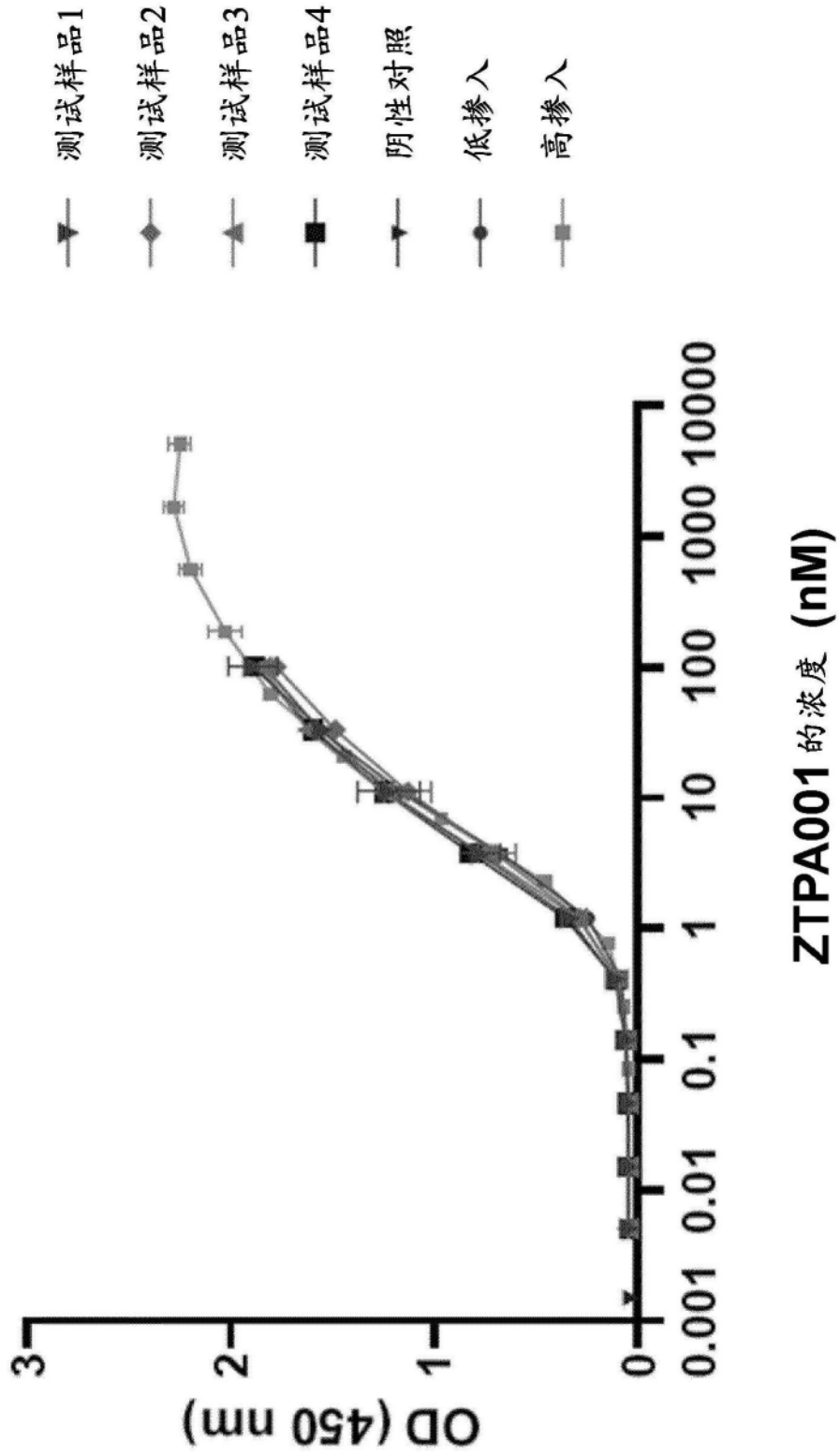


图14