(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118660904 A
(43)申请公布日 2024.09.17

(21)申请号 202280091299.9
(22)申请日 2022.12.22
(30)优先权数据
2021-209975 2021.12.23 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/047366 2022.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/120643 JA 2023.06.29
(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本
(72)发明人 山本阳平 加门北斗 渡边美穗 筒井遥香
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 周蕾 张国梁
(51)Int.Cl.
C07K 14/52(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/19(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)

权利要求书2页 说明书46页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

具有增强的表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体

(57)摘要

本发明涉及具有诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,特别是涉及对诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性重要的氨基酸修饰和氨基酸序列。

CN 118660904 A

1.通过向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加以下至少一个或两个修饰得到的CXCR3配体:

(i)二硫键的引入;和

(ii)N端区域的氨基酸修饰;

其中所述CXCR3配体相对于亲本CXCR3配体具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性。

2.权利要求1所述的CXCR3配体,其中所述亲本CXCR3配体是天然存在的人CXCL10。

3.权利要求2所述的CXCR3配体,其中通过用Cys置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中以下(i)和(ii)中的氨基酸位置对应的氨基酸来引入二硫键:

(i)选自由位置18、14、21、25和41组成的组中的至少一个位置;和

(ii)选自由位置60、55、67、46和56组成的组中的至少一个位置。

4.权利要求1至3中任一项所述的CXCR3配体,其中在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中,从N端起的第18个氨基酸P被C置换,从N端起的第60个氨基酸A被C置换。

5.权利要求1至4中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起的第一个氨基酸是V,N端区域的氨基酸修饰包括氨基酸置换V1Y。

6.权利要求1至5中任一项所述的CXCR3配体,进一步地,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起的第二个氨基酸为P,并且N端区域的氨基酸修饰包括氨基酸置换P2V。

7.权利要求1至权利要求6所述的CXCR3配体,进一步地,其中另外地进行了选自氨基酸置换、缺失和插入的至少一个修饰。

8.权利要求1至7中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体是通过添加R75A修饰至天然存在的人CXCL10的氨基酸序列而获得的CXCL10变体。

9.将亲本CXCR3配体的氨基酸序列的N端氨基酸作为位置1时用Pro置换与氨基酸位置7对应的氨基酸得到的CXCR3配体,其中所述CXCR3配体相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性。

10.多肽,其是将天然存在的人CXCL10的N端氨基酸作为位置1时,用Cys置换与天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中氨基酸位置18和位置60对应的氨基酸而得到的。

11.多肽,其是通过用Tyr置换天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中N端氨基酸(位置1)而得到的。

12.包含下列氨基酸序列的多肽:

(X1)(X2)LSRTVRCT CISISNQ(X3)VN PRSLEKLEIIPASQFCPRVE IIATMKKKG EKRCLNPESK (X4)IKNLLKAVSK ERSK(X5)SP,

其中

(i)(X1)为V或Y,(X2)为P或V,(X3)和(X4)为C,并且(X5)为R或A(SEQ ID NO:53);或

(ii)(X1)为Y,(X2)为P或V,(X3)为P或C,(X4)为A或C,并且(X5)为R或A(SEQ ID NO:54)。

13.多肽,其是将天然存在的人CXCL10的N端氨基酸作为位置1时,用Pro置换与天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中氨基酸位置7对应的氨基酸而得到的。

14.包含权利要求1至9中任一项所述的CXCR3配体或权利要求10至13中任一项所述的

多肽的融合蛋白。

15.分离的核酸,其编码权利要求1至9中任一项所述的CXCR3配体、权利要求10至13中任一项所述的多肽或权利要求14所述的融合蛋白。

16.包含权利要求15所述的核酸的载体。

17.包含权利要求15所述的核酸或权利要求16所述的载体的宿主细胞。

18.增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法,其包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加以下至少一个或两个修饰:

(i)二硫键的引入;和

(ii)N端区域的氨基酸修饰。

19.提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法,其包括将亲本CXCR3配体的氨基酸序列的N端氨基酸作为位置1时,用Pro置换与氨基酸位置7对应的氨基酸。

具有增强的表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体

技术领域

[0001] 本发明涉及CXCR3配体,制备CXCR3配体的方法,CXCR3配体的用途,增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法,以及提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法。

背景技术

[0002] 趋化因子受体CXCR3(也被称为G蛋白偶联受体9(GPR9)和CD183)属于CXC趋化因子受体家族,并且是一种与趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11结合的G蛋白偶联受体(GPCR)。CXCR3主要在活化的T辅助型1(Th1)淋巴细胞和细胞毒性T细胞中表达,但也存在于自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞和B淋巴细胞亚群中。趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11是三种天然存在的CXCR3配体。CXCR3与其配体的相互作用参与引导受体携带细胞到达身体的特定部位,特别是炎症、免疫损伤和免疫功能障碍位点(非专利文献1)。

[0003] CXCL10(C-X-C基序趋化因子10)也被称为“IP10(干扰素γ-诱导蛋白10)”或“小诱导细胞因子B10”,是一种属于CXC亚家族的趋化因子。

[0004] 已知C-X-C基序趋化因子10(CXCL10)通过CXCR3促进T细胞迁移活性。此外,有报道称,直接施用CXCL10至小鼠肿瘤内会增加肿瘤中的T细胞(非专利文献2)。

[0005] C-X-C基序趋化因子11(C-X-C基序趋化因子配体11,CXCL11)是一种C-X-C趋化因子,所述C-X-C基序趋化因子11也被称为I-TAC(干扰素诱导T-细胞α趋化剂)或IP-9(干扰素-γ-诱导蛋白9),并且据说天然存在的CXCL11比天然存在的CXCL10和天然存在的CXCL9与CXCR3的结合更强。(非专利文献3)。

[0006] C-X-C基序趋化因子9(C-X-C基序趋化因子配体9,CXCL9)是一种C-X-C趋化因子,所述C-X-C基序趋化因子9也被称为γ-干扰素诱导的单核因子(MIG)。

[0007] 已知趋化因子与糖胺聚糖(GAG)以及GPCR结合。所述糖胺聚糖数量丰富,例如在上皮细胞表面,趋化因子被认为通过与所述糖胺聚糖结合而定位在所述上皮细胞表面位置。通过与糖胺聚糖结合而定位的趋化因子处于与糖胺聚糖结合和解离之间的平衡状态,而解离的趋化因子被认为通过与GPCR结合从而发挥功能(非专利文献4)。

[0008] 已知与GAG的结合也是CXCL10发挥功能的关键。据报道,将位置12、14、20和25处的氨基酸置换为K或R的修饰可以增强CXCL10与GAG的结合活性,从而增强T细胞的迁移。(PTL 1:ANTAGONIS BIOTHERAPEUTICS GMBH,WO2021/038033)(NPL 5:Gerlza,Nagele et al.2019)。

[0009] 引用列表

[0010] 专利文献

[0011] [PTL1]WO2021/038033

[0012] 非专利文献

[0013] [NPL1]Tokunaga,R et al.,Cancer Treat Rev(2017)63:40-47.

[0014] [NPL2]Rainczuk,A.et al.,Int J Cancer(2014)134(3):530-541.

[0015] [NPL3]Aguilera-Duran,G et al.,Molecules(2020)25(19).

[0016] [NPL4]Graham,G.J.et al.,Trends Immunol(2019)40(6):472-481.

[0017] [NPL5]Gerlza,T.,M et al.,Protein Eng Des Sel(2019)31;32(8):367-373

发明内容

[0018] 技术问题

[0019] 本公开提供CXCR3配体,制备所述CXCR3配体的方法,使用所述CXCR3配体的方法。本公开还提供了增强CXCR3配体诱导表达CXCR3细胞迁移的活性的方法,以及提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法。

[0020] 问题的解决方案

[0021] 本发明人发现对增强CXCR3表达细胞迁移诱导活性重要的CXCR3配体的氨基酸修饰和氨基酸序列。此外,本发明人发现了提高CXCR3配体在血液中稳定性的氨基酸修饰。

[0022] 本公开具体包括以下示例的实施方案:

[0023] [A]

[0024] (A1)相对于亲本CXCR3配体,具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中至少以下一个或两个修饰添加至所述亲本CXCR3配体的氨基酸序列:(i)二硫键的引入和(ii)N端区域的氨基酸修饰;

[0025] (A2)根据(A1)所述的CXCR3配体,其中所述亲本CXCR3配体具有C-X-C基序;

[0026] (A3)根据(A2)所述的CXCR3配体,其中C-X-C基序为C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys);

[0027] (A4)根据(A1)至(A3)中任一项所述的CXCR3配体,其中所述亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的至少一部分;

[0028] (A5)根据(A4)中所述的CXCR3配体,其中天然存在的人CXCR3配体为天然存在的人CXCL10;

[0029] (A6)根据(A4)或(A5)所述的CXCR3配体,其中二硫键的引入的位点是除亲本CXCR3配体β-折叠区域以外的位点;

[0030] (A7)根据(A2)至(A6)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体具有三条β链,其中二硫键是通过用Cys置换亲本CXCR3配体的氨基酸序列中选自以下的任意两个区域中含有的至少一个氨基酸中的每一个而形成的:

[0031] (i)C-X-C基序和位于最靠近N端侧的第一β链之间的第一环;

[0032] (ii)第一β链和位于第二最靠近N端侧的第二β链之间的第二环;和

[0033] (iii)第二β链和位于第三最靠近N端侧的第三β链之间的第三环。

[0034] (A8)根据(A5)至(A7)中任一项所述的CXCR3配体,其中二硫键是通过用Cys置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中下列(i)和(ii)的氨基酸位置对应的氨基酸而引入CXCR3配体的:

[0035] (i)选自由位置18、14、21、25和41组成的组中的至少一个位置;和

[0036] (ii)选自由位置60、55、67、46和56组成的组中的至少一个位置;

[0037] (A9)根据(A5)至(A8)中任一项所述的CXCR3配体,其中将二硫键引入对应于天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中选自由下列氨基酸位置的组合组成的组中的至少一个的氨基酸位置:

[0038] (i)第18位和第60位;

[0039] (ii)第14位和第55位;

[0040] (iii)第21位和第67位;

[0041] (iv)第25位和第46位;以及

[0042] (v)第41位和第56位;

[0043] (A10)根据(A5)至(A9)中任一项所述的CXCR3配体,其中二硫键引入对应于天然存在的人CXCL10氨基酸序列中位置18和60的氨基酸位置;

[0044] (A11)根据(A1)至(A10)中任一项所述的CXCR3配体,其中用Cys置换亲本CXCR3配体氨基酸序列中第18和60位的氨基酸;

[0045] (A12)根据(A1)至(A11)中任一项所述的CXCR3配体,其中在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起第18个氨基酸P被C置换,并且第60个氨基酸A被C置换;

[0046] (A13)根据(A2)至(A12)中任一项所述的CXCR3配体,其中N端区域的氨基酸修饰是置换亲本CXCR3配体中比C-X-C基序更靠近N端的氨基酸;

[0047] (A14)根据(A5)至(A13)中任一项所述的CXCR3配体,其中N端区域的氨基酸修饰是对应于天然存在的人CXCL10氨基酸序列中位置1和8之间氨基酸位置处的氨基酸置换;

[0048] (A15)根据(A1)至(A14)中任一项所述的CXCR3配体,其中N端区域的氨基酸修饰是用Y、F、H、T和M中的任意一个置换N端区域的氨基酸;

[0049] (A16)根据(A1)至(A15)中任一项所述的CXCR3配体,其中N端区域氨基酸的修饰是用Tyr置换亲本CXCR3配体氨基酸序列中第1位的氨基酸;

[0050] (A17)根据(A1)至(A16)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起第一个氨基酸为V,并且在N端区域的氨基酸修饰包含V1Y的氨基酸置换;

[0051] (A18)根据(A1)至(A17)中任一项所述的CXCR3配体,进一步地其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起第二个氨基酸为P,并且对N端区域的氨基酸修饰包含P2V的氨基酸置换;

[0052] (A19)根据(A1)至(A18)中任一项所述的CXCR3配体,进一步地其中进行选自氨基酸置换、缺失和插入中的至少一个修饰;

[0053] (A20)相对于包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体,具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中用Cys置换天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第18位氨基酸和第60位氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0054] (A21)根据(A20)所述的CXCR3配体,进一步地其中用Tyr置换天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第1位对应的位置处的氨基酸;

[0055] (A22)相对于包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体,具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中用Tyr置换天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第1位对应的位置处的氨基酸;

[0056] (A23)根据(A20)至(A22)中任一项所述的CXCR3配体,进一步地其中,在CXCR3配体中用Val置换天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第2位氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0057] (A24)根据(A1)至(A23)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性;

[0058] (A25)根据(A1)至(A24)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体是通过将

R75A修饰添加到天然存在的人CXCL10氨基酸序列而产生的CXCL10变体;

[0059] (A26)根据(A1)至(A17)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体氨基酸序列从N端起第7个氨基酸为V,并且N端区域的氨基酸修饰包括V7P氨基酸置换;和

[0060] (A27)根据(A26)中任一项所述的CXCR3配体,由于V7P氨基酸置换,所述CXCR3配体相对于天然存在的人CXCL10或含有天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体,在血液中具有增加的稳定性。

[0061] [B]

[0062] (B1)多肽,其中以天然存在的人CXCL10的N端氨基酸作为位置1时,天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中对应于氨基酸位置18和60的氨基酸被Cys置换;

[0063] (B2)根据(B1)所述的多肽,进一步地其中与天然存在的人CXCL10的位置1对应的氨基酸是Tyr;

[0064] (B3)根据(B1)或(B2)所述的多肽,进一步地其中与天然存在的人CXCL10的位置2对应的氨基酸为Val;

[0065] (B4)多肽,其中天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中N端氨基酸(位置1)被Tyr置换;

[0066] (B5)根据(B4)所述的多肽,进一步地其中与天然存在的人CXCL10的位置2对应的氨基酸为Val;

[0067] (B6)根据(B1)至(B5)所述的多肽,进一步地其中与天然存在的人CXCL10的位置7对应的氨基酸为Pro;

[0068] (B7)多肽,其为CXCR3配体,并且N端具有序列Y-P-L或Y-V-L;

[0069] (B8)多肽,其为CXCR3配体,并且N端具有序列Y-P-L-S-R-T(SEQ ID NO:19)或Y-V-L-S-R-T(SEQ ID NO:20);

[0070] (B9)具有(a1)至(a3)中任一项的氨基酸序列的多肽;

[0071] (a1)SEQ ID NO:4-12中任一项所示的序列;

[0072] (a2)显示出与SEQ ID NO:4-12中任一项所示的序列具有90%或以上序列同一性的序列,且该序列为CXCR3配体;和

[0073] (a3)包含SEQ ID NO:4-12中任一项所示的序列中选自氨基酸置换、插入、缺失和添加的10个或更少的修饰的序列,并且该序列为CXCR3配体;

[0074] (B10)根据(B9)所述的多肽,其中位置1处的氨基酸为Tyr;

[0075] (B11)根据(B9)或(B10)所述的多肽,其中位置18和60处的氨基酸为Cys;

[0076] (B12)根据(B9)至(B11)中任一项所述的多肽,其中位置2处的氨基酸为Val;

[0077] (B13)根据(B9)至(B12)中任一项所述的多肽,其中位置7处的氨基酸为Pro;

[0078] (B14)根据(B1)至(B13)中任一项所述的多肽,进一步地其中与天然存在的人CXCL10位置75对应的氨基酸被Ala置换;

[0079] (B15)根据(B1)至(B14)中任一项所述的多肽,其中所述多肽具有C-X-C基序,并且进一步在C-X-C基序的C端具有(b1)至(b6)中的任一项:

[0080] (b1)SEQ ID NO:4-12中的任一项从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列:

[0081] (b2)SEQ ID NO:25的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;

[0082] (b3)SEQ ID NO:26的从第12个氨基酸到第73个氨基酸的序列;

[0083] (b4)SEQ ID NO:27的从第12个氨基酸到第103个氨基酸的序列;

[0084] (b5)SEQ ID NO:1的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;和

[0085] (b6)SEQ ID NO:28的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;

[0086] (B16)具有以下氨基酸序列的多肽:

[0087] (X1)(X2)LSRTVRCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIAT MKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:53),

[0088] 其中(X1)为V或Y,(X2)为P或V,(X3)和(X4)为C,以及(X5)为R或A;

[0089] (B17)具有以下氨基酸序列的多肽:

[0090] (X1)(X2)LSRTVRCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIAT MKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:54),

[0091] 其中,(X1)为Y,(X2)为P或V,(X3)为P或C,(X4)为A或C,以及(X5)为R或A;

[0092] (B18)根据(B1)至(B17)中任一项所述的多肽,进一步地其中,进行从氨基酸置换、缺失和插入中选择的至少一个修饰;

[0093] (B19)根据(B1)至(B18)中任一项所述的多肽,其具有CXCR3表达细胞迁移诱导活性;

[0094] (B20)根据(B1)至(B19)中任一项所述的多肽,其中所述多肽的CXCR3表达细胞迁移诱导活性等于或大于天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性;

[0095] (B21)根据(B1)到(B20)中任一项所述的多肽,其中所述多肽的CXCR3表达细胞迁移诱导活性大于通过在天然存在的人CXCL10中添加R75A修饰而产生的变体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性;

[0096] (B22)根据(B1)至(B21)中任一项所述的多肽,其中当肽的CXCR3表达细胞迁移诱导活性最大时的所述多肽的浓度等于或低于当天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性最大时的所述天然存在的人CXCL10的浓度;

[0097] (B23)根据(B1)至(B22)中任一项所述的多肽,其中当肽的CXCR3表达细胞迁移诱导活性最大时的所述多肽的浓度低于当变体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性最大时的所述天然存在的人CXCL10的浓度,所述变体为向天然存在的人CXCL10中添加R75A修饰而产生的;

[0098] (B24)根据(B20)至(B23)中任一项所述的多肽,其中所述肽的CXCR3表达细胞迁移诱导活性由细胞迁移率测定;

[0099] (B25)根据(B19)至(B24)中任一项所述的多肽,其中表达CXCR3的细胞为从表达CXCR3的活体中分离出来的转染子或细胞;和

[0100] (B26)根据(B19)至(B25)中任一项所述的多肽,其中表达CXCR3的细胞是表达人CXCR3的细胞。

[0101] [C]

[0102] (C1)分离的核酸,其编码根据[A]的CXCR3配体或根据[B]的多肽;

[0103] (C2)包含根据(C1)所述的核酸的载体;

[0104] (C3)包含根据(C1)所述的核酸或根据(C2)所述的载体的宿主细胞;

[0105] (C4)产生根据[A]的CXCR3配体或根据[B]的多肽的方法,其包括培养根据(C3)的宿主细胞,从而产生CXCR3配体或多肽;

[0106] (C5)根据(C4)所述的方法,其进一步包括从宿主细胞中回收多肽或CXCR3配体;

[0107] (C6)包含根据[A]的CXCR3配体或根据[B]的多肽的融合蛋白;

[0108] (C7)根据(C6)所述的融合蛋白,其中根据[A]的CXCR3配体或根据[B]的多肽与抗体Fc区融合;

[0109] (C8)根据(C7)所述的融合蛋白,其中根据[A]的CXCR3配体或根据[B]的多肽与完整的抗体或抗体片段融合;

[0110] (C9)根据(C7)或(C8)所述的融合蛋白,其中CXCR3配体或多肽与抗体Fc区通过接头融合,或CXCR3配体或多肽与完整抗体或抗体片段通过接头融合;

[0111] (C10)药物组合物,其包含根据[A]的CXCR3配体,根据[B]的多肽或根据(C6)至(C9)中任一项的融合蛋白;和

[0112] (C11)治疗疾病的方法,其包括施用根据[A]的CXCR3配体,根据[B]的多肽或根据(C6)至(C9)中任一项的融合蛋白。

[0113] [D]

[0114] (D1)增强CXCR3配体的CXCR3表达细胞的诱导迁移活性的方法,其包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加以下至少一个或两个修饰:(i)二硫键的引入和(ii)N端区域的氨基酸修饰;

[0115] (D2)根据(D1)所述的方法,其中亲本CXCR3配体具有C-X-C基序;

[0116] (D3)根据(D2)所述的方法,其中C-X-C基序为C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys);

[0117] (D4)根据(D3)所述的方法,其中亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的一部分;

[0118] (D5)根据(D4)所述的方法,其中天然存在的人CXCR3配体是天然存在的人CXCL10;

[0119] (D6)根据(D4)或(D5)所述的方法,其中所述修饰包括引入二硫键,并且引入二硫键的位点是除亲本CXCR3配体的β-折叠区域以外的位点;

[0120] (D7)根据(D2)至(D6)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体具有三条β-链,其中二硫键是通过用Cys置换亲本CXCR3配体的氨基酸序列中选自以下任意两个区域中含有的至少一个氨基酸中的每一个而形成的:

[0121] (i)C-X-C基序和位于最靠近N端侧的第一β链之间的第一环;

[0122] (ii)第一β链和位于第二最靠近N端侧的第二β链之间的第二环;和

[0123] (iii)第二β链和位于第三最靠近N端侧的第三β链之间的第三环;

[0124] (D8)根据(D5)至(D7)中任一项所述的方法,其中通过用Cys置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中下列(i)和(ii)氨基酸位置对应的氨基酸从而引入二硫键:

[0125] (i)选自由位置18、14、21、25和41组成的组中的至少一个位置;和

[0126] (ii)选自由位置60、55、67、46和56组成的组中的至少一个位置;

[0127] (D9)根据(D5)至(D8)中任一项所述的方法,其中将二硫键引入对应于天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中选自由下列氨基酸位置的组合组成的组中的至少一个的氨基酸位置:

[0128] (i)第18位和第60位;

[0129] (ii)第14位和第55位;

[0130] (iii)第21位和第67位;

[0131] (iv)第25位和第46位;以及

[0132] (v)第41位和第56位;

[0133] (D10)根据(D2)至(D9)中任一项所述的方法,其中所述修饰包括N端区域的氨基酸修饰,并且所述N端区域的氨基酸修饰是置换比亲本CXCR3配体的C-X-C基序更靠近N端的氨基酸;

[0134] (D11)根据(D5)至(D10)中任一项所述的方法,其中N端区域的氨基酸修饰是对应于天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中位置1和8之间的氨基酸位置处的氨基酸置换;

[0135] (D12)根据(D1)至(D10)中任一项所述的方法,其中N端区域的氨基酸修饰是用Y、F、H、T和M中的任意一个置换N端区域的氨基酸;

[0136] (D13)根据(D1)至(D12)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列从N端起第一个氨基酸为V,所述方法包括V1Y的氨基酸置换;

[0137] (D14)根据(D1)至(D13)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列从N端起第18个氨基酸为P,第60个氨基酸为A,所述方法包括添加P18C和A60C的氨基酸置换;

[0138] (D15)根据(D1)至(D14)任一项所述的方法,进一步地其中,亲本CXCR3配体的氨基酸序列从N端起的第二个氨基酸为P,并且所述方法包括添加P2V的氨基酸置换;

[0139] (D16)根据(D1)至(D15)中任一项所述的方法,其进一步包括添加选自氨基酸置换、缺失和插入中的至少一个修饰;

[0140] (D17)增强亲本CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法,所述亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分,所述方法包括用Cys置换与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第18个氨基酸和第60个氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0141] (D18)根据(D17)所述的方法,其进一步包括用Tyr置换与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第一个对应的位置处的氨基酸;

[0142] (D19)增强亲本CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法,所述亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分,所述方法包括用Tyr置换与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第一个对应的位置处的氨基酸;

[0143] (D20)根据(D17)至(D19)中任一项所述的方法,其进一步包括用Val置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第二个氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0144] (D21)根据(D1)至(D20)中任一项所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性;

[0145] (D22)根据(D1)至(D21)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体是通过向天然存在的人CXCL10的氨基酸序列添加R75A修饰而产生的CXCL10变体;和

[0146] (D23)根据(D1)至(D22)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列从N端起的第7个氨基酸为V,并且所述方法包括添加V7P的氨基酸置换。

[0147] [E]

[0148] (E1)制备CXCR3配体的方法,所述CXCR3配体相对于亲本CXCR3配体具有增强的CXCR3表达细胞迁移诱导活性,所述方法包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加至少以下一个或两个修饰:(i)二硫键的引入和(ii)N端区域的氨基酸修饰;

[0149] (E2)根据(E1)所述的方法,其中亲本CXCR3配体具有C-X-C基序;

[0150] (E3)根据(E2)所述的方法,其中C-X-C基序为C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys);

[0151] (E4)根据(E2)所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCR3配体序列的氨基酸序列的一部分;

[0152] (E5)根据(E3)所述的方法,其中天然存在的人CXCR3配体是天然存在的人CXCL10;

[0153] (E6)根据(E4)或(E5)所述的方法,其中将二硫键引入除亲本CXCR3配体的β-折叠区域以外的位点;

[0154] (E7)根据(E2)至(E6)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体具有三条β-链,其中二硫键是通过用Cys置换亲本CXCR3配体的氨基酸序列中选自以下的任意两个区域中含有的至少一个氨基酸中的每一个而形成的:

[0155] (i)C-X-C基序和位于最靠近N端侧的第一β链之间的第一环;

[0156] (ii)第一β链和位于第二最靠近N端侧的第二β链之间的第二环;和

[0157] (iii)第二β链和位于第三最靠近N端侧的第三β链之间的第三环;

[0158] (E8)根据(E5)至(E7)中任一项所述的方法,其中二硫键是用Cys置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中下列(i)和(ii)氨基酸位置对应的氨基酸而引入的:

[0159] (i)选自由位置18、14、21、25和41组成的组中的至少一个位置;和

[0160] (ii)选自由位置60、55、67、46和56组成的组中的至少一个位置;

[0161] (E9)根据(E5)至(E8)中任一项所述的方法,其中将二硫键引入对应于天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中选自由下列氨基酸位置的组合组成的组中的至少一个的氨基酸位置:

[0162] (i)第18位和第60位;

[0163] (ii)第14位和第55位;

[0164] (iii)第21位和第67位;

[0165] (iv)第25位和第46位;以及

[0166] (v)第41位和第56位;

[0167] (E10)根据(E1)至(E9)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中第18位的氨基酸为P,第60位的氨基酸为A,所述方法包括P18C和A60C的氨基酸置换;

[0168] (E11)根据(E3)至(E10)中任一项所述的方法,其中N端区域的氨基酸修饰是置换比亲本CXCR3配体的C-X-C基序更靠近N端的氨基酸;

[0169] (E12)根据(E5)至(E11)中任一项所述的方法,其中在天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的位置1和8之间进行N端区域的氨基酸修饰;

[0170] (E13)根据(E1)至(E12)中任一项所述的方法,其中N端区域的氨基酸修饰是用Y、F、H、T和M中的任意一个置换N端区域的氨基酸;

[0171] (E14)根据(E1)至(E13)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列第1位的氨基酸为V,所述方法包括V1Y的氨基酸置换;

[0172] (E15)根据(E1)至(E14)中任一项所述的方法,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列第2位的氨基酸为P,所述方法包括P2V的氨基酸置换;

[0173] (E16)根据(E1)至(E15)中任一项所述的方法,其中CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁

移诱导活性等于或大于天然存在的人CXCR3配体;

[0174] (E17)制备CXCR3配体的方法,所述CXCR3配体相对于包含天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体具有增强的CXCR3表达细胞迁移诱导活性,所述方法包括用Cys置换与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第18个氨基酸和第60个氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0175] (E18)根据(E15)所述的方法,进一步包括用Tyr置换与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中第一个对应的位置处的氨基酸;

[0176] (E19)制备CXCR3配体的方法,所述CXCR3配体相对于包含天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体具有增强的CXCR3表达细胞迁移诱导活性,所述方法包括用Tyr置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第1位对应的位置处的氨基酸;

[0177] (E20)根据(E15)至(E17)中任一项所述的方法,其进一步包括用Val置换与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第二个氨基酸对应的位置处的氨基酸;

[0178] (E21)根据(E1)至(E20)中任一项所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性;

[0179] (E22)根据(E1)至(E21)中任一项所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体是通过向天然存在的人CXCL10的氨基酸序列添加R75A修饰而产生的CXCL10变体;

[0180] (E23)根据(E1)至(E22)中任一项所述的方法,进一步地其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起的第7个氨基酸为V,所述方法包括V7P的氨基酸置换;和

[0181] (E24)根据(E1)至(E23)中任一项的方法制备的CXCR3配体。

[0182] [F]

[0183] (F1)相对于亲本CXCR3配体,具有在血液中提高的稳定性的CXCR3配体,其中以亲本CXCR3配体的氨基酸序列的N端氨基酸为位置1时,对应于氨基酸位置7的氨基酸被Pro置换;

[0184] (F2)根据(F1)所述的CXCR3配体,其中所述亲本CXCR3配体具有C-X-C基序;

[0185] (F3)根据(F2)所述的CXCR3配体,其中C-X-C基序为C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys);

[0186] (F4)根据(F1)至(F3)中任一项所述的CXCR3配体,其中所述亲本CXCR3配体包含天然存在人CXCR3配体的氨基酸序列的至少一部分;

[0187] (F5)根据(F4)中所述的CXCR3配体,其中天然存在的人CXCR3配体为天然存在的人CXCL10;

[0188] (F6)根据(F1)至(F5)中任一项所述的CXCR3配体,其中在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中,从N端起的第7个氨基酸V被P置换;

[0189] (F7)根据(F1)至(F6)中任一项所述的CXCR3配体,其相对于亲本CXC3配体具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性,其中一个或两个修饰:

[0190] (i)二硫键的引入;以及

[0191] (ii)N端区域的氨基酸修饰;

[0192] 被进一步添加至亲本CXCR3配体的氨基酸序列中;

[0193] (F8)根据(F7)所述的CXCR3配体,其中二硫键被引入到与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中的第18位和第60位对应的氨基酸位置;

[0194] (F9)根据(F7)或(F8)所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中第18位和第60位的氨基酸被Cys置换;

[0195] (F10)根据(F7)至(F9)中任一项所述的CXCR3配体,其中在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中,从N端起第18位氨基酸P被C置换,并且第60位氨基酸A被C置换;

[0196] (F11)根据(F7)至(F10)中任一项所述的CXCR3配体,其中N端区域的氨基酸修饰是用Tyr置换亲本CXCR3配体氨基酸序列中第1位的氨基酸;

[0197] (F12)根据(F7)至(F11)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起第一个氨基酸为V,并且N端区域的氨基酸修饰包含V1Y的氨基酸置换;

[0198] (F13)根据(F1)至(F13)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体的氨基酸序列中从N端起第二个氨基酸为P,N端区域的氨基酸修饰包括P2V的氨基酸置换;

[0199] (F14)根据(F1)至(F13)中任一项所述的CXCR3配体,进一步地其中进行从氨基酸置换、缺失和插入中选择的至少一个修饰;

[0200] (F15)根据(F1)至(F14)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性;

[0201] (F16)根据(F1)至(F15)中任一项所述的CXCR3配体,其中亲本CXCR3配体是通过将R75A修饰添加到天然存在的人CXCL10氨基酸序列而产生的CXCL10变体;

[0202] (F17)提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法,其中所述方法包括用Pro替换将亲本CXCR3配体的氨基酸序列中的N端氨基酸作为位置1时对应于氨基酸位置7的氨基酸;

[0203] (F18)根据(F17)所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体包含天然的人CXCL10的氨基酸序列的至少一部分;

[0204] (F19)根据(F17)或(F18)所述的方法,其中所述方法进一步包括添加从氨基酸的置换、缺失和插入中选择的至少一个修饰;

[0205] (F20)制备CXCR3配体的方法,所述CXCR3配体相对于亲本配体具有在血液中增强的稳定性,其中所述方法包括用Pro置换将亲本配体氨基酸序列中的N端氨基酸作为位置1时对应于氨基酸位置7的氨基酸;

[0206] (F21)根据(F20)所述的方法,其中所述亲本CXCR3配体包含天然的人CXCL10的氨基酸序列的至少一部分;

[0207] (F22)根据(F20)或(F21)所述的方法,其中所述方法还包括添加从氨基酸的置换、缺失和插入中选择的至少一个修饰;和

[0208] (F23)根据(F20)至(F22)中任一项方法制备的CXCR3配体。

[0209] [G]

[0210] (G1)多肽,其中在天然存在的人CXCL10或CXCL10变体的氨基酸序列中,用Pro置换将天然存在的人CXCL10的N端氨基酸作为位置1时对应于氨基酸位置7的氨基酸;

[0211] (G2)根据(G1)所述的多肽,进一步地其中用Cys将与天然存在的人CXCL10的位置18对应的氨基酸和与位置60对应的氨基酸置换;

[0212] (G3)根据(G1)或(G2)所述的多肽,其中与天然存在的人CXCL10的位置1对应的氨基酸为Tyr;

[0213] (G4)根据(G1)至(G3)所述的多肽,其中与天然存在的人CXCL10的位置2对应的氨基酸为Val;

[0214] (G5)多肽,其为CXCR3配体,并在N端具有序列Y-P-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:67)、Y-V-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:68)、V-P-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:70)或V-V-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:71);和

[0215] (G6)具有以下氨基酸序列的多肽:

[0216] (X1)(X2)LSRT(X6)RCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:69);

[0217] 其中,(X1)是V或Y,(X2)是P或V,(X3)是P或C,(X4)是A或C,(X5)是R或A,以及(X6)是P。

[0218] [H]

[0219] (H1)分离的核酸,其编码根据[F]的CXCR3配体或根据[G]的多肽;

[0220] (H2)具有根据(H1)所述的核酸的载体;

[0221] (H3)宿主细胞,其包含根据(H1)的核酸或根据(H2)的载体;

[0222] (H4)制备根据[F]的CXCR3配体或根据[G]的多肽的方法,其包括培养根据(H3)的宿主细胞,从而制备CXCR3配体或多肽;

[0223] (H5)根据(H4)所述的方法,其进一步包括从宿主细胞中回收多肽或CXCR3配体;

[0224] (H6)融合蛋白,其包含根据[F]的CXCR3配体或根据[G]的多肽;

[0225] (H7)根据(H6)所述的融合蛋白,其中根据[F]的CXCR3配体或根据[G]的多肽与抗体Fc区融合;

[0226] (H8)根据(H6)所述的融合蛋白,其中根据[F]的CXCR3配体或根据[G]的多肽与完整的抗体或抗体片段融合;

[0227] (H9)根据(H8)所述的融合蛋白,所述完整抗体或抗体片段具有至少一个切割位点,且当在所述完整抗体或抗体片段在至少一个切割位点被切割的状态时,与所述CXCR3配体或多肽的结合减少;

[0228] (H10)根据(H9)所述的融合蛋白,其中,在切割位点被切割的状态下,配体或多肽与完整的抗体或抗体片段分离;

[0229] (H11)根据(H9)或(H10)所述的融合蛋白,其中切割位点包括蛋白酶切割序列;

[0230] (H12)根据(H11)所述的融合蛋白,其中所述蛋白酶为靶组织特异性蛋白酶;

[0231] (H13)(H12)所述的的融合蛋白,所述靶组织为癌症组织或炎症组织,所述靶组织特异性蛋白酶为癌症组织特异性蛋白酶或炎症组织特异性蛋白酶;

[0232] (H14)根据(H11)至(H13)中任一项所述的的融合蛋白,其中所述蛋白酶是选自金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、matriptase和尿激酶(uPA)中的至少一种蛋白酶;

[0233] (H15)根据(H9)至(H14)中任一项所述的融合蛋白,其中在切割位点或蛋白酶切割序列的一端或两端添加柔性接头;

[0234] (H16)根据(H9)至(H15)中任一项所述的融合蛋白,其中完整的抗体或抗体片段具有抗体恒定区、抗体VH和抗体VL,并且切割位点或蛋白酶切割序列位于以下位置中的至少一个位置:

[0235] 抗体恒定区和抗体VH之间的边界附近;和

[0236] 抗体常数区和抗体VL之间的边界附近;

[0237] (H17)根据(H16)所述的融合蛋白,其中切割位点或蛋白酶切割序列插入到以下中的至少一个:

[0238] (i)从抗体VH的第109个氨基酸(Kabat编号)到抗体重链恒定区的第122个氨基酸(EU编号)的序列中的任意位置;和

[0239] (ii)从抗体VL的第104个氨基酸(Kabat编号)到抗体轻链恒定区的第113个氨基酸(EU编号)的序列中的任意位置;

[0240] (H18)根据(H16)或(H17)所述的融合蛋白,其中完整抗体或抗体片段的抗体VL和抗体VH缔合,并且所述缔合通过对切割位点的切割或通过蛋白酶对蛋白酶切割序列的切割而取消;

[0241] (H19)根据(H7)至(H18)所述的融合蛋白,其中CXCR3配体或多肽与抗体Fc区,或者CXCR3配体或多肽与完整抗体或抗体片段通过接头融合;

[0242] (H20)药物组合物,其包含根据[A]的CXCR3配体,根据[B]的多肽或根据(H6)至(H19)中任一项的融合蛋白;和

[0243] (H21)治疗疾病的方法,其中所述方法包括施用根据[A]的CXCR3配体,根据[B]的多肽或根据(H6)至(H19)中任一项的融合蛋白。

附图说明

[0244] 图1显示了一种CXCL10变体的分子结构。图1A显示了两个预先存在的二硫键(常规的S-S键,Cys9-Cys36和Cys11-Cys53)和由两个半胱氨酸置换形成的二硫键(由P18C/A60C置换引入的S-S键)的模型结构(带状模型)。图1B显示了展示实施例1中制备的hCXCL10突变体Fc融合的结构示意图。

[0245] 图2是显示比较CXCL10变体(#1、#5、#6和#7)诱导BaF3/mCXCR3细胞的能力的结果图。表3显示了在每个突变体中引入的一个或多个氨基酸置换。图中纵坐标表示迁移率,横坐标表示趋化因子(CXCL10变体)的浓度(nM)。迁移率计算为下腔室的发光与上腔室加载的细胞总量所获得的发光的相对值,即“发光值/所有细胞的发光值”。

[0246] 图3是显示比较CXCL10变体(#1、#7、#8和#10)诱导BaF3/mCXCR3细胞的能力的结果图。表4显示了在每个突变体中引入的一个或多个氨基酸置换。图中纵坐标表示迁移率,横坐标表示趋化因子(CXCL10变体)的浓度(nM)。迁移率计算为下腔室的发光与上腔室加载的细胞总量所获得的发光的相对值,即“发光值/所有细胞的发光值”。

[0247] 图4是显示比较CXCL10变体(#1、#4、#8和#9)诱导BaF3/mCXCR3细胞的能力的结果图。表5显示了在每个突变体中引入的一个或多个氨基酸置换。图中纵坐标表示迁移速率,横坐标表示趋化因子(CXCL10变体)的浓度(nM)。迁移率计算为下腔室的发光与上腔室加载的细胞总量所获得的发光的相对值,即“发光值/所有细胞的发光值”。

[0248] 图5是显示比较CXCL10变体(#1、#4、#7和#12)诱导BaF3/mCXCR3细胞的能力的结果图。表6显示了在每个突变体中引入的一个或多个氨基酸置换。在图中纵坐标表示迁移速率,横坐标表示趋化因子(CXCL10变体)的浓度(nM)。迁移率计算为下腔室的发光与上腔室加载的细胞总量所获得的发光的相对值,即“发光值/所有细胞的发光值”。

[0249] 图6是显示实施例3中制备的hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体的分子结构的示意图。

[0250] 图7为一组图,其显示了施用抗体(A)hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa00

54-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO,(B)hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO,或(C)hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO后血浆浓度的变化,所述浓度的变化通过每个监测肽进行定量。

[0251] 图8是显示hCXCL10变体:hCXCL10R75A(具有R75A)、hCXCL10R75A.0670(具有V1Y/P2V/P18C/A60A)和hCXCL10R75A.0613(具有V1Y/P2V/V7P/P18C/A60A)的Fc融合的细胞迁移诱导活性的图。

[0252] 图9是显示施用hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h/G7L.R38E-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L.R38E-LTO后血浆浓度的变化的图,所述浓度的变化由每个监测肽进行定量。

具体实施方案

[0253] 在此提供以下定义和详细描述以帮助对本公开的理解。

[0254] 氨基酸

[0255] 在本发明说明书中,每个氨基酸由单字母的代码或三字母的代码,或两者同时表示,例如,由Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、或Val/V表示。

[0256] 氨基酸修饰

[0257] 本领域已知的方法如定点诱变(Kunkeletal.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1985)82,488-492))或重叠延伸PCR,可以恰当地使用于CXCR3配体的氨基酸序列中氨基酸的修饰。本领域已知的几种方法也可以用作氨基酸修饰方法,用于采用天然存在的氨基酸以外的氨基酸置换氨基酸(Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.(2006)35,225-249;and Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(2003)100(11),6353-6357)。例如,还优选使用含有tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct(Protein Express)),所述无细胞翻译系统中非天然存在的氨基酸与和UAG密码子(琥珀密码子)互补的琥珀抑制型tRNA相结合,所述UAG密码子为终止密码子。

[0258] 在本发明说明书中,用于表示氨基酸修饰位点的术语“和/或”旨在包括“和”与“或”适当组合的每一种组合。具体而言,例如,短语“位置33,位置55,和/或位置96处的氨基酸被置换”包括以下氨基酸修饰的变体:

[0259] (a)位置33,(b)位置55,(c)位置96,(d)位置33和55,(e)位置33和96,(f)位置55和96,以及(g)位置33、55和96。或者,短语“位置33,位置55,和/或位置96的氨基酸被置换”为短语“选自由位置33,55和96组成的组中的至少一个(1、2,或3)位置处的氨基酸被置换”的同义词。

[0260] 此外,在本发明说明书中,用于表述氨基酸修饰位点的“与位置X对应的氨基酸”是指当通过插入或缺失等修饰改变氨基酸位置时,将氨基酸序列比对后的同源氨基酸残基。具体地,例如在野生型配体的变体中,将野生型配体的氨基酸序列和变体的氨基酸序列比对后,与野生型配体的氨基酸序列中氨基酸位置的位置X对应的氨基酸是与其同源的氨基酸残基。所述位置可能与所述变体的氨基酸序列中的位置X相同,并且当所述氨基酸位置因插入或缺失而改变时,所述位置可能会有所不同。

[0261] 在本发明说明书中,氨基酸修饰不仅包括改变氨基酸的结构,还包括因突变部分或全部的氨基酸序列而变成不同的氨基酸序列。氨基酸序列的修饰可以通过在编码氨基酸序列的核苷酸序列中引入适当的密码子置换或通过肽合成来制备。氨基酸修饰包括例如从氨基酸序列中缺失和/或插入氨基酸序列中和/或置换氨基酸序列中的残基。当在编码氨基酸序列的核苷酸序列中引入合适的密码子置换后,通过将置换后的核苷酸序列翻译成其编码的肽,就可以得到由置换后的氨基酸序列组成的肽。或者,当置换是通过肽的合成实现时,可以直接得到由置换后的氨基酸序列组成的肽。最终构建体的功能和性质会根据氨基酸的修饰而有所不同。只要最终构建体具备所需的特性,为得到最终构建体可以进行缺失、插入和置换的任意组合。即,在本发明中,氨基酸修饰可以包含选自由氨基酸缺失、插入到氨基酸序列和置换氨基酸序列中残基所组成的组中的任意一个。

[0262] 在本发明说明书中,将修饰前后的氨基酸的单字母的代码或三字母的代码写在代表特定位置数字的前后的表达方式可适当地用于表示氨基酸置换。例如,用于置换CXCR3配体中含有氨基酸的修饰P2A或Pro2Ala,表示将从CXCR3配体的N端起第2位的Pro(在这里也可以表示为从N端起的第2个氨基酸、氨基酸序列的位置2、氨基酸序列的第2个氨基酸等)置换为Ala。具体来说,数字表示从CXCR3配体的N端开始数的氨基酸位置;在数字前面写的氨基酸的单字母代码或三字母代码表示置换前的氨基酸;数字后面的氨基酸单字母代码或三字母代码表示置换后的氨基酸。

[0263] 多肽

[0264] 根据本发明的多肽通常指长度约为4个氨基酸或更长的肽和蛋白质。也就是说,多肽是通过酰胺键连接的一系列肽,或是包含多个通过酰胺键连接的一系列多肽的蛋白质。此外,根据本发明的多肽通常是由人工设计的序列组成的多肽,但并不特别局限于此,并且例如,也可能是源自生物体的多肽。根据本发明的多肽可能是天然存在的多肽、合成多肽、重组多肽等中的任何一种。此外,多肽的片段也包括在根据本发明的多肽中。

[0265] CXCR3

[0266] 趋化因子受体CXCR3(也称为G蛋白偶联受体9(GPR9)和CD183)属于CXC趋化因子家族,是一种可与趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11结合的G蛋白偶联受体。CXCR3主要在活化的T辅助型1(Th1)淋巴细胞中表达,但也存在于自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞和B淋巴细胞亚群中。趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11是三种天然存在的CXCR3配体。CXCR3及其配体的相互作用(以下简称CXCR3轴)参与引导携带受体的细胞到身体的特定部位,特别是炎症、免疫损伤和免疫功能障碍的部位。除非另有说明,本文使用的术语“CXCR3”指任何脊椎动物来源的任何天然CXCR3,包括哺乳动物如灵长类动物(如人类)和啮齿动物(如小鼠和大鼠)。人CXCR3的全部氨基酸序列见Refseq:NP_001495。

[0267] 在特定的实施方案中,CXCR3是天然存在的人CXCR3(SEQ ID NO:51),而表达CXCR3的细胞是表达天然存在的人CXCR3的细胞。

[0268] 趋化因子和CXC趋化因子

[0269] 趋化因子是7-16kDa的同质血清蛋白家族,最初以其诱导白细胞迁移的能力为特征。大多数趋化因子有四个特有的半胱氨酸(Cys),并且可根据前两个半胱氨酸显示的基序,分为C-X-C(或α、CXC)、C-C(或β)、C(或γ)和CX3C(或δ)趋化因子类。两个二硫键在第一和第三半胱氨酸之间以及在第二和第四半胱氨酸之间形成。一般来说,二硫键桥被认为是

必要的。Clark-Lewis和其合作者已经报道,二硫键对于至少CXCL10的趋化因子活性至关重要(Clark-Lewis等人,J.Biol.Chem.269:16075-16081,1994)。

[0270] 根据在第一个半胱氨酸之前的ELR基序(Glu-Leu-Arg)的存在,C-X-C(或α、CXC)亚家族进一步分类为两组:ELR-CXC趋化因子和非ELR-CXC趋化因子(参见,例如Clark-Lewis,上文;和Belperio等人,J.Leukoc.Biol.68:1-8,2000)。CXCL10、CXCL11、CXCL9均为非ELR-CXC趋化因子。

[0271] CXCL10

[0272] CXC基序趋化因子10(C-X-C基序趋化因子配体10,CXCL10)是一种C-X-C趋化因子,也被称为干扰素诱导蛋白-10(IP-10)。它是由干扰素-γ和TNF-α诱导的,并由角质形成细胞、内皮细胞、成纤维细胞和单核细胞产生。CXCL10被认为在将活化的T细胞招募至组织炎症部位中发挥着作用(Dufour,等人,J Immunol.,168:3195-204,2002)。此外,CXCL10可能在过敏反应中发挥作用。所述CXCL10也可能在炎症性脱髓鞘神经病变的发展中发挥作用(Kieseier,等人,Brain 125:823-34,2002)。

[0273] 研究表明,CXCL10可以用于移植后干细胞的移植(Nagasawa,T.,Int.J.Hematol.72:408-11,2000),干细胞的动员(Gazitt,Y.,J.Hematother Stem Cell Res 10:229-36,2001;和Hattori等人,Blood 97:3354-59,2001),以及抗肿瘤免疫的增强(Nomura等人,Int.J.Cancer 91:597-606,2001;以及Mach和Dranoff,Curr.Opin.Immunol.12:571-75,2000)。例如,本领域技术人员已知的在先报告讨论了趋化因子的生物学活性(Bruce,L.等人,Methods in Molecular Biology(2000)vol.138,pp.129-134;Raphaele,B.等人,Methods in Molecular Biology(2000)vol.138,pp.143-148;以及PaulD.Ponath等人,Methods in Molecular Biology(2000)vol.138,pp.113-120)。CXCL10通过结合细胞表面上表达的趋化因子受体CXCR3发挥生理活性(BoothV.等人,Biochemistry.41(33):10418-25)。

[0274] 除非另有说明,本文使用的术语“CXCL10”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CXCL10,包括诸如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的哺乳动物。该术语不是指“全长”、未加工的CXCL10,而是指由于细胞内加工而分泌到细胞外的成熟CXCL10。如本文所用,未经过加工的CXCL10称为CXCL10前体。该术语还包括CXCL10的天然存在的突变体,如剪接突变体和等位基因突变体。天然存在的人CXCL10以CXCL10前体表达(Refseq登陆号:NP_001556),然后以具有SEQ ID NO:25所示的序列的蛋白质形式分泌到细胞外。恒河猴CXCL10前体的完整氨基酸序列通过Refseq登录号:AKK95955表示,小鼠CXCL10前体的完整氨基酸序列通过Refseq登录号:NP_067249表示。表述“动物来源”不仅意味着目标分子是从源自动物的生物材料中分离出来的,还意味着人工合成的蛋白质分子具有与天然CXCL10相同的氨基酸序列。

[0275] 添加了人工氨基酸修饰的天然CXCL10或添加了人工氨基酸修饰的天然存在的CXCL10突变体称为“CXCL10变体”。CXCL10变体也可称为重组CXCL10多肽。

[0276] CXCL11

[0277] C-X-C基序趋化因子11(CXC基序趋化因子配体11,CXCL11)是一种C-X-C趋化因子,也被称为I-TAC(干扰素诱导的T细胞α趋化剂)或IP-9(干扰素-γ-诱导的蛋白9)。IFN-γ和IFN-β,以及IFN-α均可强烈诱导CXCL11基因的表达(Rani MR,The Journal of Biological

Chemistry.271(37):22878-84)。

[0278] CXCL11具有活化T细胞的生物学活性。已知CXCL11通过与细胞表面上表达的趋化因子受体CXCR3结合来发挥其生物学活性,并且据说相较于天然存在的CXCL10和天然存在的CXCL9,天然存在的CXCL11与CXCR3的结合更强(ColeKE.,The Journal of Experimental Medicine.187(12):2009-21;Tensen CP,The Journal ofInvestigative Dermatology.112(5):716-22)。

[0279] 除非另有说明,本文中使用的术语“CXCL11”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CXCL11,包括哺乳动物(如人类)和啮齿动物(如小鼠和大鼠)。这个术语指的不是“全长”、未加工的CXCL11,而是由于细胞内加工而分泌到细胞外的成熟CXCL11。如本文所用,未经过加工的CXCL11称为CXCL10前体。该术语还包括CXCL11的天然存在的突变体,如剪接突变体和等位基因突变体。天然人CXCL11以CXCL11前体(登录号:NP_005400)表达,然后以具有SEQ ID NO:26所示序列的蛋白质的形式分泌至细胞外。

[0280] 添加了人工氨基酸修饰的天然CXCL11或添加了人工氨基酸修饰的天然存在的CXCL11突变体称为“CXCL11变体”。CXCL11变体也可称为重组CXCL11多肽。

[0281] CXCL9

[0282] C-X-C基序趋化因子9(C-X-C基序趋化因子配体9,CXCL9)是一种C-X-C趋化因子,又称γ干扰素诱导的单核因子(MIG)。CXCL9是一种IFN-γ诱导的T细胞趋化剂,并且已知通过与细胞表面上表达的趋化因子受体CXCR3结合发挥其生物学活性。

[0283] 除非另有说明,本文中使用的术语“CXCL9”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CXCL9,包括哺乳动物(如人类)和啮齿动物(如小鼠和大鼠)。该术语不是指“全长”、未加工的CXCL9,而是指由于细胞内加工而分泌到细胞外的成熟CXCL9。如本文所用,未经过加工的CXCL9称为CXCL9前体。该术语还包括CXCL9的天然存在的突变体,如剪接突变体和等位基因突变体。天然人CXCL9以CXCL9前体(登陆号:NP_002407)表达,然后以具有SEQ ID NO:27所示序列的蛋白质的形式分泌至细胞外。

[0284] 添加了人工氨基酸修饰的天然CXCL9或添加了人工氨基酸修饰的天然存在的CXCL9突变体称为“CXCL9变体”。CXCL9变体也可称为重组CXCL9多肽。

[0285] 通过将CXCL10、CXCL11、CXCL9等的部分相互融合制备嵌合蛋白。例如,可以制备将人CXCL11(SEQ ID NO:26)的第1至24个氨基酸残基与人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的第25至77个氨基酸残基相结合的人CXCL10-人CXCL11嵌合蛋白(hITIP)(SEQ ID NO:28)。只要此类嵌合蛋白能与CXCR3结合,其也可以被称为CXCR3配体。

[0286] 添加了进一步的氨基酸修饰的人CXCL10-人CXCL11嵌合蛋白(hITIP)(SEQ ID NO:28),称为“hITIP变体”,所述人CXCL10-人CXCL11嵌合蛋白(hITIP)中,人CXCL11(SEQ ID NO:26)的第1至24个氨基酸残基与人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的第25至77个氨基酸残基相结合。

[0287] 相互作用

[0288] 在与靶蛋白上特定氨基酸残基相互作用的化合物(例如肽化合物)的背景下,“相互作用”指非共价相互作用,例如氢键、离子键、疏水相互作用和范德华相互作用,或通过如水分子等其他分子形成的键。在本说明书中,当氨基酸残基中包含的非氢原子与化合物中包含的非氢原子之间的原子间距离(当键是通过其他分子,例如水分子,到其他分子的原子

间距离)为4埃(Å)或更小时,可以确定蛋白质和化合物中的特定氨基酸残基具有相互作用。原子间距离可以通过使用X射线分析仪和结构分析软件测定。

[0289] “相互作用的变化”是指非共价相互作用或通过其他分子(如水分子)形成键的模式不同。示例包括相互作用的残基之间距离的变化,不同残基的变化,所涉及的键类型的变化(例如,从氢键到离子键),等等。

[0290] 趋化因子活化受体

[0291] 趋化因子对受体的活化通过两步模型解释。第一步是受体结合步骤,其中配体与受体的N端区域结合。接下来第二步是活化步骤,受体的结构通过配体的N端区域与受体之间的相互作用被诱导为活性形式。受体的活化也被认为遵循C-X-C趋化因子的两步模型。

[0292] 第一步中对结合至关重要的配体区域称为对接结构域,由从C-X-C趋化因子中保守的半胱氨酸对(C-X-C基序)到β-链1(第一β-链)的N环(第一环)、β-链1与β-链2(第二β-链)之间的30s环(第二环)和β-链2与β-链3(第三β-链)之间的40s环(第三环)形成。如上所述,C-X-C趋化因子如CXCL10具有三条β-链:第一β-链位于最靠近N端侧,β-链2位于第二最靠近N端侧,β-链3位于第三最靠近N端侧。

[0293] 在第二步中,配体的N端区域称为触发结构域,与CXCR3的跨膜区域相互作用并诱导受体成为活化的结构。由于配体的N端区域直接导致受体的结构变化,因此已知该部分氨基酸残基的置换或缺失会降低受体的活化效率(Booth,Keizer等人2002,Clark-Lewis,Mattioli等人2003,Booth,Clark-Lewis等人2004,Allen,Crown等人2007,Aguilera-Duran和Romo-Mancillas 2020)。

[0294] 在本发明说明书中,CXCR趋化因子的N端区域是比C-X-C基序更靠近N端一侧的区域。即,N端区域的氨基酸是位于比CXC趋化因子中保守的半胱氨酸对的比N端侧的C更靠近N端侧的氨基酸。例如,当CXCR趋化因子是天然存在的CXCL10或其变体时,N端区域的氨基酸是氨基酸位置1至8处的氨基酸。

[0295] 已知配体的空间结构在第一步中是与受体结合的关键。

[0296] X-C基序趋化因子配体1(X-C基序趋化因子1、X-C基序趋化因子配体1或XCL1)是一种趋化因子(其受体为XCR1),有助于树突状细胞和T细胞的活化。XCL1在N端区域缺乏半胱氨酸残基,并且在一个分子中只形成一个二硫键,所述N端区域在其他趋化因子家族中是保守的。趋化因子通常具有由三条β-链和一个α-螺旋形成的趋化因子折叠(α+β折叠)的空间结构。同时,由于缺乏二硫键,XCL1具有比其他趋化因子家族更不稳定的空间结构,已知所述XCL1在可以结合并活化受体的趋化因子形式和不能结合并活化受体的替代形式之间处于平衡状态(Dishman,Tyler等人2021)。鉴于此,有报道通过引入一个额外的二硫键至XCL1中来修饰XCL1,从而使趋化因子折叠像其他趋化因子一样优选形成的技术。经修饰的XCL1(其中另外引入二硫键),显示能够以相对于野生型XCL1更低的浓度活化表达XCL1的细胞,并在小鼠皮下施用时在施用部位蓄积大量表达XCL1的树突状细胞(Tuinstra,Peterson等人2007,Matsuo,Kitahata等人2018)。

[0297] 虽然没有直接提到,但XCL1的结构固定能够增强活性可以用蛋白质-蛋白质相互作用中的构象选择模型来解释。在该模型中,蛋白质被认为在溶液中具有一定程度的灵活性,并且只有当每个蛋白质的结构达到适合结合的状态后,才能与它们的配偶体结合。因此,如果蛋白质的结构可以固定在接近键合结构的状态,则可以促进蛋白质的结合(Boehr,

Nussinov等人2009)。

[0298] 相比之下,CXCR3配体例如CXCL10,在N端区域具有半胱氨酸残基,并具有由三条β-链和一个α-螺旋形成的趋化因子折叠(α+β折叠)的空间结构。没有观察到像XCL1这样的替代折叠。因此,引入一种对于增强XCL1活性有用的二硫键,对于增强CXCL10的活性似乎没有太大作用。

[0299] 本发明的发明人考虑了N端区域、C端α-螺旋区域和以N环为中心的对接结构域局部处于与CXCR3结合的结构和不与CXCR3结合的结构之间平衡状态的可能性,并基于构象选择,研究了在CXCL10中稳定这些区域至与CXCR3结合状态的修饰。

[0300] 在第二步活化中,配体的N端区域与受体的跨膜区域相互作用,并且相互作用诱导受体的结构变化和活化。因此,配体的N端区域是一个极大地影响受体活化的区域。

[0301] 已知在许多情况下,该区域被切割的配体会失去活性。同时,也有报道称诸如CXCL8、CCL3L1的一些趋化因子的原始序列处于无活性状态,并且在被蛋白酶切割后转变为活性状态。基于这样的背景,蛋白酶对趋化因子N端区域的切割被认为是调节趋化因子活性的原因(Allen,Crown等人2007,Mortier,Van Damme等人2008)。

[0302] 趋化因子N端区域的切割对与受体结合的影响较小。因此,该区域可以被认为是一个不依赖于与受体结合而调节趋化因子活性的区域。

[0303] 包括上述文献在内,有许多关于将趋化因子从无活性状态转化为活性状态的技术报道。此外,已知通过切割CXCL10的N端使CXCL10失活(Proost,Schutyser等人2001,Repnik,Starr等人2015)。然而,据作者所知,还没有报道显示修饰可以增强活性。

[0304] 从活化模式可以清楚地看出,在活化步骤中,残基的修饰对配体的N端区域和受体之间相互作用至关重要,所述残基的修饰会由于结构变化的诱导不足而导致活性降低。同时,通过置换已经参与相互作用的残基难以实现更强烈地诱导处于活化状态的结构的修饰。

[0305] 本发明的发明人认为,通过调节N-末端区域的疏水性和侧链的大小可以稳定有助于活化步骤的N-末端区域渗透进入跨膜区域和随后的相互作用,并尝试搜寻N-末端区域的氨基酸残基的置换。

[0306] (引用的参考文献)

[0307] Allen,S.J.,S.E.Crown and T.M.Handel(2007)."Chemokine:receptor structure,interactions,and antagonism."Annu Rev Immunol 25:787-820.

[0308] Boehr,D.D.,R.Nussinov and P.E.Wright(2009)."The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition."Nat Chem Biol 5(11):789-796.

[0309] Booth,V.,I.Clark-Lewis and B.D.Sykes(2004)."NMR structure of CXCR3 binding chemokine CXCL11(ITAC)."Protein Sci 13(8):2022-2028.

[0310] Booth,V.,D.W.Keizer,M.B.Kamphuis,I.Clark-Lewis and B.D.Sykes(2002)."The CXCR3 Binding Chemokine IP-10/CXCL10:Structure and Receptor Interactions."Biochemistry 41(33):10418-10425.

[0311] Clark-Lewis,I.,I.Mattioli,J.H.Gong and P.Loetscher(2003)."Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its

ligands."J Biol Chem 278(1):289-295.

[0312] Dishman,A.F.,R.C.Tyler,J.C.Fox,A.B.Kleist,K.E.Prehoda,M.M.Babu,F.C.Peterson and B.F.Volkman(2021)."Evolution of fold switching in a metamorphic protein."Science 371(6524):86-90.

[0313] Matsuo,K.,K.Kitahata,F.Kawabata,M.Kamei,Y.Hara,S.Takamura,N.Oiso,A.Kawada,O.Yoshie and T.Nakayama(2018)."A Highly Active Form of XCL1/Lymphotactin Functions as an Effective Adjuvant to Recruit Cross-Presenting Dendritic Cells for Induction of Effector and Memory CD8(+)TCells."Front Immunol 9:2775.

[0314] Mortier,A.,J.Van Damme and P.Proost(2008)."Regulation of chemokine activity by posttranslational modification."Pharmacol Ther 120(2):197-217.

[0315] Proost,P.,E.Schutyser,P.Menten,S.Struyf,A.Wuyts,G.Opdenakker,M.Detheux,M.Parmentier,C.Durinx and A.-M.Lambeir(2001)."Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis,while preserving antiangiogenic properties."Blood,The Journal of the American Society of Hematology 98(13):3554-3561.

[0316] Repnik,U.,A.E.Starr,C.M.Overall and B.Turk(2015)."Cysteine Cathepsins Activate ELR Chemokines and Inactivate Non-ELR Chemokines."JBiol Chem 290(22):13800-13811.

[0317] Tuinstra,R.L.,F.C.Peterson,E.S.Elgin,A.J.Pelzek and B.F.Volkman(2007)."An Engineered Second Disulfide Bond Restricts Lymphotactin/XCL1to a Chemokine-like Conformation with XCR1 Agonist Activity."Biochemistry46(10):2564-2573.

[0318] 测量CXCR3配体与CXCR3之间结合的方法

[0319] CXCR3配体与CXCR3的结合可以通过众所周知的方法进行评估,诸如FACS,ELISA形式,使用放大发光邻近匀相测定(ALPHA)筛选或表面等离子体共振(SPR)现象的BIACORE方法,或生物层干涉法(BLI)(Octet)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010)。

[0320] 根据ALPHA技术,ALPHA筛选是基于以下原则进行的,该技术使用两个珠,一个供体和一个受体。只有当与供体珠结合的分子和与受体珠结合的分子相互作用,以及两个供珠彼此靠近时,才能检测到发光信号。供体珠中的激光激发光敏剂将环境氧转化为激发态的单线态氧。单线态氧分子在供体珠周围扩散,并且当所述单线态氧分子到达附近的受体珠时,在珠中诱导化学发光反应,从而导致发光。当与供体珠结合的分子不同与受体珠结合的分子相互作用时,由于供体珠产生的单线态氧没有到达受体珠,因此不会发生化学发光反应。

[0321] 例如,生物素标记的CXCR3配体与供体珠结合,谷胱甘肽S转移酶(GST)标记的CXCR3肽与受体珠结合。N端胞外结构域区域(第1至53个氨基酸)或其部分片段(第22至42个氨基酸,Biochemistry(2002)41,10418-10425)可用作CXCR3肽。此外,更理想的是CXCR3的第27位Y残基和/或第29位Y残基已经经历了硫酸化修饰(MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY,Aug.2006,p.5838-5849)。在没有竞争性的未标记的CXCR3配体的情况下,CXCR3配

体和CXCR3肽相互作用产生520-620nm下的信号。未标记的CXCR3配体和标记的CXCR3配体竞争与CXCR3肽的相互作用。由于竞争导致的荧光减少可以定量以测定相对结合亲和力。使用磺基-NHS-生物素或类似物对CXCR3配体,如CXCL10进行生物素化是本领域已知的一种方法。涉及以下的方法可以适当地作为用GST标记CXCR3肽的方法,例如,将编码框内CXCR3肽的多核苷酸与编码GST的多核苷酸融合形成融合基因,在携带允许融合基因表达的载体的细胞等中表达GST融合的CXCR3肽,并使用谷胱甘肽柱纯化GST融合的CXCR3肽。所获得的信号优选使用例如GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software,Inc.,San Diego)软件进行分析,该软件适用于基于非线性回归分析的单点竞争模型。

[0322] 待观察相互作用的物质中的一种物质(CXCR3配体)被固定在传感器芯片的金薄膜上。传感器芯片被来自背面的光照射,从而在金薄膜和玻璃之间的界面上发生全反射。结果,在一部分的反射光中形成了具有反射强度(SPR信号)下降的位点。将待观察相互作用的物质中的另一种物质(分析物,当固定CXCR3配体时全长CXCR3或上述CXCR3肽段用作分析物)倾注在传感器芯片表面,当分析物与CXCR3配体结合时,固定的CXCR3配体分子的质量增加,导致传感器芯片表面溶剂的折射率变化。这种折射率的变化改变了SPR信号的位置(相反,当解离发生时,信号的位置返回)。Biacore系统在纵坐标上绘制上述位移量,即传感器芯片表面的质量变化,并显示质量的时间依赖性变化作为测定数据(传感图)。动力学(缔合速率常数(ka)和解离速率常数(kd))由传感图的曲线确定,解离常数(KD)由两个常数之间的比值确定。抑制测定或平衡分析也优选在BIACOR法中使用。抑制测定的例子在Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010中描述,并且平衡分析的例子在方法Methods Enzymol.2000;323:325-40中描述。使用类似的方法,可以通过将全长CXCR3或上述CXCR3肽固定在传感器芯片的金薄膜上,并将CXCR3配体倾注作为分析物,来测量CXCR3配体与CXCR3的结合。固定在传感器芯片的金薄膜上的全长CXCR3或上述CXCR3肽可以是纯化的蛋白质或肽。或者,也可以使用表达它们的细胞或其细胞膜部分。

[0323] 本公开的CXCR3配体可以特异性结合全长CXCR3或上述CXCR3肽,其解离常数(KD)为100μM,10μM,1μM,100nM,50nM,10nM,5nM,1nM,500pM,400pM,350pM,300pM,250pM,200pM,150pM,100pM,50pM,25pM,10pM,5pM,1pM,0.5pM,或0.1pM或更少。

[0324] 或者,可以基于ELISA原理评估CXCR3配体与固定的全长CXCR3或上述CXCR3肽的结合活性。例如,将全长CXCR3或上述CXCR3肽固定在ELISA板的孔中。使CXCR3配体溶液与孔中固定的全长CXCR3或上述CXCR3肽接触,并且通过与CXCR3配体结合的抗体检测与固定的全长CXCR3或上述CXCR3肽结合的CXCR3配体。或者,将CXCR3配体固定在ELISA板的孔中,使全长CXCR3或上述CXCR3肽溶液与孔中固定的CXCR3配体接触,通过与全长CXCR3或上述CXCR3肽结合的抗体检测与固定的CXCR3配体结合的全长CXCR3或上述CXCR3肽。

[0325] 作为测量CXCR3配体与CXCR3之间结合的一种方法,也有使用放射性同位素标记CXCR3配体的方法。具体来说,制备放射性同位素标记的CXCR3配体,添加至表达CXCR3的细胞中,并孵育。孵育后的样品经过过滤器,将与CXCR3结合的CXCR3配体与细胞一起吸附到过滤器上。可以通过干燥过滤器和测量辐射量来测量吸附在过滤器上的CXCR3配体的量。有报道将该方法应用于CXCL10(Molecular and Cellular Biology,Aug.2006,p.5838-5849,Vol.26,No.15,The Journal of Biological Chemistry Vol.278,No.19,Issue of May 9,pp.17066-17074,2003)。

[0326] 此外,通过测量15N-标记的CXCR3配体的15N-1H HSQC NMR谱和2D NOESY NMR谱,并且比较添加CXCR3肽前后的核磁共振谱,还可以分析CXCR3配体中参与CXCR3结合的残基以及键的强度(Biochemistry,2002,41,10418-10425)。

[0327] CXCR3配体

[0328] 本文使用的术语“CXCR3配体”是指能够与CXCR3结合的分子。例如,含有与CXCR3的配体结合位点相互作用的位点的蛋白质包括在本发明的CXCR3配体中。该术语指的是由于细胞内加工而分泌到细胞外的成熟CXCR3配体,而不是未经过加工的“全长”蛋白质。如本文所使用,那些未经过加工的称为CXCR3配体前体。此外,本发明的CXCR3配体可以以与抗体、抗体Fc区、其他类型的蛋白质如白蛋白或多肽融合的形式存在。在本说明书中,CXCR3配体不仅包括天然存在的CXCR3配体,还包括通过对其添加修饰而产生的重组多肽和重组蛋白。在特定实施方案中,CXCR3配体是可与CXCR3结合的多肽。

[0329] 在具体实施方案中,本说明书提供的CXCR3配体具有诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性。在具体实施方案中,本说明书提供的CXCR3配体具有诱导活化的T辅助型1(Th1)淋巴细胞、细胞毒性T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞、B淋巴细胞亚群以及一些上皮细胞、内皮细胞和Ba/F3细胞等CXCR3表达细胞迁移的活性。

[0330] 靶蛋白引起表达CXCR3的细胞迁移的活性可以使用从表达CXCR3的活体中分离的转染子或细胞来测量。作为一种特定方法的例子,使用表达小鼠CXCR3(mCXCR3)的Ba/F3转染细胞(以下简称BaF3/mCXCR3)和具有5.0μm孔聚碳酸酯膜的HTSTranswell™-96可渗透载体(Permeable Support)(Cat.3387,Corning),以靶蛋白为分析物。将待分析的每种分析物在溶液中的终浓度调整为3nM,10nM,30nM,100nM,300nM,和1000nM的浓度后,将每种溶液的236μL转移至下腔室。接着,以75μL/孔的浓度将BaF3/mCXCR3细胞接种到上腔室,使其为2.0×10^5个细胞/孔,在5%二氧化碳、37℃条件下反应5小时。反应5小时后,将下腔室中100μL溶液转移到测定板中,96孔,带白盖,平底(Cat,3917,Corning)并添加100μLCell Titer-Glo2.0™发光细胞活力测定(Luminescent Cell Viability Assay)溶液(Cat.G9242,Promega)。在室温下反应10分钟后,用Envision(PerkinElmer)测量发光值,以评估细胞向下腔室的迁移水平。迁移到下腔室的细胞数量由发光强度反映。

[0331] 靶蛋白诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性,是通过细胞向Boyden室(transwell)或组织的迁移和侵袭来测量的,即细胞迁移率。

[0332] 在实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是相对于亲本CXCR3配体具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中以下一种或两种修饰:(i)二硫键的引入;(ii)N端区域的氨基酸修饰;至少被添加到亲本CXCR3配体的氨基酸序列上。

[0333] 在具体实施方案中,亲本CXCR3配体具有C-X-C基序。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体具有C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys)作为C-X-C基序。

[0334] 在具体实施方案中,亲本CXCR3配体的氨基酸序列包含天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的至少一部分。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体的氨基酸序列包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的至少一部分。

[0335] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是包含天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体变体。本说明书中提供的CXCR3配体包含天然存在的人

CXCL10的氨基酸序列的一部分。

[0336] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是天然存在的人CXCL10的变体。本说明书中提供的CXCR3配体是将修饰进一步添加至亲本CXCR3配体的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体为天然存在的人CXCL10的变体。例如,本说明书中提供的CXCR3配体是将修饰进一步添加至亲本CXCR3配体的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体为通过赋予天然存在人CXCL10对弗林蛋白酶的抗性而产生的变体。例如,本说明书中提供的CXCR3配体是在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中进一步添加氨基酸修饰以增强相对于亲本CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是通过将R75A修饰添加到天然存在的人CXCL10中以赋予对弗林蛋白酶的抗性而产生的变体。在这种情况下,天然存在的人CXCL10氨基酸序列的一部分是包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列从N端起第75个氨基酸的氨基酸序列。

[0337] 在具体实施方案中,相对于包含部分天然存在的人CXCL10氨基酸序列的亲本CXCR3配体,本说明书中提供的CXCR3配体是具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中与天然存在的人CXCL10氨基酸序列中的第18个氨基酸和第60个氨基酸对应的位置处的氨基酸被Cys置换。在特定实施方案中,CXCR3配体是与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中的第一个对应的位置处的氨基酸进一步被Tyr置换的CXCR3配体。此外,CXCR3配体中与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第二个氨基酸对应的位置处的氨基酸被Val置换。

[0338] 在具体实施方案中,相对于包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体,本说明书中提供的CXCR3配体是具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的CXCR3配体,其中与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第一个对应的位置处的氨基酸被Tyr置换。此外,CXCR3配体中与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中第二个氨基酸对应的位置处的氨基酸可以被Val置换。

[0339] 本说明书中提供的CXCL10变体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性高于亲本CXCR3配体。也就是说,相对于亲本CXCR3配体,本说明书中提供的CXCL10变体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性得到了增强。例如,本说明书中提供的CXCL10变体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性是亲本CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性的110%或更多。

[0340] 当验证本发明的CXCR3配体相对于亲本CXCR3配体具有增强的诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性时,特别地优选包括亲本CXCR3配体作为系统中的对照以分析CXCR3表达细胞迁移诱导活性,并比较获得于同一轮实验的待比较活性的CXCR3配体与对照的荧光强度,因此用于测量的CXCR3细胞处于相同的条件。尽管系统中用于分析CXCR3表达细胞的迁移诱导活性的分析物浓度不受限制,但在3nM,10nM,30nM,100nM,300nM,和1000nM中至少一种浓度下,CXCR3配体的CXCR3表达细胞的迁移诱导活性显示为亲本CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性的110%或更多。

[0341] 当包含CXCR3配体的融合蛋白作为分析物用于分析CXCR3表达细胞迁移诱导活性时,优选将具有与包含CXCR3配体的融合蛋白相似分子形式的亲本CXCR3配体用作对照(即优选使用亲本CXCR3配体而不是本说明书中提供的CXCR3配体制备对照融合蛋白)。

[0342] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性等于或大于天然存在的人CXCR3配体。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体的

CXCR3表达细胞迁移诱导活性等于或高于天然存在的人CXCL10。将天然存在的人CXCR3配体与天然存在的人CXCL10进行如上所述的比较。

[0343] CXCR3表达细胞迁移诱导活性的增强得到了验证,例如,通过测定系统中迁移细胞数量的增加或EC50值的降低。本说明书中CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性的增强得到了验证,例如,通过与亲本CXCR3配体相比在测定系统中增加的迁移细胞数量或降低的EC50值。

[0344] 本说明书中的CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性与亲本CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性相比更高得到了验证,例如,通过与亲本CXCR3配体相比,CXCR3配体在测定系统中更高的迁移细胞数量或与亲本CXCR3配体相比,CXCR3配体中更低的EC50值。

[0345] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性为最大值时的CXCR3配体的浓度低于蛋白质的CXCR3表达细胞迁移诱导活性为最大值时的亲本CXCR3配体的浓度。

[0346] 与天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性相比,本发明的CXCR3配体具有相等或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性得到了验证,例如,通过相对于天然存在的人CXCL10,CXCR3配体在测定系统中具有相等或更高的迁移细胞数量,或通过相对于天然存在的人CXCL10,CXCR3配体具有相等或更低的的EC50值。

[0347] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体的CXCR3表达细胞迁移诱导活性为最大值时的CXCR3配体的浓度低于蛋白质的CXCR3表达细胞迁移诱导活性为最大值时的天然存在的人CXCL10的浓度。

[0348] 增强诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的N端区域的氨基酸修饰,包括,例如,用进一步稳定表达CXCR3的细胞渗透到跨膜区域和随后的相互作用的氨基酸残基置换N端区域的氨基酸残基。增加CXCR3配体相对于亲本CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移活性的N端区域的氨基酸修饰的候选包括,例如,当亲本CXCR3配体是天然存在的人CXCL10或在天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中添加了修饰的CXCL10变体时,将天然存在的人CXCL10从N端起第一个氨基酸残基替换为Y、F、H、T,或M。

[0349] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽的从N端起的第一个氨基酸不是V。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽的从N端起的第二个氨基酸不是P。

[0350] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽的从N端起的第一个氨基酸是Y。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽的从N端起的第二个氨基酸是V。在具体实施方案中,在本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中,亲本CXCR3配体的序列从N端起的第一个V被Y置换。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体包括天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)序列的至少一部分,并且在本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中,天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)或人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的序列从N端起的至少第一个V被Y置换。在这种情况下,天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)的序列的至少一部分是包含天然存在的人CXCL10从N端起的第一和第二个氨基酸的序列。在优选实施方案中,与天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性相比,由这些氨基酸序列组成的CXCR3配体和多肽具有相等或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性。

[0351] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中,天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)或人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的序列从N端起的至少第二个P被V置换。

[0352] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体包括在亲本CXCR3配体的C-X-C基序的N端侧的氨基酸置换。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的至少一部分,本说明书中提供的CXCR3配体包含与天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中位置1和8之间对应的氨基酸位置处的氨基酸置换。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体包括在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中位置1处的氨基酸的置换。

[0353] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽在N端具有序列Y-P-L或Y-V-L。

[0354] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽在N端具有序列Y-P-L-S-R-T(SEQ ID NO:13)或Y-V-L-S-R-T(SEQ ID NO:14)。

[0355] 通过使用MD模拟、蛋白质结构建模等方法预测变体的物理性质值,可以提取增强诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的二硫键的插入位点。与亲本CXCR3配体相比,被修饰为半胱氨酸残基的位置组合被提取为增加变体稳定性的候选位点。

[0356] 与亲本CXCR3配体相比增加变体稳定性的候选位点,也就是修饰为半胱氨酸残基的位置,是除亲本CXCR3配体的b-折叠区以外的位点。在具体实施方案中,通过用半胱氨酸置换CXCR3配体对接结构域中的氨基酸来引入二硫键。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体具有三条b链,二硫键是通过用Cys置换亲本CXCR3配体的氨基酸序列中选自以下的任意两个区域中含有的至少一个氨基酸中的每一个而形成的:(i)C-X-C基序和位于最靠近N端侧的第一b链之间的第一环;(ii)第一b链和位于第二最靠近N端侧的第二b链之间的第二环;以及(iii)第二b链和位于第三最靠近N端侧的第三b链之间的第三环。例如,在第一环中所含的至少一个氨基酸和在第二环中所含的至少一个氨基酸被半胱氨酸置换以在第一环和第二环之间引入二硫键。或者,例如,在第一环中所含的至少一个氨基酸和第三环中所含的至少一个氨基酸被半胱氨酸置换,以在第一环和第三环之间引入二硫键。进一步或者,例如,第二环中所含的至少一个氨基酸和第三环中所含的至少一个氨基酸被半胱氨酸置换以在第二环和第三环之间引入二硫键。

[0357] 例如,当亲本CXCR3配体是天然存在的人CXCL10或修饰已被添加至天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中的CXCL10变体时,修饰为半胱氨酸残基的位置是与亲本CXCR3配体相比增加变体稳定性的候选位点,包括天然存在的人CXCL10的从N端起的第14、18、21、25、41、46、55、56、60,以及67位。当亲本CXCR3配体是天然存在的人CXCL10或修饰已被添加到天然存在的人CXCL10的氨基酸序列中的CXCL10变体时,例如,修饰为半胱氨酸残基的位置的组合是选自人CXCL10的从N端起第14和第55、第18和第60、第21和第67、第25和第46、第41和第56的任意氨基酸组合。

[0358] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的CXCR3配体中选自从N端起第14、第18、第21、第25、第41、第46、第55、第56、第60和第67的至少一个氨基酸为C。

[0359] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的CXCR3配体中选自从N端起的第14和第55、第18和第60、第21和第67、第25和第46、第41和第56的任意氨基酸组合为C。即,优选从上述组合中选择的组合被C置换的氨基酸序列作为本说明书中提供的CXCR3配体。在某个实施

方案中,要引入的置换至少是一对,并且可以从一到五对中任意选择。在优选实施方案中,相对于天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性,由这些氨基酸序列组成的CXCR3配体和多肽具有相等或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性。

[0360] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的CXCR3配体中选自天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)或人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的序列从N端起第14和第55、第18和第60、第21和第67、第25和第46以及第41和第56的任意氨基酸组合中的氨基酸被C置换。

[0361] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽从N端起的第18个氨基酸为C。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体的从N端起的第60个氨基酸为C。在这些情况下,天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)的序列的至少一部分包含天然存在的人CXCL10从N端起的第18和第60个氨基酸。在优选实施方案中,相对于天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性,由这些氨基酸序列组成的CXCR3配体和多肽具有相等或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性。

[0362] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽的从N端起第18个氨基酸不是P。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配的从N端起第60个氨基酸不是A。

[0363] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)或人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的序列中,至少从N端起的第18个P被C置换,从N端起的第60个A被C置换。

[0364] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中亲本CXCR3配体的序列从N端起第18个P被V置换。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)的序列的至少一部分,并且本说明书中提供的CXCR3配体和多肽中天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)或人CXCL10变体(SEQ ID NO:1)的序列从N端起第18位P和第60位A中的至少一个被C置换。在这种情况下,包含天然存在的人CXCL10(SEQ ID NO:25)的序列的至少一部分的氨基酸序列可以是包含从N端起第18位和第60位氨基酸的氨基酸序列。在优选实施方案中,与天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性相比,由这些氨基酸序列组成的CXCR3配体和多肽具有相同或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性。

[0365] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是具有以下氨基酸序列的多肽:

[0366] (X1)(X2)LSRTVRCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIAT MKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:53),其中(X1)为V或Y,(X2)为P或V,(X3)和(X4)和C,以及(X5)为R或A。

[0367] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是具有以下氨基酸序列的多肽:

[0368] (X1)(X2)LSRTVRCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIAT MKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:54),其中(X1)为Y,(X2)为P或V,(X3)为P或C,(X4)为A或C,(X5)为R或A。

[0369] 在特定的实施方案中,本文提供的CXCR3配体具有C-X-C基序。C-X-C基序中包含的两个半胱氨酸均可各自与CXCR3配体中包含的C-X-C基序中含有的那些半胱氨酸以外的半胱氨酸形成二硫键。CXCR3配体中的C-X-C基序可以选自C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)和C-S-C(Cys-Ser-Cys)。

[0370] 在特定的实施方案中,本文提供的CXCR3配体是CXCL10变体、CXCL11变体、CXCL9变体、hITIP变体和由这些变体制备的嵌合蛋白中的任一个。

[0371] 在特定的实施方案中,本文提供的CXCR3配体和多肽具有以下序列(b1)至(b7)中的任一个:

[0372] (b1)SEQ ID NO:4至12中任一项所示的序列;

[0373] (b2)与SEQ ID NO:1具有90%或更高同一性的序列;

[0374] (b3)与SEQ ID NO:25具有90%或更高同一性的序列;

[0375] (b4)与SEQ ID NO:26具有90%或更高同一性的序列;

[0376] (b5)与SEQ ID NO:27具有90%或更高同一性的序列;

[0377] (b6)与SEQ ID No:28具有90%或更高同一性的序列;和

[0378] (b7)包含对选自SEQ ID NO:1、4至12和25至28的序列10个或更少的氨基酸置换、插入或缺失的序列。

[0379] 在优选实施方案中,与天然存在的人CXCL10的CXCR3表达细胞迁移诱导活性相比,这些CXCR3配体和多肽具有相同或更高的CXCR3表达细胞迁移诱导活性。

[0380] 在特定的实施方案中,本文提供的CXCR3配体和多肽具有与SEQ ID NO:1、4至12和25至28的序列中任一项显示90%或更高序列同一性、95%或更高序列同一性、96%或更高序列同一性、97%或更高序列同一性、98%或更高序列同一性、或99%或更高序列同一性的序列。

[0381] 在一个实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体,是当将亲本CXCR3配体氨基酸序列中的N端氨基酸作为位置1时,与氨基酸位置7对应的氨基酸被Pro置换,并且相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体的氨基酸序列包含天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的至少一部分。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体的氨基酸序列包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的至少一部分。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的一部分的亲本CXCR3配体的变体。本说明书中提供的CXCR3配体包含天然存在的人CXCL10的氨基酸序列的一部分。在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是天然存在的人CXCL10的变体。本说明书中提供的CXCR3配体是将修饰进一步添加至亲本CXCR3配体的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是天然存在的人CXCL10的变体。

[0382] 例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体具有在血液中提高的稳定性的CXCR3配体是在亲本CXCR3配体上添加了进一步修饰的变体,所述亲本CXCR3配体是通过向天然存在的人CXCL10添加用于增强CXCR3表达细胞迁移诱导活性的氨基酸修饰而产生的变体。例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体,是在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中添加了用于提高相对于亲本CXCR3配体在血液中稳定性的进一步氨基酸修饰的变体,所述亲本CXCR3配体是以下任一或两个修饰至少添加到天然存在的人CXCR10的变体:(i)二硫键的引入;(ii)N端区域的氨基酸修饰;所述修饰是用于增强CXCR3表达细胞迁移诱导活性的氨基酸修饰。

[0383] 例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体是在亲本CXCR3配体上添加了进一步修饰的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是通过赋予天然存在的人CXCL10对DPPIV切割的抗性而产生的变体。例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体,是在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中添加了用于提高相对于亲本CXCR3配体在血液中稳定性的进一步氨基酸修饰的

CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是通过将P2V修饰添加到天然存在的人CXCL10以赋予对DPPIV切割的抗性产生的变体。

[0384] 例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体是在亲本CXCR3配体上添加了进一步修饰的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是通过赋予天然存在的人CXCL10对弗林蛋白酶的抗性而产生的变体。例如,本说明书中提供的相对于亲本CXCR3配体在血液中具有提高的稳定性的CXCR3配体,是在亲本CXCR3配体的氨基酸序列中添加了用于提高相对于亲本配体在血液中稳定性的进一步氨基酸修饰的CXCR3配体,所述亲本CXCR3配体是通过将R75A修饰添加到天然存在的人CXCL10中以赋予对弗林蛋白酶的抗性而产生的变体。

[0385] 在具体实施方案中,本公开的CXCR3配体是含有以下一个或多个修饰的CXCR3配体:用于提高相对于亲本CXCR3配体在血液中稳定性的氨基酸修饰;增强CXCR3表达细胞迁移诱导活的氨基酸修饰性;用于赋予对DPPIV切割的抗性的氨基酸修饰;以及赋予弗林蛋白酶抗性的氨基酸修饰。

[0386] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是CXCR3配体,并且是在N端具有序列Y-P-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:67)、Y-V-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:68)、V-P-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:70)或V-V-L-S-R-T-P(SEQ ID NO:71)的多肽。

[0387] 在具体实施方案中,本说明书中提供的CXCR3配体是具有以下氨基酸序列的多肽:

[0388] (X1)(X2)LSRT(X6)RCTCISISNQ(X3)VNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGEKRCLNPESK(X4)IKNLLKAVSKERSK(X5)SP(SEQ ID NO:69),

[0389] 其中,(X1)是V或Y,(X2)是P或V,(X3)是P或C,(X4)是A或C,(X5)是R或A,以及(X6)是P。

[0390] CXCR3配体突变体

[0391] 在具体实施方案中,考虑了本文提供的CXCR3配体的氨基酸序列突变体。可以通过在编码CXCR3配体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备CXCR3配体的氨基酸序列突变体。这些修饰包括,例如,CXCR3配体的氨基酸序列中残基的缺失、和/或插入和/或置换。只要最终的构建体具备所需的特性(例如,引起CXCR3表达细胞的迁移的活性),可以进行缺失、插入和置换的任何组合以获得所述最终的构建体。

[0392] 置换、插入和缺失突变体

[0393] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的CXCR3配体突变体。表1在“优选的置换”的标题下显示了保守的置换。表1在“示例性置换”的标题下提供了更实质性的变化,并在下面参考氨基酸侧链类别进一步描述。可以将氨基酸置换引入目的CXCR3配体中,并且可以筛选产物以获得所需的活性,例如保留的/提高的引起CXCR3表达细胞的迁移的活性。

[0394] [表1]

[0395]

原始的残基	示例性置换	优选的置换
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn((N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu

Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu((E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0396] 氨基酸可以根据共同的侧链性质进行分组:

[0397] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0398] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0399] (3)酸性:Asp、Glu;

[0400] (4)碱性:His,Lys,Arg;

[0401] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0402] (6)芳香族:Trp,Tyr,Phe。

[0403] 非保守置换需要将这些类之一中的成员置换为另一类。

[0404] 在特定的实施方案中,可实施关于置换、插入或缺失的一个或多个修饰,只要这样的修饰不会显著降低CXCR3配体的能力即可。在一个特定的实施方案中,上述的CXCR配体突变体包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰。

[0405] 当向CXCR3配体添加了修饰时,本公开中鉴定的氨基酸位置优选通过比对修饰前的氨基酸序列和修饰后的氨基酸序列以鉴定同源氨基酸残基来进行调整。例如,与天然存在的人CXCL10变体的从N端起第18位和第60位对应的氨基酸位置指的是假设通过修饰除第18位和第60位氨基酸被置换外,没有任何氨基酸位置的改变或移位时,变体的氨基酸位置中的位置。例如,当通过插入一个或多个氨基酸将氨基酸位置值改变为大于第18位的氨基酸位置时,在减少插入的一个或多个氨基酸的数量后计算所述氨基酸位置。例如,当通过缺失一个或多个氨基酸将氨基酸位置值改变为小于第18或第60位的氨基酸位置时,在增加缺失的一个或多个氨基酸的数量后计算所述氨基酸位置。

[0406] 当向CXCR3配体添加修饰时,在本公开中鉴定的氨基酸位置可以在在变体的氨基酸序列中被鉴定。

[0407] 氨基酸序列同一性

[0408] 对于参考多肽序列而言,“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在比对序列并引

入空位(如有必要)以实现最大百分比序列同一性,并且不将任何保守置换视为序列同一性的一部分之后,候选序列中氨基酸残基与参考多肽序列中氨基酸残基相同的百分比。用于测定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)软件或GENETYX(注册商标)(GENETYXCo.,Ltd)。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较的全长序列中为实现最大比对所需的任何算法。

[0409] ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.编写,源代码已在华盛顿特区美国版权局(U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559)以用户文档的形式提交,注册号为美国版权注册号TXU510087。ALIGN-2程序可以从Genentech,Inc.,加利福尼亚州南旧金山公开获得,或者可以从源代码编译。应该编译ALIGN-2程序以便在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设置,并且不会发生变化。

[0410] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对、与或相对于给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(换句话可以表述为给定氨基酸序列A具有或包含对、与、或相对于给定氨基酸序列B的某个%氨基酸序列同一性)计算如下:

[0411] 100乘以分数X/Y

[0412] 其中X是在A和B的程序的比对中通过比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基的数量,Y为B中氨基酸残基的总数。应当认识到,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,否则使用ALIGN-2计算机程序如上一段所述获得本文所用的所有%氨基酸序列同一性值。

[0413] 增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法

[0414] 本公开还涉及增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法。本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法包括修饰亲本CXCR3配体的序列。在一个具体的实施方案中,本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法包括修饰亲本CXCR3配体的序列的N端区域的氨基酸。在具体实施方案中,本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法包括向亲本CXCR3配体的序列中引入二硫键。

[0415] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体具有C-X-C基序。在具体实施方案中,C-X-C基序是C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)或C-S-C(Cys-Ser-Cys)。

[0416] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体包括天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的一部分。在具体实施方案中,天然存在的人CXCR3配体是天然存在的人CXCL10。

[0417] 在具体实施方案中,在本说明书提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体的从N端起的第一个氨基酸是V。在具体实施方案中,在本说明书提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体的从N端起的第二个氨基酸为P。在更具体的实施方案中,在本说明书提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体的N端序列为V-P-L或V-V-L。在另一个具体实施方案中,在本说明书提供的增强CXCR3配体诱导表达

CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体的N端序列为V-P-L-S-R-T(SEQ ID NO:19)或V-V-L-S-R-T(SEQ ID NO:20)。

[0418] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体具有C-X-C基序。C-X-C基序中包含的两个半胱氨酸可以独立地与除亲本CXCR3配体所含C-X-C基序中的那些半胱氨酸之外的半胱氨酸形成二硫键。亲本CXCR3配体中的C-X-C基序可以选自C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)和C-S-C(Cys-Ser-Cys)。在具体实施方案中,亲本CXCR3配体中的C-X-C基序可以位于N端序列V-P-L-S-R-T-V-R(SEQ ID NO:21)或V-V-S-R-T-V-R(SEQ ID NO:22)的C端附近。

[0419] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体也可以在C-X-C基序的C端有(b1)至(b6)中的任一个:

[0420] (b1)SEQ ID NO:4-12中任一个的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;

[0421] (b2)SEQ ID NO:25的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;

[0422] (b3)SEQ ID NO:26的从第12个氨基酸到第73个氨基酸的序列;

[0423] (b4)SEQ ID NO:27的从第12个氨基酸到第103个氨基酸的序列;

[0424] (b5)SEQ ID NO:1的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列;和

[0425] (b6)SEQ ID NO:28的从第12个氨基酸到第77个氨基酸的序列。

[0426] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体选自自天然存在的CXCL10、天然存在的CXCL11、天然存在的CXCL9、CXCL10变体、CXCL11变体、CXCL9变体以及由其产生的嵌合蛋白。

[0427] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性。在具体实施方案中,在本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法中使用的亲本CXCR3配体是CXCL10变体,所述CXCL10变体中R75A的修饰已添加到了天然存在的人CXCL10的氨基酸序列。

[0428] 在具体实施方案中,本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加以下的至少一个或两个修饰:(i)二硫键的引入;和(ii)N端区域的氨基酸修饰。在具体实施方案中,本说明书中提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列引入至少一个V1Y或P18C和A60C的氨基酸置换。

[0429] 换言之,本说明书提供了以下任一的用途:

[0430] (1)亲本CXCR3配体中第一个氨基酸从V到Y的置换;或

[0431] (2)亲本CXCR3配体中从N端起第18个氨基酸从P到C的置换,第60个氨基酸从A到C的置换;

[0432] 以增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性。

[0433] 除上述之外,本说明书提供的增强CXCR3配体诱导表达CXCR3的细胞迁移的活性的方法可以进一步包括将亲本CXCR3配体中从N端起的第二个氨基酸从P置换为V。

[0434] 提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法

[0435] 本公开还涉及提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法。本说明书提供的提高CXCR3

配体在血液中稳定性的方法包括修饰亲本CXCR3配体的序列。在具体实施方案中,本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法包括,在将亲本CXCR3配体的氨基酸序列中的N端氨基酸作为位置1时,用Pro置换与氨基酸位置7对应的氨基酸。在具体实施方案中,在本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法中使用的亲本CXCR3配体的从N端起第7个氨基酸为V。在具体实施方案中,在本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法中使用的亲本CXCR3配体包括天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的一部分。在具体实施方案中,天然存在的人CXCR3配体是天然存在的人CXCL10。

[0436] 在具体实施方案中,在本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法中使用的亲本CXCR3配体选自天然存在的CXCL10、天然存在的CXCL11、天然存在的CXCL9、CXCL10变体、CXCL11变体、CXCL9变体和由其产生的嵌合蛋白。

[0437] 在具体实施方案中,在本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法中使用的亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性。在具体实施方案中,在本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法中使用的亲本CXCR3配体是CXCL10变体,所述CXCL10变体中R75A的修饰已添加到了天然存在的人CXCL10的氨基酸序列。

[0438] 在具体实施方案中,本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法进一步包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加至少一个或两个修饰:(i)二硫键的引入;和(ii)N端区域的氨基酸修饰。在具体实施方案中,本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法包括向亲本CXCR3配体的氨基酸序列引入V1Y或P18C和A60C的至少一个氨基酸置换。

[0439] 除上述以外,本说明书提供的提高CXCR3配体在血液中稳定性的方法进一步包括将亲本CXCR3配体中从N端起的第二个氨基酸由P置换为V。

[0440] 制备在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法

[0441] 本公开还涉及制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法。本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性CXCR3配体的方法,包括修饰亲本CXCR3配体的序列。在具体实施方案中,本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法包括,当将亲本CXCR3配体的氨基酸序列中的N端氨基酸作为位置1时,用Pro置换与氨基酸位置7对应的氨基酸。在具体实施方案中,在本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体从N端起的第7个氨基酸是V。在具体实施方案中,在本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体包含天然存在的人CXCR3配体的氨基酸序列的一部分。在具体实施方案中,天然存在的人CXCR3配体是天然存在的人CXCL10。

[0442] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体选自天然存在的CXCL10、天然存在的CXCL11、天然存在的CXCL9、CXCL10变体、CXCL11变体、CXCL9变体和由其产生的嵌合蛋白。

[0443] 在具体实施方案中,在本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体对弗林蛋白酶具有抗性。在具体实施方案中,在本说明书提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法中使用生物亲本CXCR3配体是CXCL10变体,所述CXCL10变体中R75A的修饰已添加到

了天然存在的人CXCL10的氨基酸序列。

[0444] 在具体实施方案中,本说明书提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法进一步包含向亲本CXCR3配体的氨基酸序列添加以下的至少一个或两个修饰:(i)二硫键的引入;(ii)N端区域的氨基酸修饰。在具体实施方案中,本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法包括将V1Y或P18C和A60C的至少一个氨基酸置换引入亲本CXCR3配体的氨基酸序列。

[0445] 除上述之外,本说明书中提供的制备相对于亲本配体在血液中具有增强的稳定性的CXCR3配体的方法还可以包括将亲本CXCR3配体的从N端起的第二个氨基酸由P置换为V。

[0446] 包含CXCR3配体的融合蛋白

[0447] 本公开的一方面涉及包含CXCR3配体的融合蛋白。在具体实施方案中,本公开的融合蛋白涉及在N端包含CXCR3配体的融合蛋白。本公开的融合蛋白可以是融合CXCR3配体和抗体的融合蛋白,或者可以是融合CXCR3配体和抗体Fc区、另一种类型的蛋白质如白蛋白或多肽的融合蛋白。在此,与CXCR3配体结合的分子可称为配体结合分子。具体示例包括融合蛋白,其中抗体(包括完整抗体、全长抗体和抗体片段)、抗体Fc区、另一类型的蛋白质(如白蛋白)或多肽融合至CXCR3配体的C端。包含CXCR3配体的融合蛋白可以使用与融合蛋白结合的物质纯化。例如,当与抗体Fc区融合时,在固定蛋白A上的吸附可用于回收包含CXCR3配体的融合蛋白。

[0448] 本公开的融合蛋白中包含的配体结合分子可为具有至少一个切割位点的多肽。具体地说,本公开的融合蛋白可以是具有至少一个切割位点的抗体(包括完整抗体、全长抗体和抗体片段)、抗体Fc区、另一类型的蛋白质如白蛋白或多肽融合到CXCR3配体的C端的融合蛋白。

[0449] 例如,在WO2018/097308和WO2019/107384中描述了含有切割位点的配体结合分子。切割位点可以位于多肽中的任何位置,只要其能减少切割后配体结合分子与配体的结合。此外,多肽中可以包含一个或多个切割位点。

[0450] 在一个实施例中,配体结合分子是具有至少一个切割位点的完整抗体或抗体片段,并且在完整抗体或抗体片段在至少一个切割位点被切割的状态下,与具有本文公开的序列的CXCR3配体或多肽的结合被减少。例如,当处于切割位点被切割的状态时,具有本文公开序列的CXCR3配体或多肽与完整的抗体或抗体片段分离。

[0451] 切割位点包括,例如,蛋白酶切割序列。例如,蛋白酶是靶组织特异性蛋白酶,并且例如癌症组织特异性蛋白酶或炎症组织特异性蛋白酶。蛋白酶的实施例包括金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和苏氨酸蛋白酶,并且一个实施例可以是matriptase或尿激酶(uPA),但是蛋白酶不限于此。

[0452] 此外,可将柔性接头添加到切割位点或蛋白酶切割序列的一端或两端。

[0453] 作为示例,完整的抗体或抗体片段具有抗体恒定区、抗体VH和抗体VL,且切割位点或蛋白酶切割序列位于以下位置中的至少一个位置:抗体恒定区和抗体VH之间的边界附近;抗体恒定区和抗体VL之间的边界附近。切割位点或蛋白酶切割序列可插入到以下至少一个位置:(i)从抗体VH的第109个氨基酸(Kabat编号)到抗体重链恒定区的第122个氨基酸(EU编号)的序列中的任意位置;(ii)从抗体VL的第104个氨基酸(Kabat编号)到抗体轻链恒定区的第113个氨基酸(EU编号)的序列中的任意位置。例如,完整抗体或抗体片段的抗体VL

和抗体VH是缔合的,并且这种缔合通过切割位点的切割而取消或通过蛋白酶对蛋白酶切割序列的切割而取消。

[0454] 此外,具有本文所公开的序列的CXCR3配体或多肽可通过接头与抗体Fc区融合,或者具有本文所公开的序列的CXCR3配体或多肽可通过接头与完整的抗体或抗体片段融合。

[0455] 在本公开的融合蛋白中,CXCR3配体和融合配偶体可以通过接头进行融合。例如,可以通过基因工程引入的任意肽接头,或合成的化合物接头(例如,Protein Engineering,9(3),299-305,1996中公开的接头)可以用作CXCR3配体与融合配偶体融合时使用的接头。

[0456] 肽接头的长度没有特别限制,并且可以由本领域技术人员根据目的适当地选择。肽接头的示例可以包括但不限于:

[0457] Ser

[0458] Gly·Ser(GS)

[0459] Ser·Gly(SG)

[0460] Gly·Gly·Ser(GGS)

[0461] Gly·Ser·Gly(GSG)

[0462] Ser·Gly·Gly(SGG)

[0463] Gly·Ser·Ser(GSS)

[0464] Ser·Ser·Gly(SSG)

[0465] Ser·Gly·Ser(SGS)

[0466] Gly·Gly·Gly·Ser(GGGS,SEQ ID NO:29)

[0467] Gly·Gly·Ser·Gly(GGSG,SEQ ID NO:30)

[0468] Gly·Ser·Gly·Gly(GSGG,SEQ ID NO:31)

[0469] Ser·Gly·Gly·Gly(SGGG,SEQ ID NO:32)

[0470] Gly·Ser·Ser·Gly(GSSG,SEQ ID NO:33)

[0471] Gly·Gly·Gly·Gly·Ser(GGGGS,SEQ ID NO:34)

[0472] Gly·Gly·Gly·Ser·Gly(GGGSG,SEQ ID NO:35)

[0473] Gly·Gly·Ser·Gly·Gly(GGSGG,SEQ ID NO:36)

[0474] Gly·Ser·Gly·Gly·Gly(GSGGG,SEQ ID NO:37)

[0475] Gly·Ser·Gly·Gly·Ser(GSGGS,SEQ ID NO:38)

[0476] Ser·Gly·Gly·Gly·Gly(SGGGG,SEQ ID NO:39)

[0477] Gly·Ser·Ser·Gly·Gly(GSSGG,SEQ ID NO:40)

[0478] Gly·Ser·Gly·Ser·Gly(GSGSG,SEQ ID NO:41)

[0479] Ser·Gly·Gly·Ser·Gly(SGGSG,SEQ ID NO:42)

[0480] Gly·Ser·Ser·Ser·Gly(GSSSG,SEQ ID NO:43)

[0481] Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser(GGGGGS,SEQ ID NO:44)

[0482] Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly(SGGGGG,SEQ ID NO:45)

[0483] Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser(GGGGGGS,SEQ ID NO:46)

[0484] Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly(SGGGGGG,SEQ ID NO:47)

[0485] (Gly·Gly·Gly·Gly·Ser(GGGGS,SEQ ID NO:34))n

[0486] (Ser·Gly·Gly·Gly·Gly(SGGGG,SEQ ID NO:39))n

[0487] 其中n为1或更大的整数。然而,肽接头的长度和序列可由本领域技术人员根据目的适当地选择。

[0488] 合成的化合物接头(化学交联剂)是肽交联中常用的交联剂,例如,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸二磺基酰琥珀酰亚胺酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砜(BSOCOES)或双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砜(磺基-BSOCOES)。

[0489] 这些交联剂是市售的。

[0490] 抗体

[0491] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要所述抗体表现出所需的抗原结合活性。

[0492] 抗体片段

[0493] “抗体片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含与所述完整抗体结合抗原相结合的完整抗体的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2;双链抗体(diabody);线性抗体、单链抗体分子(如scFv),以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0494] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,用于指具有与天然抗体结构基本相似的结构的抗体或具有包含本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0495] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。抗体重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见,例如,Kindtetal.Kuby Immunology,6^{th} ed.,W.H.FreemanandCo.,第91页(2007).)。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。

[0496] Fc区

[0497] 本文所述的术语“Fc区域”是用来定义免疫球蛋白重链的C端区域,该区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列Fc区和突变Fc区。在具体实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸到重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(Gly446-Lys447)可能存在,也可能不存在。除非本文另有说明,Fc区或恒定区的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。在本发明中,Fc区可以包括多种修饰。例如,用于增加Fc异源缔合分子的产量的修饰和用于抑制与Fcγ R结合的修饰是已知的。

[0498] 核酸/多核苷酸

[0499] “分离”的核酸/多核苷酸是指从其自然环境的组成分离出来的核酸/多核苷酸分子。分离的核酸/多核苷酸包括通常包含核酸/多核苷酸分子的细胞中所包含的核酸/多核核酸分子,但核酸/多核苷酸分子存在于染色体外或与其自然染色体位置不同的染色体位置。

[0500] 本公开还涉及编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸,或编码包含CXCR3配体的融合蛋白的核酸/多核苷酸。

[0501] “编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸”是指编码CXCR3配体的一个或多个核酸分子,包括单个载体或分离载体中的一个或多个此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置的一个或多个此类核酸分子。“编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸”可能在功能上与表达控制区相连。表达控制区包括启动子、增强子、终止子等。连接到核酸/多核苷酸的表达控制区通常是异源的。或者,编码原始天然存在的CXCR3配体的基因表达控制区必要时可以组合。

[0502] 载体

[0503] 本公开还涉及包括编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸或编码包含CXCR3配体的融合蛋白的核酸/多核苷酸的载体。本文所使用的术语“载体”是指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入被引入的宿主细胞的基因组的载体。某些载体能够引导与它们可操作地连接的核酸的表达。这种载体在本文中称为“表达载体”。“编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸”可能在功能上与表达载体中的表达控制区相连。表达控制区包括启动子、增强子、终止子等。连接到核酸/多核苷酸的表达控制区通常是异源的。或者,编码原始天然存在的CXCR3配体的基因的表达控制区必要时可以组合。

[0504] 宿主细胞

[0505] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指已引入外源核酸的细胞,包括这些细胞的后代。宿主细胞包括转化子和转化的细胞,其包括原代转化细胞和不论其传代数而衍生的后代。子代的核酸含量可能与亲本细胞不完全相同,但可能包含突变。本文包括了在原始转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

[0506] 本公开还涉及包含编码CXCR3配体的核酸/多核苷酸或编码含有CXCR3配体的融合蛋白的核酸/多核苷酸的宿主细胞。

[0507] 制备CXCR3配体的方法

[0508] 根据本公开的多核苷酸通常由适当的载体携带(或插入)并转染到宿主细胞中。只要载体能够稳定地保留插入的核酸,载体就没有特别的限制。例如,当使用大肠杆菌作为宿主时,尽管可以使用各种商业上可用的载体,但克隆的载体优选是pBluescript载体(由Stratagene Corp.生产)或类似的载体。

[0509] 在使用载体以产生CXCR3配体或含有本公开的CXCR3配体的融合蛋白的情况下,表达载体尤其有用。只要载体允许配体结合分子在体外、大肠杆菌、培养的细胞或单个生物体中表达,表达载体就没有特别的限制。例如,表达载体优选为用于体外表达的pBEST载体(由Promega Corp.生产),用于在大肠杆菌中表达的pET载体(由Invitrogen Corp.生产),用于在培养的细胞中表达的pME18S-FL3载体(GenBank登录号:AB009864),以及用于在单个生物体中表达的pME18S载体(Mol CellBiol.8:466-472(1988))。将本公开的DNA插入到载体中可以通过常规方法进行,例如,使用限制位点的连接酶反应(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel等人(1987)Publish.John Wiley&Sons.第11.4-11.111节)。

[0510] 宿主细胞没有特别的限制,不同宿主细胞根据目的使用。用于表达CXCR3配体或融合蛋白的细胞的例子可包括细菌细胞(如链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌和枯草芽孢杆菌)、真菌细胞(如酵母和曲霉菌)、昆虫细胞(如果蝇S2和草地贪夜蛾SF9)、动物细胞(如CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293和Bowes黑色素瘤细胞)和植物细胞。载体到宿主细胞的转染可通过本领域已知的方法来进行,例如,磷酸钙沉淀方法、电穿孔方法(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel等人,(1987)Publish.John Wiley& Sons.第9.1-9.9节)、脂质体法(由GIBCO-BRL制备)或微量注射法。

[0511] 适当的分泌信号可以被掺入到目的配体结合分子或融合蛋白中,从而将宿主细胞中表达的CXCR3配体或融合蛋白分泌到内质网腔、质周间隙或细胞外环境。信号可能是目的配体结合分子或融合蛋白的内源性信号,也可能是外来信号。具体来说,例如,可以使用信号序列MNQTAILICCLIFLTLSGIQG(SEQ ID NO: 48) 、MKKSGVLFLLGIILLVLIGVQG(SEQ ID NO: 49) 、MSVKGMAIALAVILCATVVQG(SEQ ID NO:50), 或MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO: 52)。在这些信号序列中,SEQ IDNo:48至50分别来源于人CXCL10、人CXCL9和人CXCL11。

[0512] 当本公开的CXCR3配体或融合蛋白分泌到培养基中时,通过收集培养基来进行上述生产方法中的CXCR3配体或融合蛋白的回收。当本公开的CXCR3配体或融合蛋白在细胞中产生时,细胞首先被裂解,CXCR3配体或融合蛋白随后被回收。

[0513] 本领域已知的方法,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析,可用于从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的CXCR3配体或融合蛋白。

[0514] 本文中提供的CXCR3配体也可以通过增强亲本CXCR3配体诱导CXCR3表达细胞的迁移的活性来制备。在特定的实施方案中,本文提供的制备CXCR3配体的方法包括修饰亲本CXCR3配体的序列。在特定的实施方案中,本文提供的制备CXCR3配体的方法包括至少(i)引入二硫键和(ii)置换N端区域的氨基酸中的一个或两个修饰。

[0515] 在特定的实施方案中,在本说明书中提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体的从N端起的第1个氨基酸为V。在特定的实施方案中,在本说明书中提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体的从N端起的第2个氨基酸为P。在更具体的实施例中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体的N端序列为V-P-L或V-V-L。在更具体的实施例中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲体CXCR3配体的N端序列为V-P-L-S-R-T(SEQ ID NO:19)或Y-V-L-S-R-T(SEQ ID NO:14)。

[0516] 在特定的实施方案中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体具有C-X-C基序。C-X-C基序中包含的两个半胱氨酸各自都可以与亲本CXCR3配体中包含的C-X-C基序中那些半胱氨酸以外的半胱氨酸形成二硫键。亲本CXCR3配体中的C-X-C基序可以选自C-T-C(Cys-Thr-Cys)、C-L-C(Cys-Leu-Cys)和C-S-C(Cys-Ser-Cys)。在更具体的实施方案中,亲本CXCR3配体中的C-X-C基序可以位于N端序列V-P-L-S-R-T-V-R(SEQ ID NO:21)或V-V-L-S-R-T-V-R(SEQ ID NO:22)的C端附近。

[0517] 在特定的实施方案中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体包括天然存在的人CXCR3配体序列的氨基酸序列的一部分。在特定的实施方案中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体包括人CXCL10的氨基酸序列的一部分。

[0518] 在特定的实施方案中,在本文提供的制备CXCR3配体的方法中使用的亲本CXCR3配体选自天然存在的CXCL10、天然存在的CXCL11、天然存在的CXCL9、CXCL10变体、CXCL11变体、CXCL9变体以及从其制备的嵌合蛋白。

[0519] 在本发明中,当通过表达编码CXCR3配体的多核苷酸获得所述CXCR3配体时,可通过置换多核苷酸密码子引入“氨基酸置换”。或者,当通过结合氨基酸残基合成CXCR3配体时,可连接用于置换的氨基酸残基以获得包含氨基酸置换的CXCR3配体。

[0520] 在具体实施方案中,本文提供的制备CXCR3配体的方法,可以另外进一步包括回收或分离含有上述修饰的CXCR3配体的步骤。

[0521] 治疗

[0522] 此处使用的“治疗(treatment)”(及其语法变体,如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变被治疗个体自然病程的临床干预,既可用于预防,也可在临床病理过程中进行。治疗的理想效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发,缓解症状,减少疾病的任何直接或间接病理后果,防止转移,减缓疾病进展的速度,改善或减轻疾病状态,缓解或改善预后。在一些实施方案中,本公开的CXCR3配体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0523] 药物组合物

[0524] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指允许其中所含的活性成分的生物学活性有效的形式的制剂,并且所述制剂不含有对该制剂所施用受试者具有的不可接受毒性的附加成分。

[0525] 药学上可接受的载体

[0526] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分以外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0527] 包含CXCR3配体或含有CXCR3配体的融合蛋白的药物组合物

[0528] 本公开还涉及包含本公开的CXCR3配体和药学上可接受的载体的药物组合物(药剂),以及包含本公开的含有CXCR3配体的融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物(药剂)。在特定的实施方案中,本公开的药物组合物是用于治疗疾病的药物组合物,包括但不限于癌症、肿瘤和炎症性疾病。

[0529] 在本公开中,术语“包含CXCR3配体的药物组合物”可与“包括给待治疗的受试者施用CXCR3配体的治疗疾病的方法”互换使用,并可与“CXCR3配体用于制备治疗疾病的药物的用途”互换使用。此外,术语“包含CXCR3配体的药物组合物”可与“CXCR3配体用于治疗疾病的用途”或“CXCR3配体在治疗疾病中的用途”互换使用。本公开的CXCR3配体、本公开的包含CXCR3配体的融合蛋白以及本公开的药物组合物可用于治疗疾病,包括但不限于癌症、肿瘤和炎症性疾病。

[0530] 术语“包含含有CXCR3配体的融合蛋白的药物组合物”可与“包括给待治疗的受试者施用包含CXCR3配体的融合蛋白的治疗疾病的方法”互换使用,并且可以与“包含CXCR3配体的融合蛋白用于制备用于治疗疾病的药物的用途”互换使用。此外,术语“包含含有CXCR3配体的融合蛋白的药物组合物”可与“包含CXCR3配体的融合蛋白用于治疗疾病的用途”或“包含CXCR3配体的融合蛋白在治疗疾病中的用途”互换使用。此外,本发明涉及“制备用于治疗疾病的药物组合物的方法,其包括将CXCR3配体或包含CXCR3配体的融合蛋白与药学上

可接受的载体结合(或混合)的步骤”。在特定的实施方案中,疾病可为需要施用CXCR3配体或包含CXCR3配体的融合蛋白用于其治疗的疾病。

[0531] 在本公开的一些实施方案中,可将包含CXCR3配体的组合物向个体施用。在本公开的一些实施方案中,可将包含CXCR3配体的融合蛋白向个体施用。当向个体施用CXCR3配体或包含其的融合蛋白以治疗疾病时,可以以治疗有效剂量施用这些活性成分。更具体而言,本发明可包括向需要治疗疾病的个体施用治疗有效量的CXCR3配体或包含该配体的融合蛋白的步骤。

[0532] 本公开的药物组合物可以通过使用本领域技术人员已知的方法来配制。例如,所述药物组合物可以无菌溶液或含有水或任何其他药学上可接受的液体的混悬液的注射形式胃肠外使用。例如,可通过与药理学上可接受的载体或介质,特别是无菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、调味剂、赋形剂、运载体、防腐剂、粘合剂等适当结合,并将其混合成一般公认的制药实践所需单位剂量来配制药物组合物。将这些制剂中有效成分的量设定为在规定范围内给予适当的体积。

[0533] 注射用无菌组合物可根据通常的药物实践使用运载体如可注射的蒸馏水配制。可注射水溶液的例子包括含有生理盐水、葡萄糖或其他佐剂(例如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇和氯化钠)的等渗溶液。该水溶液可以与合适的增溶剂结合使用,例如,醇(乙醇等),聚醇(丙二醇、聚乙二醇等),或非离子表面活性剂(聚山梨酯80™、HCO-50等)。

[0534] 油状液体的例子包括芝麻油和大豆油,苯甲酸苄酯和/或苯甲醇可作为增溶剂组合使用。所述油状液体可与缓冲液(例如,磷酸盐缓冲溶液和醋酸钠缓冲溶液)、镇痛剂(例如,盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如,苯甲醇和苯酚)或抗氧化剂组合。通常将配制好的注射溶液装入适当的安瓿中。

[0535] 本公开的药物组合物优选通过胃肠外途径施用。例如,施用用于注射、经鼻施用、经肺施用或经皮施用的组合物。药物组合物可通过静脉注射、肌内注射、腹腔注射或皮下注射的方法全身或局部施用。

[0536] 可根据患者的年龄和症状选择合适的施用方法。含有CXCR3配体的药物组合物的剂量可确定范围为,例如,每剂量每公斤体重0.0001mg至1000mg。或者,可以确定剂量为,例如,每个患者0.001毫克至100000毫克。然而,本公开的内容并不一定受这些数值的限制。剂量和施用方法取决于患者的体重、年龄、症状等,本领域技术人员可以考虑这些条件确定适当的剂量和施用方法。

[0537] [实施例]

[0538] 以下是本公开的方法和组合物的实施例。可以理解为根据以上提供的一般说明,可实施各种其他实施例。

[0539] 实施例1.人CXCL10(hCXCL10)变体和hCXCL10变体Fc融合的构建

[0540] 构建了hCXCL10变体hCXCL10R75A(SEQ ID NO:1)(其中人CXCL10(hCXCL10,Refseq:NP_001556.2,Uniprot ID:P02778)已突变为对弗林蛋白酶具有抗性)和人CXCL10变体(其中已在N环、C端a-螺旋区和/或N端区域中引入修饰)。表2显示了构建的hCXCL10变体的名称、修饰和SEQ ID NO。在没有引入R75A修饰的野生型CXCL10中,当在哺乳动物细胞中表达时,这部分被来自细胞的蛋白酶降解,并从融合到C端区域的蛋白质中分离出来。因此,需要添加R75A修饰来表达CXCL10蛋白融合,其中野生型CXCL10或其变体在C端与蛋白质

融合。

[0541] [表2]

[0542]

序列名称	SEQ ID NO	修饰	N端序列	对应的hCXCL10变体Fc融合
hCXCL10R75A	1	R75A	VPLSRTVR…	hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0639	4	V1Y/R75A	YPLSRTVR…	hCXCL10R75A.0639-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0640	5	P18C/R75A	VPLSRTVR…	hCXCL10R75A.0640-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0641	6	A60C/R75A	VPLSRTVR…	hCXCL10R75A.0641-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0642	7	P18C/A60C/R75A	VPLSRTVR…	hCXCL10R75A.0642-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0016	8	P2V/R75A	VVLSRTVR…	hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0643	9	V1Y/P2V/R75A	YVLSRTVR…	hCXCL10R75A.0643-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0644	10	P2V/P18C/A60C/R75A	VVLSRTVR…	hCXCL10R75A.0644-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0669	11	V1Y/P18C/A60C/R75A	YPLSRTVR…	hCXCL10R75A.0669-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R
hCXCL10R75A.0670	12	V1Y/P2V/P18C/A60C/R75A	YVLSRTVR…	hCXCL10R75A.0670-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R

[0543] 在表2中,N端序列为YPLSRTVR(SEQ ID NO:15)、YVLSRTVR(SEQ ID NO:16)、VPLSRTVR(SEQ ID NO:21)和VVLSRTVR(SEQ ID NO:22)中的任意一个。

[0544] 如上所述,为了促进与CXCR3的结合并提高活化表达CXCR3细胞的能力,研究了稳定进入CXCR3结合状态的修饰,并通过使用通用计算科学系统Molecular Operating Environment(Chemical Computing Group ULC.,MOE 2020.0901win64)分析确定了有助于受体结合步骤的修饰。具体来说,MOE读取了hCXCL10(PDB ID:1O7Y)的结构数据,计算了引入修饰后的结构稳定性,并从中发现了被认为能够稳定对接结构域周围结构的修饰(图1A)。选自从N端起的第14和第55、第18和第60、第21和第67、第25和第46、第41和第56位的氨基酸组合中的任何一个被提取作为引入二硫键的候选位置,所述二硫键增加变体相对于亲本CXCR3配体的稳定性。其中,对以半胱氨酸置换第18和第60位的组合的变体进行了研究。

[0545] 对于促进活化步骤的N端区域的修饰,搜寻在N端区域氨基酸残基的置换,并认为通过调节N端区域的疏水性和侧链的尺寸大小可以稳定相互作用,因为受体上的相互作用位点是跨膜区域。具体地说,对N端氨基酸进行V1Y置换的变体进行了研究。

[0546] 为了便于纯化各种hCXCL10变体,通过将hCXCL10变体与人IgG1抗体Fc结构域融合构建了hCXCL10变体Fc融合。hCXCL10变体Fc融合的示意图如图1B所示。

[0547] 制备了hCXCL10变体Fc融合,其中上述hCXCL10变体与人IgG1抗体(hIgG1)Fc结构域变体G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R(G1T4k.one(SEQ ID NO:2)及VHn-G1T4h.one.H435R(SEQ ID NO:3))融合。具体来说,使用本领域技术人员已知的方法制备了编码肽链(其中每个hCXCL10变体的C端和G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R的N端连接)的基因的表达载体。这些肽链与VHn-G1T4h.one.H435R和hCXCL10变体Fc融合结合,其中一个hCXCL10变体与hIgG1 Fc结构域变体结合,通过本领域技术人员已知的方法使用Expi293(Life Technologies)通过瞬时表达进行表达,使用蛋白质A通过本领域技术人员已知的方法进行纯化。

[0548] 本研究中使用的Fc结构域变体具有增加Fc异源缔合的分子产量的突变和抑制FcγR结合的突变。

[0549] 实施例2.hCXCL10变体Fc融合的细胞迁移诱导活性的评价

[0550] 评估了实施例1中制备的hCXCL10变体Fc融合是否诱导表达CXCL10受体的细胞的迁移,即诱导表达CXCR3细胞的迁移的活性。

[0551] 采用表达小鼠CXCR3(mCXCR3)(以下简称BaF3/mCXCR3)的Ba/F3转染细胞和具有

5.0μm孔聚碳酸酯膜的HTS Transwell™-96可渗透载体(Permeable Support)(Cat.3387,Corning)评估细胞迁移诱导活性。

[0552] 使用实施例1中制备的以下hCXCL10变体Fc融合作为分析物:

[0553] hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0554] hCXCL10R75A.0639-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0555] hCXCL10R75A.0640-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0556] hCXCL10R75A.0641-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0557] hCXCL10R75A.0642-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0558] hCXCL10R75A.0016-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0559] hCXCL10R75A.0643-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0560] hCXCL10R75A.0644-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,

[0561] hCXCL10R75A.0669-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,和

[0562] hCXCL10R75A.0670-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R。

[0563] 在调整每种待分析的分析物溶液中的最终浓度到3nM、10nM、100nM、300nM和1000nM后,将每种溶液的235μL转移到下腔室。然后,将BaF3/mCXCR3细胞以75μL/孔的速度接种于上腔室,形成2.0x 10^5个细胞/孔,反应5小时。反应在5%二氧化碳和37℃的条件下进行。反应3或6小时后,将下腔室中的100μL溶液转移到OptiPlate-96(Cat.6005299,PerkinElmer)并添加100μL的CellTiter-Glo™发光细胞活力测定(Luminescent Cell Viability Assay)溶液(Cat.G7571,Promega)。在室温下反应10分钟后,用SpectraMax M3多模酶标仪(Molecular Devices)测量发光值,以评估细胞向下腔室的迁移水平。每个孔中细胞向分析物的迁移速率计算为下腔室的发光与来自上腔室加载的细胞总数获得的发光的相对值,即“发光/来自所有细胞的发光”。

[0564] 迁移到下腔室的细胞数量由荧光强度反映。WO2020/116498A1公开了未经修饰的hCXCL10和hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R具有呈浓度依赖性的细胞迁移诱导活性。

[0565] (1)P18C,A60C变体

[0566] 反应5小时后在hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one与其他hCXCL10变体Fc融合之间进行诱导细胞迁移活性的比较。结果如图2和表3所示。与hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R相比,引入P18C/A60C修饰的hCXCL 10R75A.0642-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在3nM、10nM和300nM浓度下均比相同浓度下的hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R具有更高的细胞迁移诱导活性。同时,P18C修饰和A60C修饰中的每一个均未单独地表现出增强活性的作用。因此,本研究强烈认为P18C/A60C修饰增强活性是由于在18和60氨基酸位置之间引入了S-S键,从而导致外周区域的结构稳定。

[0567] [表3]

[0568] 各浓度的hCXCL10R75A的活性视为100%时每个变体的活性(P18C,A60C变体)

[0569]

变体名称	修饰	0 nM	3nM	10nM	30nM	100nM	300nM	1000nM
hCXCL10R75A	R75A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
hCXCL10R75A.0640	P18C/R75A	100%	22%	24%	46%	104%	175%	368%

hCXCL10R75A.0641	A60C/R75A	100%	17%	33%	54%	103%	177%	370%
hCXCL10R75A.0642	P18C/A60C/R75A	100%	196%	150%	106%	98%	116%	80%

[0570] (2)P18C、A60C、P2V变体

[0571] 据报道,P2V作为修饰引入hCXCL10以赋予DPPIV切割抗性(WO2020/116498A1)。本研究验证了P2V修饰和P18C/A60C修饰的组合增强了活性的作用。

[0572] 对比hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,引入P2V/P18C/A60C修饰的hCXCL10R75A.0644-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在3nM、10nM、300nM和1000nM浓度下的细胞迁移诱导活性均高于相同浓度下的hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn P18C/A60Cmodified-G1T4h.one.H435R(图3和表4)。由此可见,P18C/A60C修饰与P2V修饰的组合显示增强活性的作用。此外,通过结合P18C/A60C修饰和P2V修饰,获得了具有DPPIV切割抗性和增强活性的作用的CXCL10变体。

[0573] [表4]

[0574] 各浓度的hCXCL10R75A的活性视为100%时每个变体的活性(P18C,A60C,P2V变体)

[0575]

变体名称	修饰	0nM	3nM	10nM	30nM	100nM	300nM	1000nM
hCXCL10R75A	R75A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
hCXCL10R75A.0642	P18C/A60C/R75A	100%	196%	150%	106%	98%	116%	80%
hCXCL10R75A.0016	P2V/R75A	100%	79%	83%	92%	105%	129%	158%
hCXCL10R75A.0644	P2V/P18C/A60C/R75A	100%	174%	144%	109%	107%	153%	163%

[0576] (3)V1Y变体

[0577] 与hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R相比,由于V1Y,具有提高的N端疏水性的hCXCL10R75A.0639-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在3nM、30nM、100nM和300nM浓度下均比相同浓度下的hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R显示出更高的细胞迁移诱导活性。

[0578] 如上所述,P2V作为修饰物被引入到hCXCL10中,以赋予DPPIV切割抗性。引入V1Y/P2V修饰的hCXCL10R75A.0643-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在3nM、30nM、100nM和300nM浓度下的细胞迁移诱导活性均高于相同浓度下的hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R(图4和表5)。由此可见,V1Y修饰和P2V修饰的组合显示出增强活性的作用。此外,通过V1Y修饰和P2V修饰的结合,获得了具有DPPIV切割抗性和增强活性的作用的CXCL10变体。

[0579] [表5]

[0580] 各浓度的hCXCL10R75A的活性视为100%时每个变体的活性(V1Y变体)

[0581]

变体名称	修饰	0nM	3nM	10nM	30nM	100nM	300nM	1000nM
hCXCL10R75A	R75A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
hCXCL10R75A.0639	V1Y/R75A	100%	124%	100%	113%	118%	110%	25%
hCXCL10R75A.0016	P2V/R75A	100%	79%	83%	92%	105%	129%	158%
hCXCL10R75A.0643	V1Y/P2V/R75A	100%	126%	100%	129%	141%	124%	26%

[0582] (4)V1Y、P18C、A60C变体

[0583] 引入了V1Y/P18C/A60C修饰(其为本文发现的P18C/A60C修饰和V1Y修饰的组合)的hCXCL10R75A.0642-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R和引入了V1Y/P2V/P18C/A60C修饰

(其中P2V修饰进一步加入至上述组合)的hCXCL10R75A.0670-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R,在3nM、10nM、30nM、100nM和300nM浓度下,均显示了高于相同浓度下的hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R的细胞迁移诱导活性(图5和表6)。

[0584] [表6]

[0585] 各浓度的hCXCL10R75A的活性视为100%时每个变体的活性(V1Y,P18C,A60C变体)

[0586]

变体名称	修饰	$0n^M$	3nM	$10n^M$	30nM	100nM	300nM	1000nM
hCXCL10R75A	R75A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
hCXCL10R75A.0639	V1Y/R75A	100%	124%	100%	113%	118%	110%	25%
hCXCL10R75A.0642	P18C/A60C/R75A	100%	196%	150%	106%	98%	116%	80%
hCXCL10R75A.0670	V1Y/P2V/P18C/A60C/R75A	100%	195%	146%	132%	132%	127%	24%

[0587] hCXCL10R75A.0639-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R和hCXCL10R75A.0642-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R分别倾向于在低浓度范围和中浓度范围显示出比hCXCL10R75A-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R更高的细胞迁移诱导活性,而hCXCL10R75A.0670-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在从低浓度范围到中浓度范围较宽的浓度范围内,均表现出增强活性的作用。

[0588] 因此,表明了虽然在CXCL10与CXCR3结合的每个步骤和活化步骤中发现的修饰独立发挥作用,但通过将它们结合在一起,可以在更广泛的浓度范围内发挥增强活性的作用。

[0589] 综上所述,显示出在这些CXCL10变体Fc融合中包括的CXCL10变体相对于修饰前的亲本CXCR3配体具有更高的活性。

[0590] 实施例3.构建用于提高血液中的稳定性的人CXCL10 (hCXCL10)变体和hCXCL10变体-抗体融合

[0591] (3-1)用于提高对蛋白酶切割的抗性的人CXCL10 (hCXCL10)变体,

[0592] hCXCL10的N端可被多种蛋白酶如DPP4、DPP8、DPP9、组织蛋白酶(Chathepsin)K、组织蛋白酶(Chathepsin)S、组织蛋白酶(Chathepsin)L、MMP-9和MMP-2切割,并且已知这种切割可降低其作为CXCR3激动剂的活性(非专利文献:H.,Magdolen,V.,Goettig,P.等.Proteolyticchemokine cleavage as a regulator of lymphocytic infiltration in solid tumors.Cancer Metastasis Rev 38,417-430(2019)。因此,为了保持CXCL10的活性,优选防止在hCXCL10N端区域发生蛋白酶的不期望的切割,所述蛋白酶例如存在于血液、肿瘤部位和炎症部位。为了提高hCXCL10N端区域对蛋白酶切割的抗性,构建了hCXCL10R75A.0303(SEQ ID NO:55),其为添加了V7P修饰的hCXCL10R75A.0016。

[0593] (3-2)hCXCL10变体-抗体融合的构建

[0594] 正如能够使本发明的CXCL10变体在体内特定位点(例如肿瘤)发挥作用的分子,对在作为配体的CXCL10变体和可以调节与CXCL10变体结合活性的配体结合分子之间的融合进行了构建。已经报道了可调节配体结合活性的配体结合分子(如WO 2019/107380和WO 2019/107384)。以编码针对人CXCL10的中和抗体MabCXCL10_G7(重链:G7HFR0039H-G1T4h(SEQ ID NO:56;轻链:G7L-LT0(SEQ ID NO:57))的DNA序列为模板,通过本领域技术人员已知的方法制备编码抗CXCL10抗体重链G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h(SEQ ID NO:58)的DNA序列,其具有插入G7HFR0039H-G1T4h的可变区和恒定区之间边界附近的被癌症特异性表达蛋白激酶(uPA)和matriptase(MT-SP1)切割的序列。此外,通过本领域技术人员已知的方法

制备了编码具有由甘氨酸-丝氨酸聚合物组成的接头序列(SEQ ID NO:66)的hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体重链(hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h(SEQ ID NO:59),hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h(SEQ ID NO:60),和hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h(SEQ ID NO:61))的表达载体,所述接头序列插入到hCXCL10突变体(hCXCL10R75A(SEQ ID NO:1),hCXCL10R75A.0016(SEQ ID NO:8),和hCXCL10R75A.0303(SEQ ID NO:55))以及抗CXCL10抗体重链G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h的可变区之间的边界。

[0595] 此外,当表达hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体时,为了表达每分子有一个结合的hCXCL10分子的分子,通过本领域技术人员已知的方法制备了编码抗匙孔血蓝蛋白抗体重链(IC17HdK-G1T4k.H435R(SEQ ID NO:62))的表达载体。本研究中使用的Fc变体在其中引入了增加分子的产量的突变和抑制Fcγ R结合的突变,所述分子中Fc是异源缔合的。

[0596] 通过本领域技术人员已知的方法使用Expi293(Life Technologies)通过瞬时表达将这些重链变体与轻链结合以表达hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体:

[0597] hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0(SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:62);

[0598] hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0(SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:62);和

[0599] hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0(SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:62),然后通过本领域技术人员已知的方法使用蛋白质A对其进行纯化。

[0600] 实施例4.hCXCL10变体-抗体融合在血液中稳定性的评价

[0601] (4.1)(P2V,V7P)

[0602] 通过进行小鼠PK研究以评估CXCL10在血液中的稳定性。

[0603] 使用了在实施例3中制备的以下hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体作为分析物:

[0604] hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0;

[0605] hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0;和

[0606] hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0。

[0607] 每个抗体分子以10mg/kg静脉内施用于6周龄雄性C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratory Japan,Inc.),N=3,并在施用后5分钟、7小时、1天、3天和7天,或施用后5分钟、30分钟、1小时、4小时、1天和5天,或施用后5分钟、1小时、4小时、1天和5天颈静脉采血。采集的血液样品在4℃下4000g离心10分钟,取上清液作为血浆样品。采用LC/ESI-MS/MS法测定血浆抗体浓度。用小鼠血浆在0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16、32μg/mL或0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16、32μg/mL条件下制备校正曲线样品,然后将3μL校正曲线样品或小鼠血浆样品与50μL抗人Fc区抗体固定的磁珠(自行制备)混合,悬浮于50mmol/L碳酸氢铵或LowCross缓冲液中(Candor Bioscience GmbH,100 500)。用含0.05%吐温-20的PBS洗涤3次,PBS洗涤1次,然后与25μL蛋白质变性溶液(含8mmol/L二硫苏糖醇、7.5mol/L尿素和99ng/mL溶菌酶的

碳酸氢铵50mmol/L)混合,在56℃下孵育45分钟。然后加入2μL 500mmol/L碘乙酰胺,37℃黑暗孵育30分钟,加入160μL 50mmol/L含0.621μg/mL测序级修饰胰蛋白酶(Promega,V5117)的碳酸氢铵,37℃孵育过夜,胰酶消化。加入5μL 10% TFA,收集80μL淬火样品,采用LC/ESI-MS/MS进行分析。

[0608] 采用配备Acquity I级或I级加2D高效液相色谱(Waters)的Xevo TQ-S串联四极杆质谱仪(Waters)进行LC/ESI-MS/MS。通过选择性反应监测(SRM)定量胰蛋白酶消化产生的源自抗体的肽。用于定量和SRM的肽序列如表7所示。使用Masslynx Ver.4.2(Waters)软件,通过峰面积与抗体浓度的$1/X^2$加权线性回归构建的校准曲线对样品进行定量。每个定量的肽浓度除以抗体CH区的肽浓度,计算每个序列位置的残基比。

[0609] 结果如图7和表8所示。与hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO相比,引入P2V修饰的hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO在第1天和第5天每个时间点显示比hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO更高的hCXCL10 N端保留率的百分比。

[0610] 此外,与hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO相比,引入P2V/V7P修饰的hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO比hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO和hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LTO//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LTO在第1天和第5天每个时间点的hCXCL10N端保留率的百分比更高。

[0611] 因此,含有P2V和/或V7P修饰的hCXCL10与不含这些修饰的hCXCL10相比,显示在血液中的稳定性有所提高。这表明当hCXCL10与具有可被肿瘤或炎症特异性蛋白酶切割的切割位点的抗原结合分子或肽融合时,表现出特别优越的效果。具体来说,与不含P2V和/或V7P修饰的hCXCL10相比,含有P2V和/或V7P修饰的hCXCL10在血液中的稳定性提高;因此,这些修饰可以防止hCXCR10被血液中的蛋白酶非特异性切割。因此,例如,hCXCL10变体-抗体融合可以到达靶器官、病变和肿瘤等位点,而hCXCL10变体在血液中不会被切割,并且hCXCL10变体(例如,通过位点特异性蛋白酶切割融合到hCXCL10变异体的抗体而从抗体中释放出来)可以在所述位点发挥作用。

[0612] [表7]

[0613] 显示监测肽和SRM之间的对应关系的表

[0614]

区域	监测肽	SRM
CXCL10(N-端)	VPLSR	286.182＞236.648
CXCL10(N-端)	VVLSR	287.19＞375.215
CXCL10	CTCISISNQPVNPR	823.393＞1111.585
CXCL10	CTCISISNQCVNPR	854.882＞1174.563
CH	GPSVFPLAPSSK	593.827＞699.404

[0615] [表8]

[0616] N端保留肽的百分比

[0617]

抗体	施用后天数	N端保留率
hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0	1	23.6%
hCXCL10R75A.0016.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0	1	65.0%
	5	34.0%
hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L-LT0	1	73.6%
	5	51.5%

[0618] 实施例5.hCXCL10变体Fc融合的细胞迁移诱导活性的评价

[0619] 实施例4之前的检查发现,V7P作为引入hCXCL10的修饰实现了血液中的稳定性。在本实施例中,证实了V7P修饰与V1Y/P2V/P18C/A60C修饰组合时对细胞迁移诱导活性的增强作用。

[0620] 构建了与hCXCL10R75A.0670相比,具有额外引入的V7P修饰hCXCL10变体(hCXCL10R75A.0613)(SEQ ID NO:63)),hCXCL10R75A.0670是通过引入DPPIV抗性修饰的P2V修饰和hCXCL10R75A活性增强修饰的V1Y/P18C/A60A形成的。制备了hCXCL10变体Fc融合,其中该hCXCL10变体与人IgG1抗体(hIgGI)Fc结构域变体G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R(G1T4k.one(SEQ ID NO:2)和VHn-G1T4h.one.H435R(SEQ ID NO:3))融合。具体来说,编码肽链(其中每个hCXCL10变体的C端和在G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R内的G1T4k.one的N端连接)的基因的表达载体是使用本领域技术人员已知的方法制备的。这些肽链与VHn-G1T4h.one.H435R结合,并且hCXCL10变体Fc融合(其中一个hCXCL10变体结合到hIgG1 Fc结构域变体)通过本领域技术人员已知的方法使用Expi293(LifeTechnologies)通过瞬时表达进行表达,并通过本领域技术人员已知的方法使用蛋白A纯化。

[0621] 本研究中使用的Fc结构域变体中引入了增加分子(其中Fc是异源缔合的)产量的突变和抑制Fc γR结合的突变。

[0622] hCXCL 10R75A.0613-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one.H435R在3nM、10nM、30nM、100nM和300nM的浓度下比相同浓度下的hCXCL10R75A.0670-G1T4k.one//VHn-G1T4h.one,均表现出相同或更高的细胞迁移诱导活性(图8,表9)。由此可见,即使当与DPPIV抗性修饰的P2V修饰和增强活性的修饰V1Y/P18C/A60A组合时,V7P修饰也不抑制增强活性的效果。

[0623] [表9]

[0624] 各浓N下的hCXCL10R75A.0670的活性视为100%时hCLCX10R75A.0613的活性

[0625]

变体名称	修饰	0nM	3nM	10nM	30nM	100nM	300nM	1000nM
hCXCL10R75A.0670	V1Y/P2V/P18C/A60C/R75A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
hCXCL10R75A.0613	V1Y/P2V/V7P/P18C/A60C/R75A	81%	209%	132%	110%	102%	93%	49%

[0626] 实施例6.hCXCL10变体-抗体融合在血液中的稳定性评价

[0627] (6.1)

[0628] 利用编码hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h(SEQ ID NO:61)的DNA序列为模板,使用本领域技术人员已知的方法制备编码hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h(SEQ ID NO:64)的DNA序列。与hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h相比,hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h具有添加到hCXCL10部分的增强活性的修饰P18C/A60C。也对MabCXCL10_G7的

可变区和恒定区之间插入的蛋白酶识别序列以及MabCXCL10_G7的重链可变区部分添加了修饰;然而,这些修饰分别是为了提高蛋白酶识别序列的切割效率和提高切割后hCXCL10的释放效率,但对hCXCL10 N端稳定性没有贡献。

[0629] 使用编码轻链:G7L-LT0(SEQ ID NO:57)的DNA序列为模板,编码G7L.R38E-LT0(SEQ ID NO:65)的DNA序列通过本领域技术人员已知的方法制备。在MabCXCL10_G7轻链中引入的修饰也是一种为了提高重链切割后hCXCL10释放效率的修饰,对hCXCL10 N端的稳定性没有贡献。

[0630] 通过本领域技术人员已知的方法使用Expi 293(Life Technologies)进行瞬时表达将这些重链型变体与轻链和IC17HdK-G1T4k.H435R(SEQ ID NO:62)组合以表达hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体:hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h/G7L.R38E-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L.R38E-LT0(SEQ ID NO:63),然后通过本领域技术人员已知的方法使用蛋白A进行纯化。

[0631] (6.2)

[0632] 进行小鼠PK研究评估CXCL10在血液中的稳定性。

[0633] 实验采用第4.1节中所述的方法进行。分别于施用后5分钟、1小时、7小时、1天、5天采血。

[0634] 作为分析物,使用了在实施例6.1中制备的以下hCXCL10融合型抗hCXCL10抗体:

[0635] hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h/G7L.R38E-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L.R38E-LT0

[0636] 结果如图9和表10所示

[0637] hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h/G7L.R38E-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L.R38E-LT0在第1天和第5天各时间点展示了与hCXCL10R75A.0303.G4SGGGG.G7HFR0039H.12aa0054-G1T4h/G7L-LT0//IC17HdK-G1T4k H435R/G7L-LT0.相同的hCXCL10N端保留率的百分比。

[0638] 这表明,P2V和/或V7P修饰的hCXCL10N端稳定可以与P18C/A60C修饰结合。

[0639] [表10]

[0640] N端肽保留的百分比

[0641]

抗体	施用后天数	N端保留率
hCXCL10R75A.0659.G4SGGGG.G7HFR0039H.0004.N0222-G1T4h/G7L.R38E-LT0//IC17HdK-G1T4k.H435R/G7L.R38E-LT0	1	71.0%
	5	31.8%

[0642] 为了理解清晰,尽管上述发明已经通过说明和实施例对其进行了部分详细描述,但所述描述和实施例不得解释为限制了公开的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容均通过引用明确纳入全文。

[0643] 工业实用性

[0644] 本公开公开了具有诱导表达CXCR3细胞迁移的活性的CXCR3配体。所述CXCR3配体通过引起表达CXCR3细胞的迁移,用于疾病的治疗/预防。

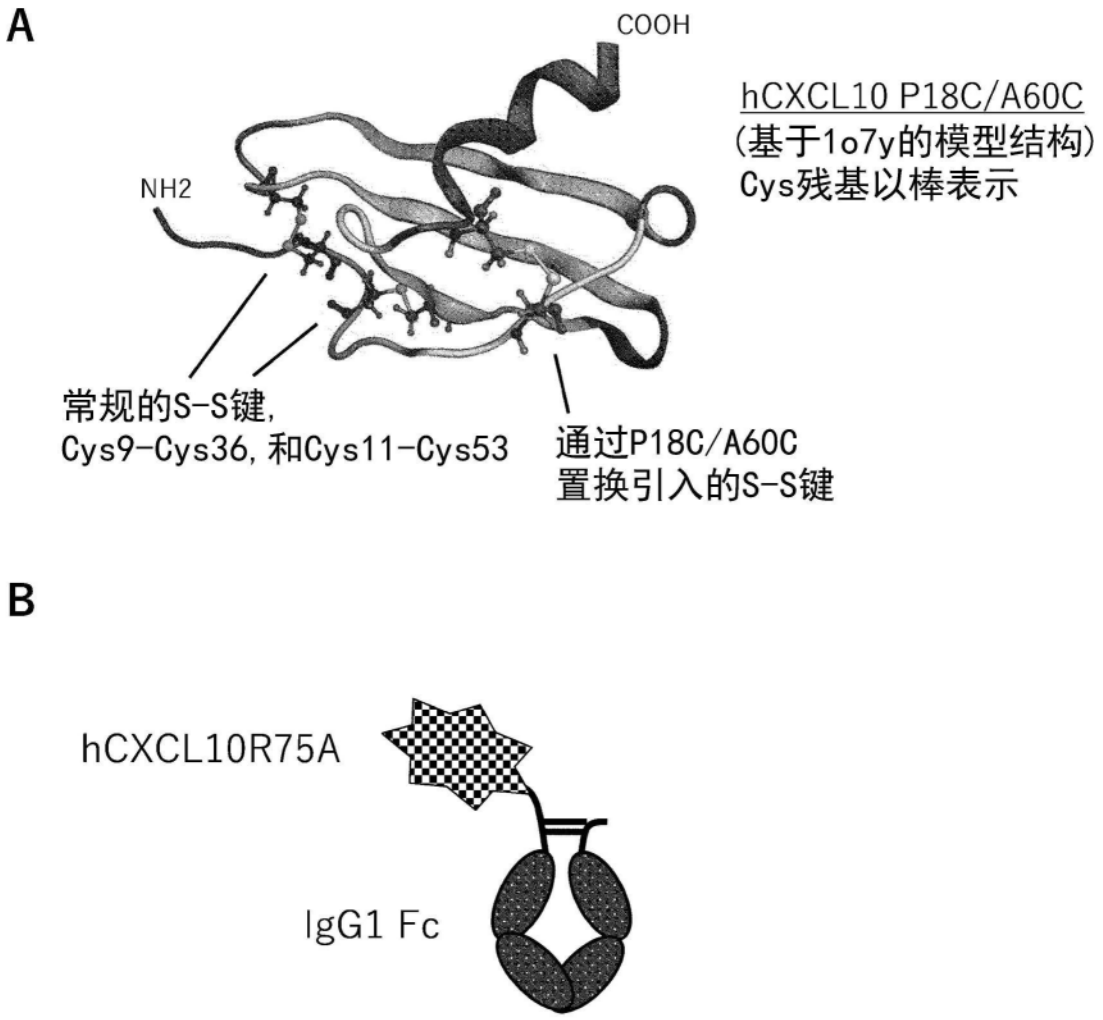

A
COOH
NH2
hCXCL10 P18C/A60C
(基于1o7y的模型结构)
Cys残基以棒表示
常规的S-S键,
Cys9-Cys36,和Cys11-Cys53
通过P18C/A60C
置换引入的S-S键
B
hCXCL10R75A
IgG1 Fc

图1

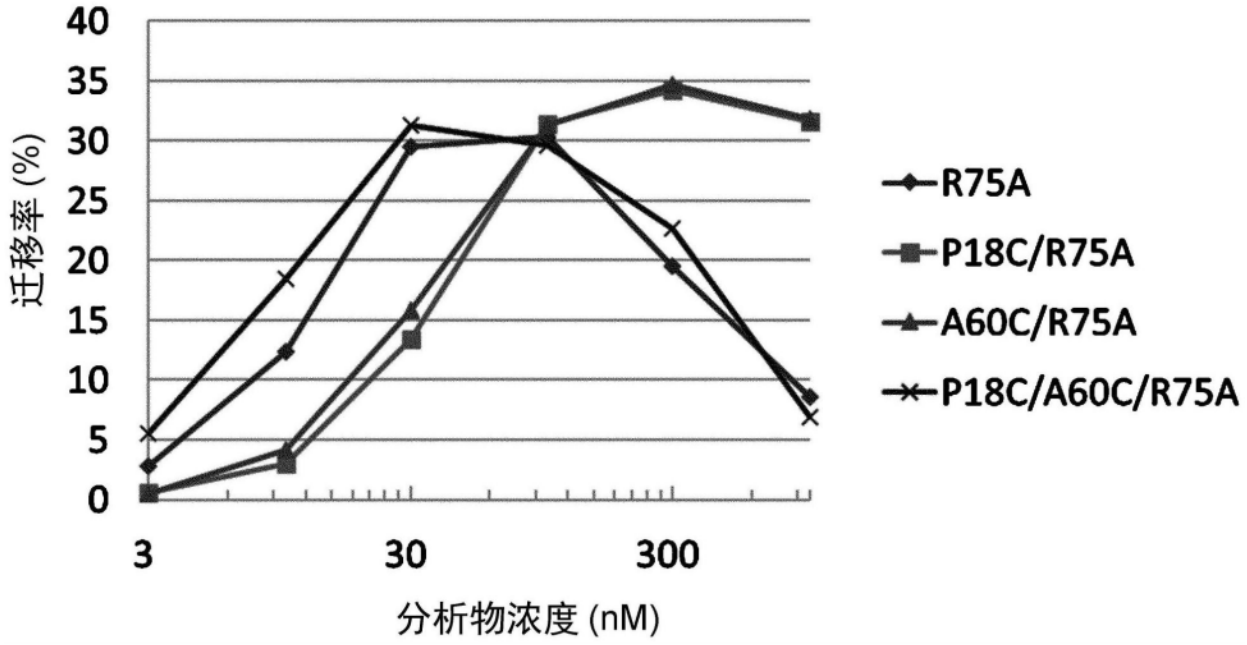

40
35
30
25
20
15
10
5
0
迁移率 (%)
3
30
300
分析物浓度 (nM)
R75A
P18C/R75A
A60C/R75A
P18C/A60C/R75A

图2

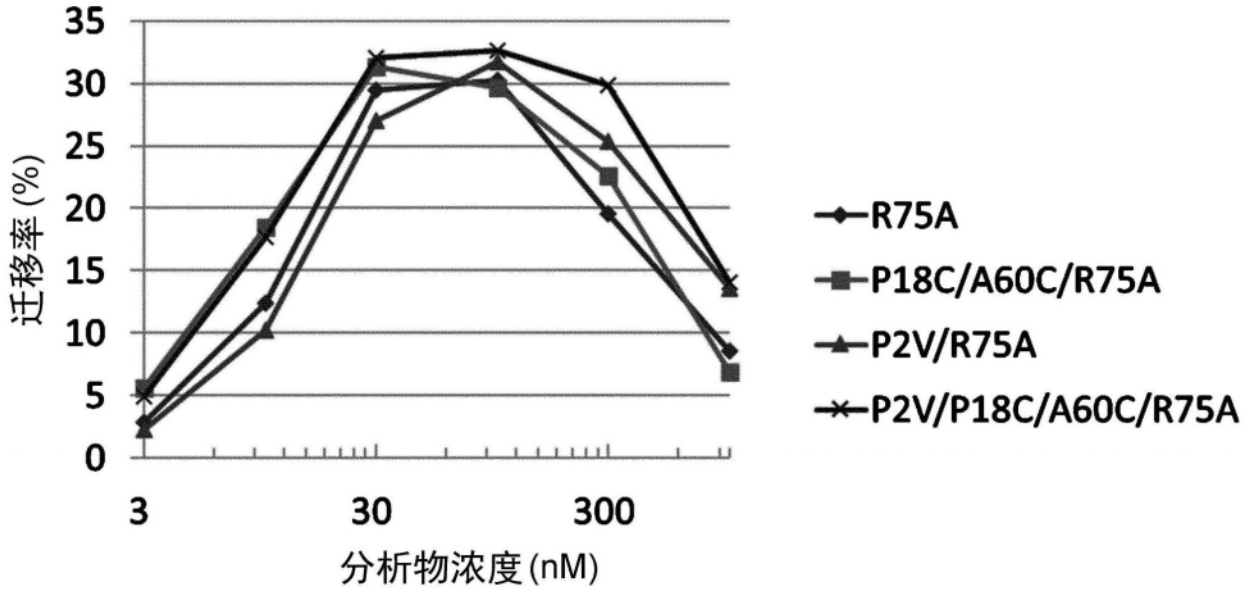

35
30
25
20
15
10
5
0
迁移率 (%)
3
30
300
分析物浓度(nM)
R75A
P18C/A60C/R75A
P2V/R75A
P2V/P18C/A60C/R75A

图3

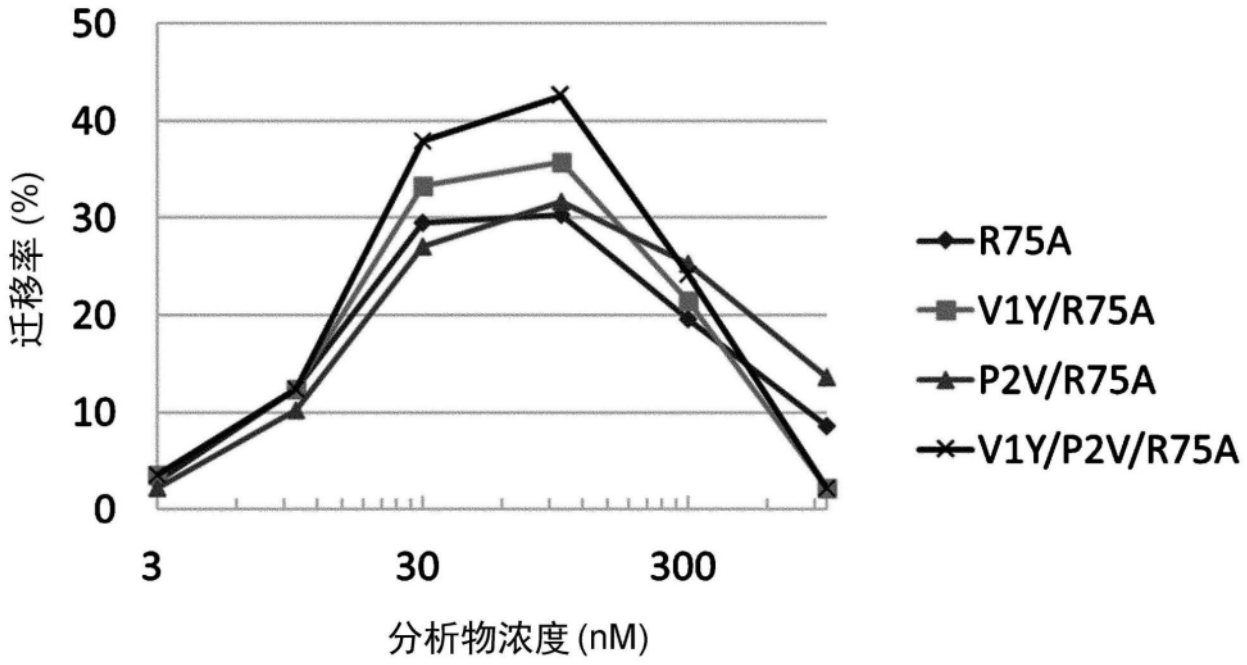

50
40
30
20
10
0
迁移率 (%)
3
30
300
分析物浓度 (nM)
R75A
V1Y/R75A
P2V/R75A
V1Y/P2V/R75A

图4

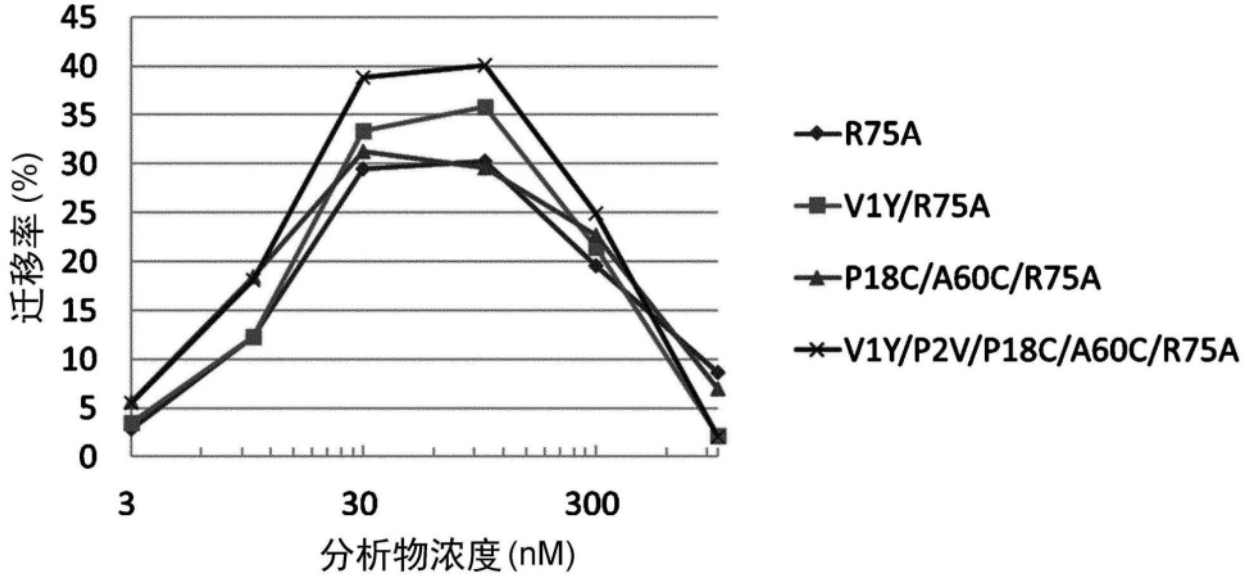

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
迁移率 (%)
3
30
300
分析物浓度 (nM)
R75A
V1Y/R75A
P18C/A60C/R75A
V1Y/P2V/P18C/A60C/R75A

图5

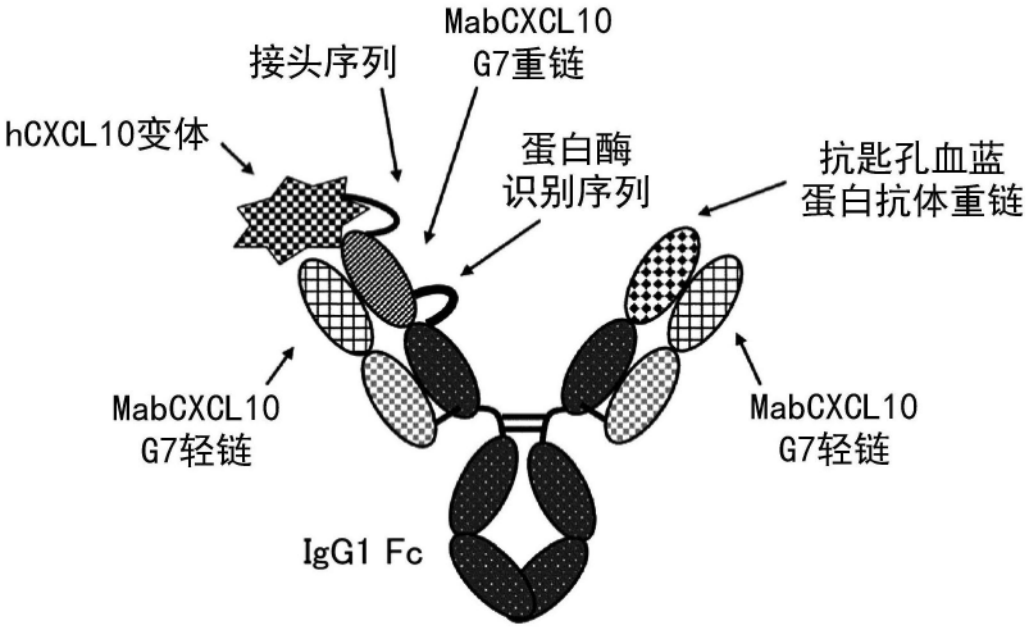

MabCXCL10
G7重链
接头序列
hCXCL10变体
蛋白酶
识别序列
抗匙孔血蓝
蛋白抗体重链
MabCXCL10
G7轻链
MabCXCL10
G7轻链
IgG1 Fc

图6

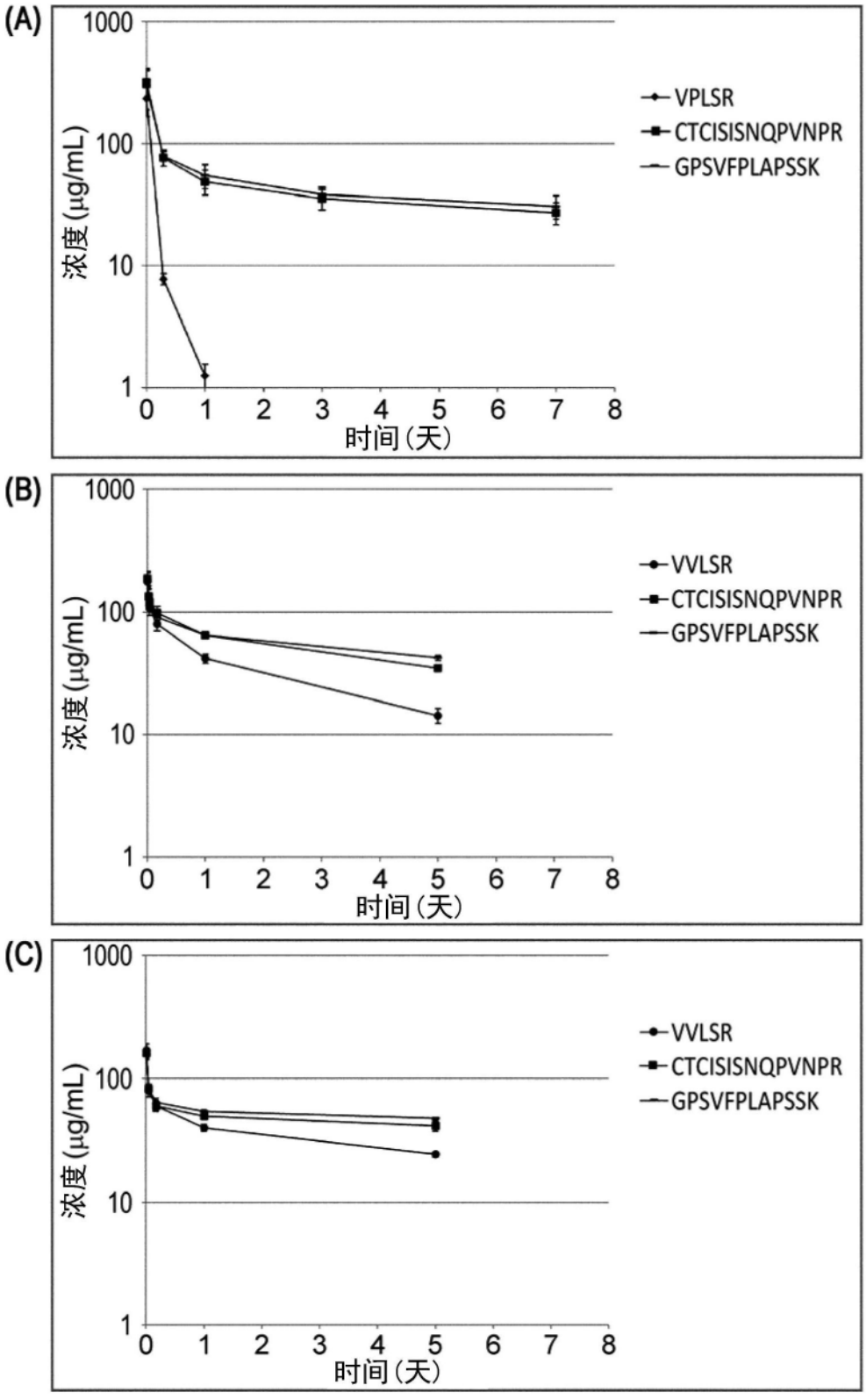

(A)
1000
100
10
1
浓度(μg/mL)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
时间(天)
VPLSR
CTCISISNQPVNPR
GPSVFPLAPSSK
(B)
1000
100
10
1
浓度(μg/mL)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
时间(天)
VVLSR
CTCISISNQPVNPR
GPSVFPLAPSSK
(C)
1000
100
10
1
浓度(μg/mL)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
时间(天)
VVLSR
CTCISISNQPVNPR
GPSVFPLAPSSK

图7

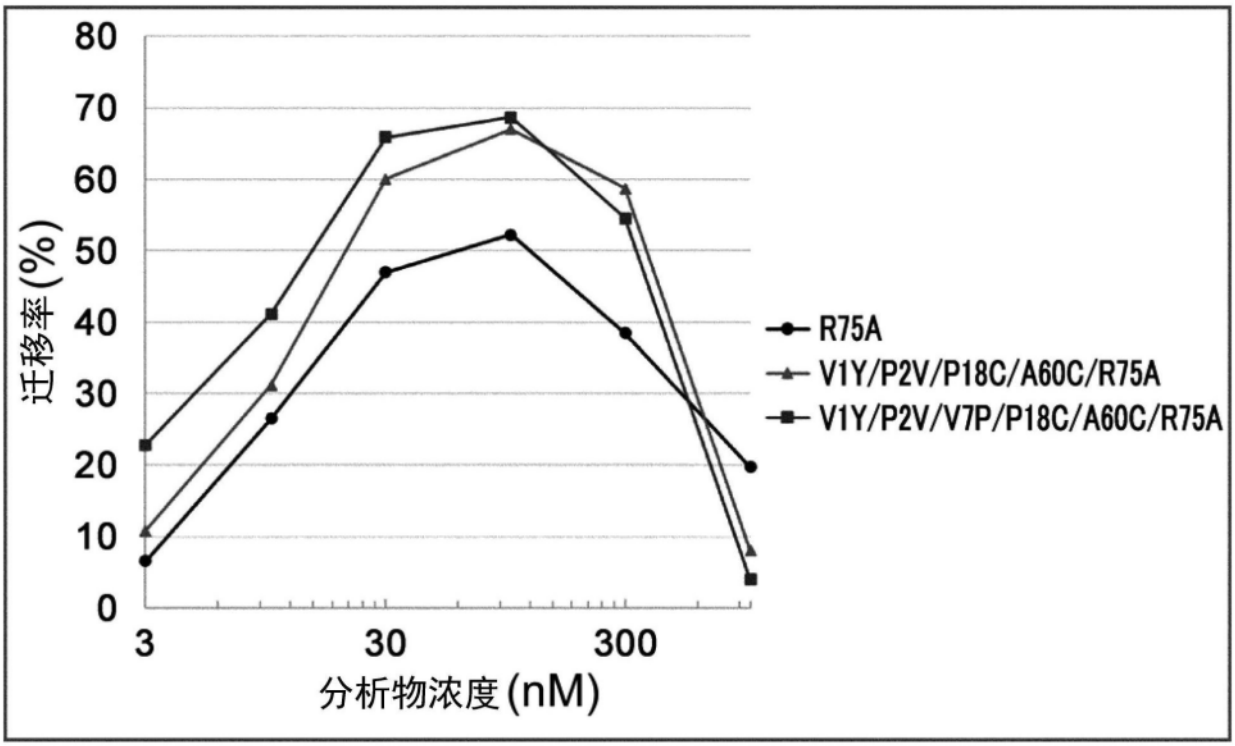

80
70
60
50
40
30
20
10
0
迁移率(%)
3
30
300
分析物浓度(nM)
R75A
V1Y/P2V/P18C/A60C/R75A
V1Y/P2V/V7P/P18C/A60C/R75A

图8

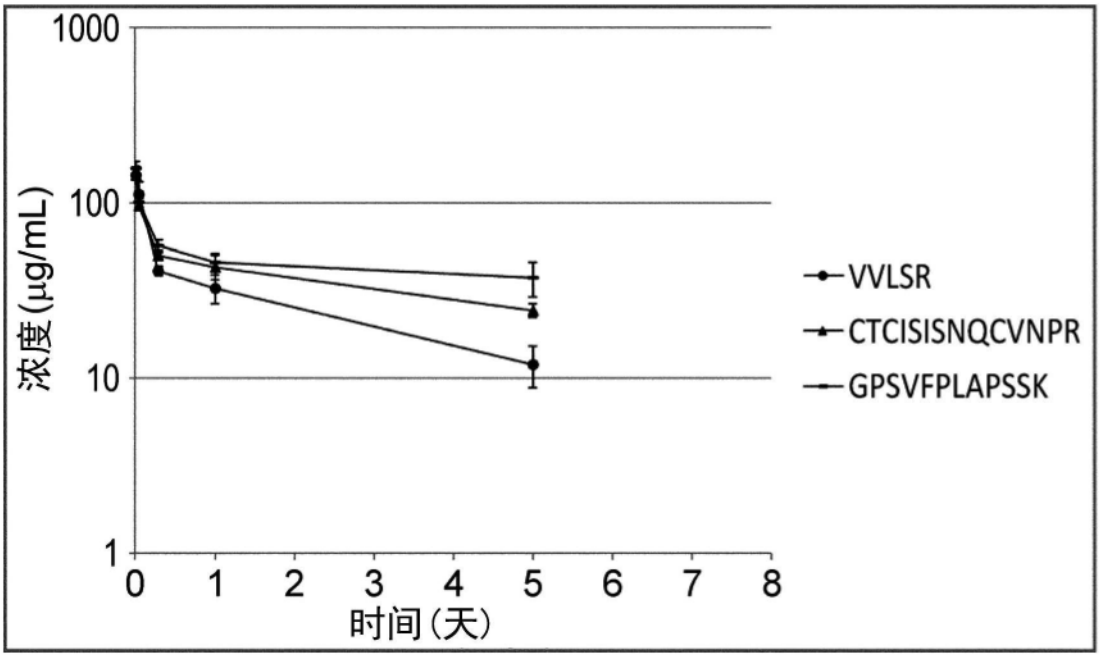

1000
100
10
1
浓度(μg/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
时间(天)
VVLSR
CTCISISNQCVNPR
GPSVFPLAPSSK

图9