

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7308034号

(P7308034)

(45)発行日 令和5年7月13日(2023.7.13)

(24)登録日 令和5年7月5日(2023.7.5)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/55

Z N A

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

C 1 2 N 9/22

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

請求項の数 26 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-569138(P2018-569138)

(86)(22)出願日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(65)公表番号 特表2019-530430(P2019-530430
A)

(43)公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/040267

(87)国際公開番号 WO2018/005954

(87)国際公開日 平成30年1月4日(2018.1.4)

審査請求日 令和2年6月22日(2020.6.22)

(31)優先権主張番号 62/357,756

(32)優先日 平成28年7月1日(2016.7.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 519000951

リゾルブ セラピューティクス, エルエ
ルシーアメリカ合衆国 フロリダ 3 3 7 0 1 ,
セント ピーターズバーグ, 1 エステイ
ー アベニュー エヌ 7 2 1

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 最適化二重ヌクレアーゼ融合物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体であって、前記第1のポリペプチドが配列番号3に記載されているアミノ酸配列を含み、前記第2のポリペプチドが配列番号4に記載されているアミノ酸配列を含む、ヘテロ二量体。

【請求項 2】

第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体であって、前記第1のポリペプチドが配列番号7に記載されているアミノ酸配列を含み、前記第2のポリペプチドが配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含む、ヘテロ二量体。

【請求項 3】

第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体であって、前記第1のポリペプチドが配列番号15に記載されているアミノ酸配列を含み、前記第2のポリペプチドが配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含む、ヘテロ二量体。

【請求項 4】

第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体であって、前記第1のポリペプチドが配列番号5に記載されているアミノ酸配列を含み、前記第2のポリペプチドが配列番号6に記載されているアミノ酸配列を含む、ヘテロ二量体。

【請求項 5】

第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体であって、前記第1のポリペプチドが配列番号13に記載されているアミノ酸配列を含み、前記第2

10

20

のポリペプチドが配列番号 1 4 に記載されているアミノ酸配列を含む、ヘテロ二量体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を形成するための組成物であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体の前記第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含み、前記ヘテロ二量体が、

配列番号 3 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 1 5 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 1 6 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 5 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 6 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、または

配列番号 1 3 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 1 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含む

ことを特徴とする、組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を形成するための組成物であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体の前記第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含み、前記ヘテロ二量体が、

配列番号 3 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 1 5 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 1 6 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、

配列番号 5 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 6 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含むか、または

配列番号 1 3 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドと、配列番号 1 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドとを含む

ことを特徴とする、組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体の前記第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、前記第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とを含む、核酸分子。

【請求項 11】

前記核酸分子が組換え発現ベクターとして存在する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記核酸分子が組換え発現ベクターとして存在する、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 7 または 10 に記載の核酸分子を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 14】

宿主細胞が前記組換え発現ベクターにより形質転換される、請求項 11 または 12 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項 13 に記載の組換え発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を作製する方法であって、前記ヘテロ二量体をコードする核酸配列を含む宿主細胞を提供すること；および前記ヘテロ二量体が発現される条件下で前記宿主細胞を維持することを含む、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体が発現するために形質転換された宿主細胞を培養する工程を含む、ヘテロ二量体を製造する方法。

【請求項 18】

ヘテロ二量体を製造する方法であって、請求項 15 に記載の細胞を、前記ヘテロ二量体の発現を許容する条件下で維持する工程を含む、方法。

【請求項 19】

前記ヘテロ二量体を取得する工程をさらに含む、請求項 16 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

異常免疫応答に関連する状態を処置または予防するための、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を含む、組成物。

【請求項 21】

前記状態が自己免疫疾患である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記自己免疫疾患が、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、実験的自己免疫性関節炎、重症筋無力症、甲状腺炎、実験型ブドウ膜網膜炎、橋本甲状腺炎、原発性粘液性水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン病、早発閉経、男性不妊症、若年型糖尿病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感性眼炎、水晶体起因性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎 H b s - v e、特発性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、強皮症、ヴェーゲナー肉芽腫症、多発性筋炎、皮膚筋炎、円板状 L E、全身性エリテマトーデス (S L E) および結合組織病からなる群より選択される、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記自己免疫疾患が S L E である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記自己免疫疾患がシェーグレン症候群である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

S L E を処置するための、薬学的に許容され得る担体と、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体とを含む組成物であって、前記ヘテロ二量体の量が、R N A、D N A または R N A および D N A の両方を含有する免疫複合体を分解するために有効である、組成物。

【請求項 26】

シェーグレン症候群を処置するための、薬学的に許容され得る担体と、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体とを含む組成物であって、前記ヘテロ二量体の量が、R N A、D N A または R N A および D N A の両方を含有する免疫複合体を分解するために有効である、組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願

本願は、2016年7月1日に出願された米国仮出願第 62 / 357756 号の優先権を主張する。上記出願の内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

背景

死細胞および瀕死細胞からの(リボ)核タンパク質粒子の蓄積は、少なくとも2つの機構によって、全身性エリテマトーデス(SLE)を有する患者において炎症性カスケードを誘導することが公知である：(i)クロマチン/抗クロマチン複合体の沈着またはインサイチュー形成が腎炎を引き起こし、腎機能の喪失につながる；および(ii)自己抗体と複合体化した核酸が、toll様受容体(TLR)7、8および9ならびにTLR非依存的経路を介して先天性免疫を活性化する。核タンパク質の放出は、SLEにおける自己抗体の強力な抗原として機能して、抗原受容体およびTLRの同時嵌合を介したB細胞およびDC活性化の増幅を提供し得る。したがって、例えば循環免疫複合体に含まれる核酸を消化することによって、循環免疫複合体を攻撃する長時間作用型ヌクレアーゼ分子を用いて、自己抗体抗原に結合した核酸の除去ならびに/または免疫刺激、免疫増幅および免疫複合体媒介性疾患の軽減を必要とする被験体における自己抗体抗原に結合した核酸を除去し、ならびに/または免疫刺激、免疫増幅および免疫複合体媒介性疾患を軽減するための手段に対する必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明は、部分的には、高いヌクレアーゼ活性で複数の基質に結合することができるタンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質またはヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質である最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に関する。いくつかの態様では、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、1つまたはそれを超えるFcドメインにタンデムに作動可能に連結された1つまたはそれを超えるDNase1および1つまたはそれを超えるRNase1ドメインを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNase1およびRNase1ドメインがFcドメインのN末端またはC末端のいずれかに位置するように、1つまたはそれを超えるFcドメインに作動可能に連結された単一DNase1ドメインおよび単一RNase1ドメインを含む。いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、二重機能ヌクレアーゼ-Fc鎖を発現する問題を軽減し、1つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインの潜在的な立体障害を緩和する。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ヘテロ二量体の形成を最大化するためのFcドメインにおける1つまたはそれを超える変異を含む。

20

30

【0004】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよびFc領域を含むタンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であり、第1のヌクレアーゼドメインはDNase1であり、第2のヌクレアーゼドメインはRNase1であり、DNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにRNase1にN末端からC末端にタンデムに作動可能に連結されており、RNase1は、Fc領域のN末端またはC末端に作動可能に連結されている。タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のまたは第2のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて増強した薬物動態活性を示す。このようなタンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のまたは第2のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて変化した、例えば向上した血清半減期を示す。

40

【0005】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよびFc領域を含むヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であり、第1のヌクレアーゼドメインはDNase1であり、第2のヌクレアーゼドメインはRNase1であり、DNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにFc領域のN末端またはC末端に作動可能に連結されており、RNase1

50

s e 1 は、リンカーによってまたはリンカーによらずに F c 領域の N 末端または C 末端に作動可能に連結されており、それにより、ヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第 1 のまたは第 2 のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて増強した薬物動態活性を示す。このようなヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第 1 のまたは第 2 のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて変化した、例えば向上した血清半減期を示す。

【 0 0 0 6 】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、図 1 に表されているものである。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様では、本発明は、ヒト D N a s e 1、ヒト R N a s e 1 および変異体ヒト I g G 1 F c を含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であって、前記ヒト D N a s e 1 が、リンカー（例えば、g l y - s e r リンカー）を介してヒト R N a s e 1 に N 末端から C 末端に作動可能に連結されており、前記ヒト R N a s e 1 が、リンカーを介して前記変異体ヒト I g G 1 F c ドメインに作動可能に連結されており、前記変異体ヒト I g G 1 が、変異体ヒンジ領域（例えば、セリンなどによるシステイン置換、例えば S C C）と、F c 受容体結合を減少させるための 1 つまたはそれを超える C H 2 変異（例えば、P 2 3 8 S、P 3 3 1 S または P 2 3 8 S および P 3 3 1 S の両方、ナンバリングは E U インデックスに従う）とを有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を提供する。一実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ペプチドリンカー（例えば、g l y - s e r リンカー）を介してヒト R N a s e 1 に作動可能に連結されたヒト D N a s e 1 を含む（N 末端 - D N a s e 1 - リンカー - R N a s e 1 - C 末端）、ヒト R N a s e 1 は、ペプチドリンカー（例えば、g l y - s e r リンカー）を介して、変異体ヒンジ領域 S C C ヒンジと、P 2 3 8 S および P 3 3 1 S 変異とを有する変異体ヒト I g G 1 F c ドメインに作動可能に連結されている。さらに別の実施形態では、F c ドメインは、N 結合型グリコシル化部位に変異、例えば N 2 9 7 に置換をさらに含む（ナンバリングは K a b a t による）。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第 1 のリンカードメインをさらに含み、第 1 のヌクレアーゼドメインは、第 1 のリンカードメインを介して第 2 のヌクレアーゼドメインに作動可能に連結されている。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第 2 のリンカードメインをさらに含み、第 2 のヌクレアーゼドメインは、第 2 のリンカードメインを介して F c ドメインに作動可能に連結されている。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、R N a s e ドメインは、野生型 R N a s e、例えば野生型ヒト R N a s e 1 である。他の実施形態では、R N a s e ドメインは、変異体 R N a s e、例えばアグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化 R N a s e 1、例えばヒト R N a s e 1 N 3 4 S / N 7 6 S / N 8 8 S（配列番号 2 8）である。いくつかの実施形態では、R N a s e 含有最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、循環 R N A および免疫複合体中の R N A を分解するか、またはインターフェロン - アルファ産生を阻害するか、またはその両方である。さらに他の実施形態では、R N a s e の活性は、対照 R N a s e 分子の活性の約 1 0 倍未満、例えば 9 倍未満、8 倍未満、7 倍未満、6 倍未満、5 倍未満、4 倍未満、3 倍未満または 2 倍未満よりも低いものではない。さらに他の実施形態では、R N a s e の活性は、対照 R N a s e 分子の活性とほぼ同等である。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、D N a s e ドメインは、野生型 D N a s e、例えば野生型ヒト D N a s e 1 である。他の実施形態では、D N a s e ドメインは、変異体 D N a s e ドメイン、例えば変異体ヒト D N a s e 1 A 1 1 4 F（配列番号 2 1）またはアグリコシ

10

20

30

40

50

ル化、低グリコシル化または脱グリコシル化ヒトDNase、例えば変異体ヒトDNase 1 N18S / N106S / A114F (配列番号24)である。いくつかの実施形態では、DNase含有最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、循環DNAおよび免疫複合体中のDNAを分解するか、またはインターフェロン-アルファ産生を阻害するか、またはその両方である。さらに他の実施形態では、DNaseの活性は、対照DNase分子の活性の約10倍未満、例えば9倍未満、8倍未満、7倍未満、6倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満または2倍未満よりも低いものではない。さらに他の実施形態では、DNaseの活性は、対照DNase分子の活性とほぼ同等である。

【0012】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、Fcドメインから第1のおよび第2のヌクレアーゼドメインならびに / または第2のヌクレアーゼドメインを分離するgly-serリンカーを有する。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、Fcドメインを含有しない分子と比べて増加した血清半減期および / または活性を有する。

【0014】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号21に記載されている変異体ヒトDNase 1 A114Fドメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号24に記載されている変異体ヒトDNase 1 N18S / N106S / A114Fドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、DNaseドメインは、変異体ヒトDNase 1 E13R / N74K / A114F / T205K (配列番号25)である。他の実施形態では、DNaseドメインは、変異体ヒトDNase 1 E13R / N74K / A114F / T205K / N18S / N106S (配列番号26)である。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、DNase 1およびRNase 1ドメインは、アグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化されている。いくつかの実施形態では、DNaseドメインは、変異体DNaseドメイン、例えば変異体ヒトDNase 1およびアグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化DNaseドメイン、例えばアグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化ヒトDNase 1である。一実施形態では、ヒトDNase 1は、1つまたはそれを超えるN結合型グリコシル化部位、例えばN18およびN106における変化(例えば、置換)と、A114、E13、N74、T205およびそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つのさらなる変異とを含む。別の実施形態では、ヒトDNase 1は、N18、N106またはN18およびN106の両方における変化(例えば、置換)と、A114、E13、N74、T205およびそれらの組み合わせにおけるさらなる変化(例えば、置換)とを含む。さらに別の実施形態では、ヒトDNase 1は、N18、N106、A114、E13、N74およびT205における変化、例えば置換、例えばN18S / N106S / A114F / E13R / N74K / T205K (配列番号26)を含む。別の実施形態では、変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号27に記載されているヒト野生型RNase 1ドメインを含む。別の実施形態では、変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号28に記載されているヒト変異体RNase 1 N34S / N76S / N88Sドメインを含む。

30

40

【0016】

いくつかの態様では、本発明は、配列番号1~17に記載されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を提供する。他の態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号1~17に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一または少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する。

【0017】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のヌクレアーゼ

50

ドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよびFcドメインを含むポリペプチドを含み、第1のヌクレアーゼドメインはDNase1であり、第2のヌクレアーゼドメインはRNase1であり、DNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにRNase1にN末端からC末端にタンデムに作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにFc領域に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、RNase1は、リンカーによらずにFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、RNase1は、リンカーによらずにFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーを介してRNase1に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、ポリペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2に記載されているアミノ酸配列、または配列番号1もしくは配列番号2に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むタンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む。いくつかの態様では、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、上記ポリペプチドのいずれかを含むホモ二量体である。

10

【0018】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメイン、第1のFcドメインおよび第2のFcドメインを含むヘテロ二量体であり、第1のヌクレアーゼドメインはDNase1であり、第2のヌクレアーゼドメインはRNase1であり、DNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1のFcドメインのN末端またはC末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第2のFcドメインのN末端またはC末端に作動可能に連結されている。上記ヘテロ二量体のいくつかの態様では、DNase1は、リンカーによらずに第1のFcドメインのN末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによらずに第2のFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。

20

【0019】

いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのN末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによって第2のFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのN末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによらずに第2のFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによらずに第1のFcドメインのN末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによらずに第2のFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのN末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによって第2のFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのC末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによって第2のFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによらずに第1のFcドメインのC末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによらずに第2のFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのC末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによらずに第2のFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、DNase1は、リンカーによって第1のFcドメインのC末端に作動可能に連結されており、RNase1は、リンカーによって第2のFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。

30

40

【0020】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、(i)配列番号3に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号3に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

50

配列番号 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 4 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(i i) 配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 7 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(i i i) 配列番号 9 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 9 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 10 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 10 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(i v) 配列番号 11 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 11 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 12 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 12 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(v) 配列番号 15 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 15 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 16 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 16 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド

からなる群より選択される第 1 のおよび第 2 のポリペプチド配列を含むヘテロ二量体である。

【 0 0 2 1 】

他の態様は、第 1 のヌクレアーゼドメイン、第 2 のヌクレアーゼドメインおよび第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインを含むヘテロ二量体であって、前記第 1 のヌクレアーゼドメインが D N a s e 1 であり、前記第 2 のヌクレアーゼドメインが R N a s e 1 であり、

(i) 前記 D N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されており、または

(i i) 前記 R N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、前記 D N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されているヘテロ二量体に関する。

【 0 0 2 2 】

上記ヘテロ二量体のいくつかの態様では、D N a s e 1 は、リンカーによらずに第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、R N a s e 1 は、リンカーによって第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、D N a s e 1 は、リンカーによって第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、R N a s e 1 は、リンカーによってリンカーによらずに (w i t h a w i t h o u t a l i n k e r) 第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、R N a s e 1 は、リンカーによらずに第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、D N a s e 1 は、リンカーによって第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、R N a s e 1 は、リンカーによって第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、D N a s e 1 は、リンカーによって第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されている。

【 0 0 2 3 】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体は、(i) 配列番号 5 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 5 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 6 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 6 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または (i i) 配列番号 1 3 に記載されているアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド、もしくは配列番号 1 3 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および配列番号 1 4 に記載されているアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド、もしくは配列番号 1 4 に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択される第 1 のおよび第 2 のポリペプチド配列を含む。

10

【 0 0 2 4 】

いくつかの態様では、上記ヘテロ二量体はいずれも、ヘテロ二量体を優先的に形成するための F c ドメイン中における 1 つまたはそれを超える C H 3 変異を含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体は、C H 3 変異 T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含む第 1 の F c ドメインと、C H 3 変異 T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、T 3 9 4 W を含む第 2 の F c ドメインとを含む（ナンバリングは E U インデックスに従う）。

【 0 0 2 5 】

本開示の他の態様は、上記ヘテロ二量体のいずれかと、薬学的に許容され得る担体とを含む組成物に関する。上記ヘテロ二量体をコードする核酸分子、組換え発現ベクター、および組換え発現ベクターにより形質転換された宿主細胞、ならびに上記ヘテロ二量体を作製する方法も開示される。

20

【 0 0 2 6 】

本明細書に開示されるタンデム最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を作製する方法であって、前記最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする核酸配列を含む宿主細胞を提供すること；および前記最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が発現される条件下で前記宿主細胞を維持することを含む方法も本明細書に開示される。

【 0 0 2 7 】

有効量の本明細書に開示される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を、異常免疫応答に関連する状態の処置または予防を必要とする患者に投与することによって異常免疫応答に関連する状態を処置または予防するための方法も本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、状態は、自己免疫疾患である。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、実験的自己免疫性関節炎、重症筋無力症、甲状腺炎、実験型ブドウ膜網膜炎、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、I g G 4 関連病、アジソン病、早発閉経、男性不妊症、若年型糖尿病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感性眼炎、水晶体起因性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎 H b s - v e、特発性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、強皮症、ヴェーゲナー肉芽腫症、多発性筋炎、皮膚筋炎、円板状 L E、全身性エリテマトーデス (S L E) および結合組織病からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、S L E またはシェーグレン症候群である。

30

40

【 0 0 2 8 】

S L E またはシェーグレン症候群を処置する方法であって、R N A、D N A または R N A および D N A の両方を含有する免疫複合体を分解するために有効な量の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質含有組成物を被験体に投与することを含む方法も本明細書に開示される。いくつかの態様では、組成物は、薬学的に許容され得る担体と、本明細書に記載される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質とを含む。他の態様では、組成物は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を

50

含む。

【 0 0 2 9 】

別の態様では、本発明は、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えば S L E の処置において使用するための最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に関する。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 4 および 5 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本発明は、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えば S L E を処置するための医薬を製造するための最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 5 および 6 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えば S L E を処置するための医薬を製造するための最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 7 および 8 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えば S L E を処置するための医薬を製造するための最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 1 3 および 1 4 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 3 】

別の態様では、本発明は、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えば S L E を処置するための医薬を製造するための最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の使用に関する。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 1 5 および 1 6 に記載されているアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明のこれらのおよび他の特徴、態様および利点は、以下の説明および添付の図面に関してより良く理解されるであろう。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

第 1 のヌクレアーゼドメイン、第 2 のヌクレアーゼドメイン、第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインを含むヘテロ二量体であって、前記第 1 のヌクレアーゼドメインが D N a s e 1 であり、前記第 2 のヌクレアーゼドメインが R N a s e 1 であり、前記 D N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの N 末端または C 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 2 の F c ドメインの N 末端または C 末端に作動可能に連結されている、ヘテロ二量体。

(項目 2)

前記 D N a s e 1 が、リンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによらずに前記第 2 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されている、項目 1 に記載のヘテロ二量体。

(項目 3)

前記 D N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによって前記第 2 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されている、項目 1 に記載のヘテロ二量体。

10

20

30

40

50

(項目4)

前記D N a s e 1が、リンカーによって前記第1のF cドメインの前記N末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによらずに前記第2のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

(項目5)

前記D N a s e 1が、リンカーによらずに前記第1のF cドメインの前記N末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによらずに前記第2のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

(項目6)

前記D N a s e 1が、リンカーによって前記第1のF cドメインの前記N末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによって前記第2のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

10

(項目7)

前記D N a s e 1が、リンカーによって前記第1のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによって前記第2のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

(項目8)

前記D N a s e 1が、リンカーによらずに前記第1のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによらずに前記第2のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

20

(項目9)

前記D N a s e 1が、リンカーによって前記第1のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによらずに前記第2のF cドメインの前記N末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

(項目10)

前記D N a s e 1が、リンカーによって前記第1のF cドメインの前記C末端に作動可能に連結されており、前記R N a s e 1が、リンカーによって前記第2のF cドメインの前記N末端に作動可能に連結されている、項目1に記載のヘテロ二量体。

(項目11)

前記R N a s e が、野生型ヒトR N a s e 1または変異体R N a s e、例えばアグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化R N a s e 1、例えばヒトR N a s e 1 N 3 4 S / N 7 6 S / N 8 8 Sである、項目1～10のいずれか一項に記載のヘテロ二量体。

30

(項目12)

前記R N a s e が野生型ヒトR N a s e 1である、項目11に記載のヘテロ二量体。

(項目13)

前記D N a s e が、野生型ヒトD N a s e 1または変異体ヒトD N a s e 1 A 1 1 4 Fまたはアグリコシル化、低グリコシル化もしくは脱グリコシル化変異体ヒトD N a s e 1 N 1 8 S / N 1 0 6 S / A 1 1 4 Fである、項目1～12のいずれか一項に記載のヘテロ二量体。

40

(項目14)

前記第1のおよび第2のF cドメインが、ヒンジドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインを含む、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目15)

前記第1のおよび第2のF cドメインが、セリンによる3つのヒンジ領域システイン残基のうちの1つまたはそれよりも多くの置換を含む、項目14に記載のヘテロ二量体。

(項目16)

前記第1のおよび第2のF cドメインが、S C C、S S S(残基220、226および229)、G 2 3 6 R、L 3 2 8 R、L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aからなる群より選択される変異を含む(ナンバリングはE Uインデックスに従う)、項目15に記載のヘテロ二

50

量体。

(項目 17)

前記第1のおよび第2のFcドメインが、SCC変異(残基220、226および229)を含む(ナンバリングはEUIンデックスに従う)、項目16に記載のヘテロ二量体。

(項目 18)

前記第1のおよび第2のFcドメインが、P238SおよびP331変異を含む(ナンバリングはEUIンデックスに従う)、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目 19)

前記第1のおよび第2のFcドメインが、ヘテロ二量体を優先的に形成するための1つまたはそれを超えるCH3変異を含む、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

10

(項目 20)

前記第1のFcドメインが、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vを含み、前記第2のFcドメインが、CH3変異T350V、T366L、K392L、T394Wを含む(ナンバリングはEUIンデックスに従う)、項目19に記載のヘテロ二量体。

(項目 21)

前記リンカードメインが、ポリペプチドリンカー、例えばgly-serリンカーまたはNLGリンカー(vdgasspvnvsspsvqdi)である、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目 22)

20

(i) 配列番号3に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号3に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および配列番号4に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号4に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(ii) 配列番号7に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号7に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号8に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

30

(iii) 配列番号9に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号9に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および配列番号10に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号10に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

(iv) 配列番号11に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号11に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および配列番号12に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号12に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

40

(v) 配列番号15に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号15に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド; および配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号16に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド

からなる群より選択される第1のおよび第2のポリペプチド配列を含む、ヘテロ二量体。

(項目 23)

第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよび第1のFcドメインおよび第2のFcドメインを含むヘテロ二量体であって、前記第1のヌクレアーゼドメインがDNase1であり、前記第2のヌクレアーゼドメインがRNase1であり、

50

(i) 前記 D N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されており、または

(i) 前記 R N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの N 末端に作動可能に連結されており、前記 D N a s e 1 が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの C 末端に作動可能に連結されている、ヘテロ二量体。

(項目 2 4)

前記 D N a s e 1 が、リンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 C 末端に作動可能に連結されている、項目 2 3 に記載のヘテロ二量体。

10

(項目 2 5)

前記 D N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 R N a s e 1 が、リンカーによってリンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの前記 C 末端に作動可能に連結されている、項目 2 3 に記載のヘテロ二量体。

(項目 2 6)

前記 R N a s e 1 が、リンカーによらずに前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 D N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 C 末端に作動可能に連結されている、項目 2 3 に記載のヘテロ二量体。

20

(項目 2 7)

前記 R N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 N 末端に作動可能に連結されており、前記 D N a s e 1 が、リンカーによって前記第 1 の F c ドメインの前記 C 末端に作動可能に連結されている、項目 2 3 に記載のヘテロ二量体。

(項目 2 8)

前記 R N a s e が、野生型ヒト R N a s e 1 または変異体 R N a s e、例えばアグリコシル化、低グリコシル化または脱グリコシル化 R N a s e 1、例えばヒト R N a s e 1 N 3 4 S / N 7 6 S / N 8 8 S である、項目 2 3 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体。

30

(項目 2 9)

前記 R N a s e が野生型ヒト R N a s e 1 である、項目 2 8 に記載のヘテロ二量体。

(項目 3 0)

前記 D N a s e が、野生型ヒト D N a s e 1 または変異体ヒト D N a s e 1 A 1 1 4 F またはアグリコシル化、低グリコシル化もしくは脱グリコシル化変異体ヒト D N a s e 1 N 1 8 S / N 1 0 6 S / A 1 1 4 F である、項目 2 3 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体。

(項目 3 1)

前記第 1 のおよび第 2 の F c ドメインが、ヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含む、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

40

(項目 3 2)

前記第 1 のおよび第 2 の F c ドメインが、セリンによる 3 つのヒンジ領域システイン残基のうちの 1 つまたはそれよりも多くの置換を含む、項目 3 1 に記載のヘテロ二量体。

(項目 3 3)

前記第 1 のおよび第 2 の F c ドメインが、S C C、S S S (残基 2 2 0、2 2 6 および 2 2 9)、G 2 3 6 R、L 3 2 8 R、L 2 3 4 A および L 2 3 5 A からなる群より選択される変異を含む (ナンバリングは E U インデックスに従う)、項目 3 2 に記載のヘテロ二量体。

(項目 3 4)

前記第 1 のおよび第 2 の F c ドメインが、S C C 変異 (残基 2 2 0、2 2 6 および 2 2

50

9)を含む(ナンバリングはE Uインデックスに従う)、項目33に記載のヘテロ二量体。
(項目35)

前記第1のおよび第2のFcドメインが、P238SおよびP331変異を含む(ナンバリングはE Uインデックスに従う)、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目36)

前記第1のおよび第2のFcドメインが、ヘテロ二量体を優先的に形成するための1つまたはそれを超えるCH3変異を含む、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目37)

前記第1のFcドメインが、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vを含み、前記第2のFcドメインが、CH3変異T350V、T366L、K392L、T394Wを含む(ナンバリングはE Uインデックスに従う)、項目36に記載のヘテロ二量体。

10

(項目38)

前記リンカードメインが、ポリペプチドリinker、例えばgly-serリンカーまたはNLGリンカー(vdgasspvnvsspsvqdi)である、上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体。

(項目39)

(i)配列番号5に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号5に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド;および配列番号6に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号6に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

20

(ii)配列番号13に記載されているアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、もしくは配列番号13に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド;および配列番号14に記載されているアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド、もしくは配列番号14に記載されているアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド

からなる群より選択される第1のおよび第2のポリペプチド配列を含む、ヘテロ二量体。

(項目40)

上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、組成物。

30

(項目41)

上記項目のいずれかに記載のヘテロ二量体をコードする、核酸分子。

(項目42)

項目41に記載の核酸分子を含む、組換え発現ベクター。

(項目43)

項目42に記載の組換え発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

(項目44)

項目1~39のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を作製する方法であって、前記ヘテロ二量体をコードする核酸配列を含む宿主細胞を提供すること;および前記ヘテロ二量体が発現される条件下で前記宿主細胞を維持することを含む、方法。

40

(項目45)

異常免疫応答に関連する状態を処置または予防するための方法であって、有効量の項目1~39のいずれか一項に記載のヘテロ二量体を被験体に投与することを含む、方法。

(項目46)

前記状態が自己免疫疾患である、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記自己免疫疾患が、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、実験的自己免疫性関節炎、重症筋無力症、甲状腺炎、実験型ブドウ膜網膜炎、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、自己免疫性萎

50

縮性胃炎、アジソン病、早発閉経、男性不妊症、若年型糖尿病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感性眼炎、水晶体起因性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎H b s - v e、特発性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、強皮症、ヴェーゲナー肉芽腫症、多発性筋炎、皮膚筋炎、円板状LE、全身性エリテマトーデス（S L E）および結合組織病からなる群より選択される、項目46に記載の方法。

（項目48）

前記自己免疫疾患がS L Eである、項目47に記載の方法。

（項目49）

前記自己免疫疾患がシェーグレン症候群である、項目47に記載の方法。

（項目50）

S L Eを処置する方法であって、RNA、DNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む免疫複合体を分解するために有効な量のヘテロ二量体を被験体に投与することを含み、前記組成物が、薬学的に許容され得る担体と、項目1～39のいずれか一項に記載のヘテロ二量体とを含む、方法。

（項目51）

シェーグレン症候群を処置する方法であって、RNA、DNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む免疫複合体を分解するために有効な量のヘテロ二量体を被験体に投与することを含み、前記組成物が、薬学的に許容され得る担体と、項目1～39のいずれか一項に記載のヘテロ二量体とを含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、例示的な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の描写である。

【0036】

【図2】図2は、OD₂₆₀によって測定したRNAse活性を示すグラフである。

【0037】

【図3】図3は、OD₆₂₀（左）およびIC₅₀（右）によって測定したDNAse活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

詳細な説明

全身性エリテマトーデス（S L E）は、自己の核タンパク質に対する高力価自己抗体の存在を特徴とする多系統自己免疫疾患である。S L Eにおける死細胞および死滅中の細胞のクリアランスまたはプロセシングの不全は、主にリボ核タンパク質およびデオキシリボ核タンパク質（核タンパク質と略記される）の蓄積を介して、疾患をもたらすという有力な証拠がある。核タンパク質は、3つの機序を介して損傷を引き起こす：i）先天免疫系を活性化して、炎症性サイトカインを産生する；ii）抗原として機能して、循環免疫複合体を生成する；および、iii）抗原として機能して、腎臓などの局所部位でインサイチュー複合体形成を生じさせる。

【0039】

本発明は、有効量の長時間作用型ヌクレアーゼ活性を投与して、RNAおよびDNAを含む細胞外免疫複合体を分解することによって、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患、例えばS L Eおよびシェーグレン症候群を処置するための方法を提供する。このような処置は、S L Eにおいて顕著なサイトカインであって、疾患活動性および腎炎と強く関連するI型インターフェロン（I F N）の産生を阻害し得る。

【0040】

本発明は、部分的には、このような長時間作用型ヌクレアーゼの提供に関する。特に、本発明は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質、例えば、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよびFc領域を含むタンデム二重ヌクレアーゼ融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質であって、前記第1のヌクレアーゼドメインがDNase1であり、前記第2のヌクレアーゼドメインがRNase1であり、前記DNase1が、リンカーによってまたはリンカーによらずに前記RNase1にN末端からC末端にタンデムに作動可能に連結されており、前記RNase1が、Fc領域のN末端またはC末端に作動可能に連結されているタンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に関する。

【0041】

他の実施形態では、本発明は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質、例えば、第1のヌクレアーゼドメイン、第2のヌクレアーゼドメインおよびFc領域を含むヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であって、前記第1のヌクレアーゼドメインがDNase1であり、前記第2のヌクレアーゼドメインがRNase1であり、前記DNase1が、リンカーによってまたはリンカーによらずにFc領域のN末端またはC末端に作動可能に連結されており、前記RNase1が、リンカーによってまたはリンカーによらずにFc領域のN末端またはC末端に作動可能に連結されており、それにより、ヘテロ二量体を形成するヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に関する。

【0042】

いくつかの態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のまたは第2のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて増強した薬物動態活性を示す。このような最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、第1のまたは第2のヌクレアーゼドメインのいずれか単独と比べて変化した、例えば向上した血清半減期を示す。

【0043】

いくつかの態様では、本発明は、ヒトDNase1、ヒトRNase1および変異体ヒトIgG1-Fcを含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であって、前記ヒトDNase1が、リンカー（例えば、gly-serリンカー）を介してヒトRNase1にN末端からC末端に作動可能に連結されており、前記ヒトRNase1が、リンカーを介して前記変異体ヒトIgG1-Fcドメインに作動可能に連結されており、前記変異体ヒトIgG1が、変異体ヒンジ領域（例えば、セリンなどによるシステイン置換、例えばSCC）と、Fc受容体結合を減少させるための1つまたはそれを超えるCH2変異（例えば、P238S、P331SまたはP238SおよびP331Sの両方、ナンバリングはEUインデックスに従う）とを有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を提供する。一実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ペプチドリンカー（例えば、gly-serリンカー）を介してヒトRNase1に作動可能に連結されたヒトDNase1を含み（N末端-DNase1-リンカー-RNase1-C末端）、ヒトRNase1は、ペプチドリンカー（例えば、gly-serリンカー）を介して、変異体ヒンジ領域SCCヒンジと、P238SおよびP331S変異とを有する変異体ヒトIgG1-Fcドメインに作動可能に連結されている。

【0044】

したがって、一実施形態では、アポトーシス細胞および細胞残屑のクリアランスまたはプロセシングの不全を特徴とする疾患を有する被験体は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が、非コンジュゲートヌクレアーゼドメインと比べて増加したバイオアベイラビリティおよび/または血清半減期を有するように、DNase1およびRNase1の両方を含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を投与することによって処置される。

【0045】

定義

特許請求の範囲および本明細書で使用される用語は、他に指定がない限り、以下に記載されるように定義される。

【0046】

「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびにその後に変更されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメートおよびO-ホスホセリン

10

20

30

40

50

などである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基に結合した炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどを指す。このような類似体は、改変R基（例えば、ノルロイシン）または改変ペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0047】

アミノ酸は、本明細書では、一般的に公知のそれらの三文字記号によって、またはIUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される一文字記号によって言及され得る。同様に、ヌクレオチドもまた、一般的に認められているそれらの一文字コードによって言及され得る。

10

【0048】

「アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸配列（出発ポリペプチドのアミノ酸配列）中の少なくとも1つの既存のアミノ酸残基が、第2の異なる「置き換え」アミノ酸残基で置き換えられることを指す。「アミノ酸挿入」は、所定のアミノ酸配列への少なくとも1つのさらなるアミノ酸の組入れを指す。挿入は、通常、1個または2個のアミノ酸残基の挿入からなるが、より大きな「ペプチド挿入」、例えば、約3～約5個、またはさらには最大約10個、15個もしくは20個のアミノ酸残基の挿入が行われ得る。挿入される残基は天然に存在するものであり得るか、または上記に開示される非天然に存在するものであり得る。「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

20

【0049】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。これらの用語は、1つまたはそれを超えるアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸ポリマーに、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび非天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。

【0050】

「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、および一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかのそれらのポリマーを指す。特に具体的な限定がない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様に代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に指示がない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に改変されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列、ならびに明示的に示されている配列を非明示的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたはそれを超える選択（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成され得る（Batzera, Nucleic Acid Res 1991; 19: 5081; Ohtsukara, JBC 1985; 260: 2605-8); Rossoliniら、Cell Probes 1994; 8: 91-8)。アルギニンおよびロイシンについては、2番目の塩基における改変もまた、保存的であり得る。核酸という用語は、遺伝子、cDNAおよび遺伝子によってコードされるmRNAと互換的に使用される。

30

40

【0051】

本発明のポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチド（これらは、非改変RNAもしくはDNA、または改変RNAもしくはDNAであり得る）から構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるRNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子（これは、一本鎖、より典型的には二本鎖または一本鎖領域と二本鎖領域との

50

混合物であり得る)から構成され得る。加えて、ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された1つまたはそれを超える改変塩基またはDNAまたはRNA骨格を含み得る。「改変」塩基としては、例えば、トリチル化塩基および特殊な塩基、例えばイノシンが挙げられる。DNAおよびRNAに対して、様々な改変が行われ得る；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に改変された形態を包含する。

【0052】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」または「作動可能にカップリングされた」という用語は、記載されている成分が、それらが意図されるように機能することを可能にする関係にある並置を指す。

10

【0053】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化」または「グリコシル化された」という用語は、糖部分を分子(例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質)に付加するプロセスまたは結果を指す。

【0054】

本明細書で使用される場合、「変化したグリコシル化」という用語は、アグリコシル化、脱グリコシル化または低グリコシル化された分子を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化部位」という用語は、炭水化物部分を潜在的に受容し得る部位、および炭水化物部分が実際に付着されたタンパク質であって、オリゴ糖および/または炭水化物のアクセプターとして作用し得る任意のアミノ酸配列を含むタンパク質内の部位の両方を指す。

20

【0056】

本明細書で使用される場合、「アグリコシル化」または「アグリコシル化された」という用語は、(例えば、グリコシル化のアクセプターとして機能するアミノ酸残基を欠くように最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を操作することによる)非グリコシル化形態の分子(例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質)の生産を指す。あるいは、例えば、大腸菌において最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を発現させて、アグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を生産し得る。

30

【0057】

本明細書で使用される場合、「脱グリコシル化」または「脱グリコシル化された」という用語は、分子上の糖部分の酵素的除去のプロセスまたは結果を指す。

【0058】

本明細書で使用される場合、「低グリコシル化」または「低グリコシル化された」という用語は、哺乳動物細胞において産生される場合に通常存在するであろう1つまたはそれを超える炭水化物構造が省略、除去、改変または遮蔽されている分子を指す。

【0059】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」および「Fcドメイン」という用語は、その2本の重鎖の各Fcドメイン(またはFc部分)によって形成されるネイティブな免疫グロブリンの部分であって、抗原に結合する可変領域を有しない部分である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、パパイン切断部位の須玖上流のヒンジ領域において始まり、抗体のC末端で終わる。したがって、完全Fcドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。特定の実施形態では、Fcドメインは、ヒンジ(例えば、上部、中央および/または下部ヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメインまたはそれらのバリエーション、部分もしくは断片の少なくとも1つを含む。他の実施形態では、Fcドメインは、完全Fcドメイン(すなわち、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメイン)を含む。一実施形態では、Fcドメインは、CH3ドメイン(またはその部分)に融合されたヒンジドメイン(またはその部分)を含む。別の実施形態では、Fcドメインは、CH3ドメイン(またはその部分)

40

50

）に融合されたC H 2ドメイン（またはその部分）を含む。別の実施形態では、F cドメインは、C H 3ドメインまたはその部分からなる。別の実施形態では、F cドメインは、ヒンジドメイン（またはその部分）およびC H 3ドメイン（またはその部分）からなる。別の実施形態では、F cドメインは、C H 2ドメイン（またはその部分）およびC H 3ドメインからなる。別の実施形態では、F cドメインは、ヒンジドメイン（またはその部分）およびC H 2ドメイン（またはその部分）からなる。一実施形態では、F cドメインは、少なくともC H 2ドメインの部分（例えば、C H 2ドメインの全部または一部）を欠く。一実施形態では、本発明のF cドメインは、少なくとも、F c R n結合に必要であることが当技術分野で公知のF c分子の部分を含む。一実施形態では、本発明のF cドメインは、少なくとも、プロテインA結合に必要であることが当技術分野で公知のF c分子の部分を含む。一実施形態では、本発明のF cドメインは、少なくとも、プロテインG結合に必要であることが当技術分野で公知のF c分子の部分を含む。本明細書におけるF cドメインは、一般に、免疫グロブリン重鎖のF cドメインの全部または一部を含むポリペプチドを指す。これとしては、限定されないが、C H 1、ヒンジ、C H 2および/またはC H 3ドメインの全体を含むポリペプチド、ならびに例えばヒンジ、C H 2およびC H 3ドメインのみを含むこのようなペプチドの断片が挙げられる。F cドメインは、限定されないが、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g D、I g A、I g EまたはI g M抗体を含む、任意の種および/または任意のサブタイプの免疫グロブリンに由来し得る。F cドメインは、ネイティブなF c分子およびF cバリエーション分子を包含する。F cバリエーションおよびネイティブなF cのように、F cドメインという用語は、全抗体から消化されたかまたは他の手段によって生産されたかにかかわらず、単量体形態または多量体形態の分子を含む。

10

20

【0060】

本明細書に記載されているように、当業者であれば、天然に存在する免疫グロブリン分子のネイティブなF cドメインとはアミノ酸配列が異なるように、任意のF cドメインを改変し得ることを理解するであろう。

【0061】

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のF cドメインは、異なる免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のF cドメインは、I g G 1分子に由来するC H 2および/またはC H 3ドメイン、ならびにI g G 3分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、F cドメインは、I g G 1分子に部分的に由来し、I g G 3分子に部分的に由来するキメラヒンジ領域を含み得る。別の例では、F cドメインは、I g G 1分子に部分的に由来し、I g G 4分子に部分的に由来するキメラヒンジを含み得る。野生型ヒトI g G 1 F cドメインは、配列番号45に記載されているアミノ酸配列を有する。

30

【0062】

本明細書で使用される場合、「血清半減期」という用語は、インビボ血清最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質濃度が50%低下するために必要な時間を指す。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期が短いほど、治療効果を発揮するために必要な時間は短くなるであろう。

40

【0063】

本明細書で使用される場合、「最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質」という用語は、リンカーによってまたはリンカーによらずにF cドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に作動可能に連結された少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを含むポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードする核酸を指す。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質であり、例えば、1つまたはそれを超えるD N a s e 1ドメインおよび1つまたはそれを超えるR N a s e 1ドメインは、1つまたはそれを超えるF cドメインのN末端またはC末端のいずれかにタンデムに連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質である。

50

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用される場合、「タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質」という用語は、(N末端から C末端に) タンデムに連結された少なくとも2つのヌクレアーゼドメインと、 F cドメインまたはそのバリエーションもしくは断片とを含むポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードする核酸を指す。例えば、一実施形態では、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの F cドメインに作動可能に連結された少なくとも1つの D N a s e 1ドメインおよび少なくとも1つの R N a s e 1ドメインを含むポリペプチドである。別の例として、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、N末端からC末端に、D N a s e 1ドメイン、第1のリンカー、R N a s e 1ドメイン、第2のリンカーおよび F cドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含む。

10

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質」という用語は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを共に含む第1のおよび第2のポリペプチドと、2つの F cドメインまたはそのバリエーションもしくは断片とを含むヘテロ二量体、およびこのようなポリペプチドをコードする核酸を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの F cドメインに作動可能に連結された少なくとも1つの D N a s e 1ドメインおよび少なくとも1つの R N a s e 1ドメインを含むヘテロ二量体であり、D N a s e 1ドメインおよび R N a s e 1ドメインが、同じ(第1の F cドメイン)または異なる F cドメイン(第2の F cドメイン)のいずれかの逆末端(N末端またはC末端)に位置するように、D N a s e 1ドメインは、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのN末端またはC末端に作動可能に連結されており、R N a s e 1ドメインは、リンカーによってまたはリンカーによらずに同じ(第1の F cドメイン)または異なる F cドメイン(第2の F cドメイン)のN末端またはC末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、D N a s e 1および R N a s e 1ドメインが、ヘテロ二量体の同じ末端(N末端またはC末端)にタンデムに位置するように、ヘテロ二量体は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのN末端またはC末端に作動可能に連結された D N a s e 1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに第2の F cドメインのN末端またはC末端に作動可能に連結された R N a s e 1ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのN末端に作動可能に連結された D N a s e 1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのC末端に作動可能に連結された R N a s e 1ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、R N a s e 1は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのN末端に作動可能に連結されており、D N a s e 1は、リンカーによってまたはリンカーによらずに第1の F cドメインのC末端に作動可能に連結されている。

20

30

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、野生型ヌクレアーゼまたは F cドメインに由来するポリペプチドであって、1つまたはそれを超える位置における1つまたはそれを超える変化、すなわち置換、挿入および/または欠失によって野生型と異なるポリペプチドを指す。置換は、ある位置を占めるアミノ酸の異なるアミノ酸による置き換えを意味する。欠失は、ある位置を占めるアミノ酸の除去を意味する。挿入は、ある位置を占めるアミノ酸に直接隣接する1個またはそれを超える、例えば1~3個のアミノ酸の付加を意味する。バリエーションポリペプチドは必ず、野生型ポリペプチドと100%未満の配列同一性または類似性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションポリペプチドは、野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と約75%~100%未満のアミノ酸配列同一性もしくは類似性を有するか、または例えばバリエーションポリペプチドの全長に対して約80%~100%未満または約85%~100%未満または約90%~100%未満(例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)または約95%~100%未満のアミノ酸配列同一性もしくは類似性を有するであろう。

40

50

【 0 0 6 7 】

特定の態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、1つまたはそれを超える「リンカードメイン」、例えばポリペプチドリinkerを用いる。本明細書で使用される場合、「リンカードメイン」という用語は、直鎖状ポリペプチド配列における2つまたはそれを超えるペプチドドメインを接続する1つまたはそれを超えるアミノ酸を指す。本明細書で使用される場合、「ポリペプチドリinker」という用語は、タンパク質の直鎖状アミノ酸配列における2つまたはそれを超えるポリペプチドドメインを接続するペプチドまたはポリペプチド配列（例えば、合成ペプチドまたはポリペプチド配列）を指す。例えば、ポリペプチドリinkerは、第1のおよび第2のヌクレアーゼドメインを互いに、または第1のもしくは第2のヌクレアーゼドメインをFcドメインに作動可能に連結するために使用され得る。いくつかの実施形態では、このようなポリペプチドリinkerは、フレキシビリティをポリペプチド分子に提供する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリinkerは、DNase1をRNase1に、および/またはRNase1をFcドメインに接続する（例えば、遺伝的に融合する）ために使用される。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、1つを超えるリンカードメインまたはペプチドリinkerを含み得る。様々なペプチドリinkerが当技術分野で公知である。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、「gly-serポリペプチドリinker」という用語は、グリシン残基およびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的なgly/serポリペプチドリinkerは、アミノ酸配列(Gly₄Ser)_n（配列番号58）を含む。いくつかの実施形態では、nは、1またはそれを超えるもの、例えば2もしくはそれを超えるもの、3もしくはそれを超えるもの、4もしくはそれを超えるもの、5もしくはそれを超えるもの、6もしくはそれを超えるもの、7もしくはそれを超えるもの、8もしくはそれを超えるもの、9もしくはそれを超えるものまたは10もしくはそれを超えるもの（例えば、(Gly₄Ser)₁₀（配列番号59））である。別の例示的なgly/serポリペプチドリinkerは、アミノ酸配列Ser(Gly₄Ser)_n（配列番号60）を含む。いくつかの実施形態では、nは、1またはそれを超えるもの、例えば2もしくはそれを超えるもの、3もしくはそれを超えるもの、4もしくはそれを超えるもの、5もしくはそれを超えるもの、6もしくはそれを超えるもの、7もしくはそれを超えるもの、8もしくはそれを超えるもの、9もしくはそれを超えるものまたは10もしくはそれを超えるもの（例えば、Ser(Gly₄Ser)₁₀（配列番号61））である。

20

30

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される場合、「カップリングされた」、「連結された」、「融合された」または「融合」という用語は互換的に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲーションまたは組換え手段を含むあらゆる手段によって、2つまたはそれを超えるエレメントまたは成分またはドメインを互いに接続することを指す。化学的コンジュゲーションの方法（例えば、ヘテロ二官能性架橋剤を使用する）は、当技術分野で公知である。

【 0 0 7 0 】

指定のポリペプチドまたはタンパク質「に由来する」ポリペプチド配列またはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。好ましくは、特定の配列に由来するポリペプチド配列またはアミノ酸配列は、その配列もしくはその部分（この部分は、少なくとも10～20アミノ酸、好ましくは少なくとも20～30アミノ酸、より好ましくは少なくとも30～50アミノ酸からなる）と本質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または配列中にその起源を有すると当業者が他の方法で同定可能なアミノ酸配列を有する。別のペプチドに由来するポリペプチドは、出発ポリペプチドと比べて1つまたはそれを超える変異、例えば、別のアミノ酸残基で置換されているか、または1つもしくはそれを超えるアミノ酸残基挿入もしくは欠失を有する1つまたはそれを超えるアミノ酸残基を有し得る。

40

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、出発ポリペプチド配列とそれに由来する配列との間において、1個のアミノ酸差異がある。この配列に対する同一性または類似性は、本明細書では、配列をア

50

ラインメントし、必要に応じてギャップを導入して、最大の配列同一性のパーセントを達成した後、出発アミノ酸残基と同一の（すなわち、同じ残基）候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されているアミノ酸配列およびその機能的に活性なバリエーションからなるか、それから本質的になるか、またはそれを含む。実施形態では、ポリペプチドは、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されているアミノ酸配列と少なくとも 80 %、例えば少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されている連続アミノ酸配列と少なくとも 80 %、例えば少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の連続アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されているアミノ酸配列の少なくとも 10 個、例えば少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、少なくとも 30 個、少なくとも 35 個、少なくとも 40 個、少なくとも 45 個、少なくとも 50 個、少なくとも 55 個、少なくとも 60 個、少なくとも 65 個、少なくとも 70 個、少なくとも 75 個、少なくとも 80 個、少なくとも 85 個、少なくとも 90 個、少なくとも 95 個、少なくとも 100 個、少なくとも 200 個、少なくとも 300 個、少なくとも 400 個または少なくとも 500 個（または、これらの数の範囲内の任意の整数）の連続アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ヌクレオチド配列によってコードされている。本開示のヌクレオチド配列は、クローニング、遺伝子治療、タンパク質の発現および精製、変異の導入、それを必要とする宿主の DNA ワクチン接種、例えば受動免疫のための抗体生成、PCR、プライマーおよびプローブの生成、siRNA の設計および生成（例えば、Dharmacon siDesign ウェブサイトを参照のこと）などを含む多くの用途に有用であり得る。いくつかの実施形態では、本開示のヌクレオチド配列は、配列表または配列リストから選択される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、本明細書に開示される配列リストまたは配列表のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも 80 %、例えば少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されているアミノ酸配列をコードする連続ヌクレオチド配列と少なくとも 80 %、例えば少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の連続ヌクレオチド配列を含む。い

くつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、本明細書に開示される配列リストまたは配列表に記載されているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の少なくとも10個、例えば少なくとも15個、例えば少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも55個、少なくとも60個、少なくとも65個、少なくとも70個、少なくとも75個、少なくとも80個、少なくとも85個、少なくとも90個、少なくとも95個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個または少なくとも500個（または、これらの数の範囲内の任意の整数）の連続ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む。

【0074】

また、当業者であれば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ネイティブな配列の望ましい活性を保持しながら、それらの成分（例えば、ヌクレアーゼドメイン、リンカードメインおよびFcドメイン）が由来する天然に存在する配列またはネイティブな配列とは配列が異なるように改変され得ることを理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基において保存的置換または変化をもたらすヌクレオチドまたはアミノ酸の置換が行われ得る。非天然バリエーションをコードする単離された核酸分子は、コードされるタンパク質に1つまたはそれを超えるアミノ酸置換、付加または欠失が導入されるように、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレオチド配列に1つまたはそれを超えるヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することによって作られ得る。変異は、部位特異的変異誘発、およびPCRを介した変異誘発などの標準的な技術によって導入され得る。

【0075】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、1つまたはそれを超えるアミノ酸残基において、例えば必須または非必須アミノ酸残基において、保存的アミノ酸置換を含み得る。「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、類似側鎖を有するアミノ酸残基によって置換されるものである。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質中の非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基によって置き換えられる。別の実施形態では、一連のアミノ酸の連続鎖は、側鎖ファミリーのメンバーの順序および/または組成が異なる構造的に類似した連続鎖によって置き換えられ得る。あるいは、別の実施形態では、飽和変異誘発法などにより、コード配列の全部または一部にわたってランダムに変異を導入し、得られた変異体を最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に組み入れて、それらが所望の標的に結合する能力活性に関してスクリーニングし得る。

【0076】

「改善」という用語は、疾患状態、例えば自己免疫性疾患状態（例えば、SLE、シェーグレン症候群）の処置（その予防、重症度もしくは進行の軽減、寛解または治癒を含む）における任意の治療的に有益な結果を指す。

【0077】

「インサイチュー」という用語は、生物とは別個に成長する（例えば、組織培養下で成長する）生細胞において起こる過程を指す。

【0078】

「インビボ」という用語は、生物において起こる過程を指す。

【0079】

本明細書で使用される場合、「哺乳動物」または「被験体」または「患者」という用語は、ヒトおよび非ヒトの両方を含み、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長動物、イヌ科動

10

20

30

40

50

物、ネコ科動物、ネズミ科動物、ウシ科動物、ウマ科動物およびブタ科動物を含む。

【0080】

2つまたはそれを超える核酸配列またはポリペプチド配列の文脈において、「同一性」のパーセントという用語は、最大一致について比較およびアラインメントする際、下記配列比較アルゴリズムの1つ（例えば、BLASTPおよびBLASTN、または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）を使用して、または目視検査によって測定した場合に同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の規定パーセンテージを有する2つまたはそれを超える配列または部分配列を指す。用途に応じて、「同一性」パーセントは、比較する配列のある領域、例えば機能的ドメインにわたって存在し得るか、または代替的に、比較する2つの配列の全長にわたって存在し得る。

10

【0081】

配列の比較のために、典型的には、ある配列は、試験配列と比較するための参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列の座標を指定して、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定プログラムのパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性のパーセントを計算する。

【0082】

比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv Appl Math 1981; 2: 482の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J Mol Biol 1970; 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, PNAS 1988; 85: 2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ・インプリメンテーション (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA) により、または目視検査により行われ得る（一般に、Ausubelら、下記を参照のこと）。

20

【0083】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するために適切なアルゴリズムの一例はBLASTアルゴリズムであり、Altschulら、J Mol Biol 1990; 215: 403-10に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトを通じて公開されている。

30

【0084】

「十分量」という用語は、所望の効果を生じさせるために十分な量を意味する。

【0085】

「治療有効量」という用語は、疾患の症候を改善するために有効な量である。予防は治療とみなされ得るので、治療有効量は、「予防有効量」であり得る。

【0086】

「約」という用語は、当業者によって理解され、それが使用される文脈に応じてある程度変動するであろう。それが使用される文脈を考慮して当業者に明らかではない用語が使用される場合、「約」は、特定の値の $\pm 10\%$ までを意味するであろう。

40

【0087】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、「a」、「an」および「the」という単数形は、文脈上特に明確な指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意すべきである。

【0088】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、それが融合されたヌクレアーゼ分子の血清半減期を、Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に融合されていない

50

ヌクレアーゼ分子と比較して変化させる F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含む。

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に作動可能にカップリングされたヌクレアーゼドメインを含む。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、リンカードメインを介して F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に作動可能にカップリングされている。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、リンカーペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、リンカーヌクレオチドである。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リーダー分子、例えばリーダーペプチドを含む。いくつかの実施形態では、リーダー分子は、ヌクレアーゼドメインの N 末端に位置するリーダーペプチドである。いくつかの実施形態では、本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、分子の N 末端にリーダーペプチドを含み、リーダーペプチドは、その後、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質から切断される。組換えタンパク質に融合されたリーダーペプチドをコードする核酸配列を生成するための方法は、当技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質はいずれも、それらの N 末端に融合されたリーダーを伴ってまたは伴わずに発現され得る。融合リーダーペプチドの切断後の本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のタンパク質配列は、当業者によって予測および/または推定され得る。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態では、リーダーは、V K 3 リーダーペプチド (V K 3 L P) であり、リーダーペプチドは、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の N 末端に融合されている。このようなリーダー配列は、哺乳動物細胞における最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の合成および分泌のレベルを向上させ得る。いくつかの実施形態では、リーダーが切断されて、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が生じる。いくつかの実施形態では、本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、その N 末端に融合されたリーダーペプチドを伴わずに発現され、得られた最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、N 末端メチオニンを有する。

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、互いにタンデムに作動可能にカップリングされた 2 つのヌクレアーゼドメインであって、同じまたは異なる F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片の N 末端または C 末端にさらに作動可能にカップリングされた 2 つのヌクレアーゼドメインを含む。

【 0 0 9 4 】

図 1 は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の例示的な構成を示し、配列表は、様々な構成の例示的な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の配列を提供する。

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、細胞外免疫複合体に特異的に結合する同じまたは異なる F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に融合されたマルチヌクレアーゼタンパク質 (例えば、異なる基質特異性を有する R N a s e および D N a s e の両方または 2 つの R N A もしくは D N A ヌクレアーゼ) である。

【 0 0 9 6 】

一実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、F c ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片の N 末端に作動可能にカップリングされている (例えば、(例えば、直接的にまたはポリペプチドリinkerを介して) 化学的にコンジュゲートされているか、または遺伝的

10

20

30

40

50

に融合されている)。別の実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片のC末端に作動可能にカップリングされている(例えば、(例えば、直接的にまたはポリペプチドリンカーを介して)化学的にコンジュゲートされているか、または遺伝的に融合されている)。他の実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片のアミノ酸側鎖を介して作動可能にカップリングされている(例えば、(例えば、直接的にまたはポリペプチドリンカーを介して)化学的にコンジュゲートされているか、または遺伝的に融合されている)。

【0097】

特定の実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、2つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインと、少なくとも1つのFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片とを含む。例えば、ヌクレアーゼドメインは、ヌクレアーゼドメインとFcドメイン、そのバリエーションまたは断片との間の任意選択のリンカーによって、同じまたは異なるFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片のN末端およびC末端の両方に作動可能にカップリングされ得る。いくつかの態様では、ヌクレアーゼドメインは同一のものである(例えば、RNaseおよびRNase、またはDNase1およびDNase1)。他の実施形態では、ヌクレアーゼドメインは異なるものである(例えば、DNaseおよびRNase)。

【0098】

いくつかの実施形態では、2つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインは、(例えば、ポリペプチドリンカーを介して)互いに直列に作動可能にカップリングされており、タンデムに整列したヌクレアーゼドメインは、同じまたは異なるFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片のN末端またはC末端のいずれかに作動可能にカップリングされている(例えば、(例えば、直接的にまたはポリペプチドリンカーを介して)化学的にコンジュゲートされているか、または遺伝的に融合されている)。他の実施形態では、タンデムに整列したヌクレアーゼドメインは、同じFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片のN末端およびC末端の両方に作動可能にカップリングされている。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、リンカーによってまたはリンカーによらずに同じまたは異なるFcドメインのN末端またはC末端にタンデムに(例えば、N-DNase-RNase-CまたはN-RNase-DNase-C)作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、タンデム二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ホモ二量体またはヘテロ二量体を形成する。

【0099】

他の実施形態では、1つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインは、2つのFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片の間に挿入され得る。例えば、1つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインは、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のポリペプチドリンカーの全部または一部を形成し得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメイン(例えば、RNaseおよびDNase)、少なくとも1つのリンカードメイン、および少なくとも1つのFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、上記のようにFcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含み、それにより、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期およびバイオアベイラビリティを増加させる。

【0102】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、1つまたはそれを超えるポリペプチド、例えば配列番号1~17のいずれかに示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0103】

10

20

30

40

50

当業者であれば、ヌクレアーゼドメイン間に、および/またはヌクレアーゼドメインとFcドメインとの間に任意選択のリンカーを含めることによって、ヌクレアーゼドメインおよびFcドメインの他の構成が可能であると理解するであろう。また、試験される特定の構成においてヌクレアーゼドメインが活性である限り、ドメインの方向を変化させ得ると理解されよう。

【0104】

特定の実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、生物学的効果を媒介する標的分子に特異的な少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを有する。別の実施形態では、標的分子（例えば、DNAまたはRNA）に対する本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の結合は、例えば細胞、組織から、または循環からの標的分子の減少または排除をもたらす。

10

【0105】

他の実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、互いにまたは他のポリペプチドと共にアセンブルして、2つまたはそれを超えるポリペプチドを有する結合タンパク質（「多量体」）を形成し得、多量体の少なくとも1つのポリペプチドは、本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質である。例示的な多量体形態としては、二量体、三量体、四量体および六量体の変化結合タンパク質などが挙げられる。一実施形態では、多量体のポリペプチドは同じものである（すなわち、ホモマー変化結合タンパク質、例えばホモ二量体、ホモ四量体）。別の実施形態では、多量体のポリペプチドは異なるものである（例えば、ヘテロマー）。

20

【0106】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に融合されていない対応するヌクレアーゼ分子と比べて少なくとも約1.5倍、例えば少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍または1000倍またはそれを超えて増加した血清半減期を有する。他の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に融合されていない対応するヌクレアーゼ分子と比べて少なくとも約1.5倍、例えば少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍または500倍またはそれ未満に減少した血清半減期を有する。本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期を決定するために、当技術分野で認められているルーチンな方法が使用され得る。

30

【0107】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質中のRNaseの活性は、対照RNase分子の活性の約10倍未満、例えば9倍未満、8倍未満、7倍未満、6倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満または2倍未満よりも低いものではない。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質中のRNaseの活性は、対照RNase分子の活性とほぼ同等である。

40

【0108】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質中のDNaseの活性は、対照DNase分子の活性の約10倍未満、例えば9倍未満、8倍未満、7倍未満、6倍未満、5倍未満、4倍未満、3倍未満または2倍未満よりも低いものではない。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質中のDNaseの活性は、対照DNase分子の活性とほぼ同等である。

【0109】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、例えば可溶性形

50

態のまたは不溶性複合体として沈着したDNAおよび/またはRNAを含有する細胞外免疫複合体に対して活性であり得る。

【0110】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の活性は、インビトロおよび/またはインビボで検出可能である。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、細胞、悪性細胞または癌細胞に結合し、その生物学的活性を妨害する。

【0111】

別の態様では、結合特異性を有する別の酵素または抗体、例えば、第1のドメインと同じまたは異なる特異性でRNAまたはDNAまたは第2のヌクレアーゼドメインにターゲティングされるscFvに付着された多機能RNaseまたはDNase分子が提供される。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、リンカードメインは、リンカーの長さを5アミノ酸進めて変化させる(gly4ser)3、4または5バリエーションを含む。別の実施形態では、リンカードメインは、約18アミノ酸長であり、インビボでプロテアーゼ切断に感受性であり得るN結合型グリコシル化部位を含む。いくつかの実施形態では、N結合型グリコシル化部位は、リンカードメインにおける切断から最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を保護し得る。いくつかの実施形態では、N結合型グリコシル化部位は、リンカードメインによって分離された独立した機能的ドメインのフォールディングの分離を支援し得る。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、リンカードメインは、NLGリンカー(VDGASSPVNVSSPSVQDI)(配列番号41)である。

【0114】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNaseの実質的に全部または少なくとも酵素的に活性な断片を含む。いくつかの実施形態では、DNaseは、I型分泌DNase、好ましくはヒトDNase、例えば成熟ヒト脾臓DNase1(UniProtKBエントリーP24855、配列番号20)である。いくつかの実施形態では、減少したアクチン感受性を示す天然に存在するバリエーション対立遺伝子A114F(配列番号21)は、DNase1最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に含まれる(Panら、JBC 1998; 273: 18374-81; Zhenら、BBRC 1997; 231: 499-504; Rodriguezら、Genomics 1997; 42: 507-13を参照のこと)。他の実施形態では、野生型DNase1と比べて高いDNase活性を示す天然に存在するバリエーション対立遺伝子G105R(配列番号22)は、DNase1最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に含まれる(Yasudaら、Int J Biochem Cell Biol 2010; 42: 1216-25を参照のこと)。いくつかの実施形態では、ヒトDNase1のより安定な誘導体を生成するために、この変異が最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に導入される。いくつかの実施形態では、DNaseは、ヒト野生型DNase1であるか、またはすべての潜在的なN結合型グリコシル化部位、すなわち、配列番号20に記載されているDNase1ドメインの位置18および106のアスパラギン残基(これは、ネイティブなリーダーを有する全長脾臓DNase1(配列番号23)のそれぞれ位置40および128のアスパラギン残基に対応する)を除去するように変異されたヒトDNase1 A114F(すなわち、ヒトDNase1 N18S/N106S/A114F、配列番号24)である。

30

40

【0115】

いくつかの実施形態では、DNaseは、DNase機能性およびクロマチン切断を増加させるための1つまたはそれを超える塩基性(すなわち、正荷電)アミノ酸置換を含むヒトDNase1である。いくつかの実施形態では、DNA基質上の負荷電リン酸との結合を増強するために、塩基性アミノ酸がヒトDNase1のDNA結合面に導入される(

50

米国特許第 7 4 0 7 7 8 5 号；米国特許第 6 3 9 1 6 0 7 号を参照のこと）。この過剰活性 DNase 1 は、「クロマチンカッター」と称され得る。

【0116】

いくつかの実施形態では、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個または 6 個の塩基性アミノ酸置換が DNase 1 に導入される。例えば、DNA 結合を増強するために、以下の残基の 1 つまたはそれよりも多くが変異される：Gln9、Glu13、Thr14、His44、Asn74、Asn110、Thr205。いくつかの実施形態では、上記アミノ酸の 1 つまたはそれよりも多くは、塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジンおよび/またはヒスチジンで置換される。例えば、変異体ヒト DNase は、以下の置換の 1 つまたはそれよりも多くを含み得る：Q9R、E13R、T14K、H44K、N74K、N110R、T205K。いくつかの実施形態では、変異体ヒト DNase 1 はまた、アクチン感受性を減少させる A114F 置換を含む（米国特許第 6 3 4 8 3 4 3 号を参照のこと）。一実施形態では、変異体ヒト DNase 1 は、以下の置換を含む：E13R、N74K、A114F および T205K。

10

【0117】

いくつかの実施形態では、変異体ヒト DNase 1 は、潜在的なグリコシル化部位、例えば、配列番号 20 に記載されている DNase 1 ドメインの位置 18 および 106 のアスパラギン残基（これは、ネイティブなリーダーを有する全長膵臓 DNase 1 のそれぞれ位置 40 および 128 のアスパラギン残基に対応する）を除去するための変異をさらに含む。一実施形態では、変異体ヒト DNase 1 は、以下の置換を含む：E13R / N74K / A114F / T205K / N18S / N106S。

20

【0118】

いくつかの実施形態では、DNase は、DNase 1 様 (DNase L) 酵素 1 ~ 3 (UniProtKB エントリー Q13609；配列番号 46) である。いくつかの実施形態では、DNase は、3 プライム修復エキソヌクレアーゼ 1 (TREX1；UniProtKB エントリー Q9NSU2；配列番号 47) である。いくつかの実施形態では、DNase は、DNase 2 である。いくつかの実施形態では、DNase 2 は、DNAse2（すなわち、DNase2；UniProtKB エントリー O00115 配列番号 48）または DNase2（すなわち、DNase2 様酸 DNase；UniProtKB エントリー Q8WZ79；配列番号 49）である。いくつかの実施形態では、DNase1L3、TREX1、DNase2 または DNase2 の N 結合型グリコシル化部位は、潜在的な N 結合型グリコシル化部位を除去するように変異されている。いくつかの実施形態では、20 または 25 aa のリンカードメインを含有する DNase - リンカー - Fc ドメインが作製される。

30

【0119】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、RNase A ファミリーの RNase 1、好ましくはヒト膵臓 RNase 1 (UniProtKB エントリー P07998；配列番号 27) を含む。いくつかの実施形態では、ヒト RNase 1 は、潜在的な N 結合型グリコシル化部位、すなわち、配列番号 27 に記載されている RNase 1 ドメインの位置 34、76 および 88 のアスパラギン残基（これは、ネイティブなリーダーを有する全長膵臓 RNase 1 (配列番号 29) のそれぞれ位置 62、104 および 116 のアスパラギン残基に対応する）を除去するように変異されている（ヒト RNase 1 N34S / N76S / N88S、配列番号 28）。いくつかの実施形態では、20 または 25 aa のリンカードメインを含有する RNase 1 - リンカー - Fc が作製される。

40

【0120】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNase - リンカー - RNase - Fc を含み、RNase 1 ドメインは、Fc の COOH 側に位置する。他の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNase - リンカー - RNase - Fc を含み、RNase 1 ドメインは、Fc の NH2 側に位置する。い

50

くつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNase - Fc および RNase - Fc ; DNase 1 - Fc - リンカー - RNase および Fc ドメイン ; DNase 1 - Fc および Fc - リンカー - RNase ; Fc - リンカー - DNase 1 および Fc - リンカー - RNase ; RNase - Fc - リンカー - DNase および Fc ドメイン ; Fc - リンカー - DNase および RNase - Fc ; ならびに RNase - Fc - リンカー - DNase を含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の酵素ドメインと他のドメインとの間の融合接合が最適化される。

【0122】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の RNase 酵素活性の標的は、主に、例えば抗 RNP 自己抗体との免疫複合体に含まれる RNA と、アポトーシスを受ける細胞の表面上で発現される RNA とからなる細胞外である。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、エンドサイトーシス小胞の酸性環境において活性である。いくつかの実施形態では、Fc ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、細胞外およびエンドサイトーシス環境の両方において活性であるように適合されている。いくつかの態様では、これは、野生型 Fc ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片を含む最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が、事前に貪食された免疫複合体による、またはウイルス感染後に TLR7 を活性化する RNA による TLR7 シグナル伝達を停止することを可能にする。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の野生型 RNase は、RNase 細胞質阻害剤による阻害に対して耐性ではない。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の野生型 RNase は、細胞の細胞質において活性ではない。

【0123】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNase および RNase の両方を含む。いくつかの実施形態では、これらの最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、RNA、DNA または RNA および DNA の両方の組み合わせを含有する免疫複合体を消化または分解し、細胞外において活性であるので、SLE の治療を向上させる。

【0124】

Fc ドメイン

いくつかの実施形態では、1 つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインを含むポリペプチドは、足場として、ならびにポリペプチドの血清半減期を増加させるための手段として機能する Fc ドメインに作動可能にカップリングされている。いくつかの実施形態では、1 つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインおよび / または Fc ドメインは、アグリコシル化、脱グリコシル化または低グリコシル化されている。

【0125】

適切な Fc ドメインは当技術分野で周知であり、限定されないが、Fc および Fc バリエーション、例えば国際公開第 2011/053982 号、国際公開第 02/060955 号、国際公開第 02/096948 号、国際公開第 05/047327 号、国際公開第 05/018572 号および米国特許出願公開第 2007/0111281 号（上記の内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているものが挙げられる。（変化したグリコシル化の有無にかかわらず）Fc ドメインを本明細書に開示される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に導入するためのルーチンな方法（例えば、クローニング、コンジュゲーション）を使用することは、当業者の能力の範囲内である。

【0126】

いくつかの実施形態では、Fc ドメインは、例えば配列番号 45 に示されている野生型ヒト IgG1 Fc である。

【0127】

いくつかの実施形態では、Fcドメインは、例えば、アミノ酸付加、欠失または置換をもたらす変異によって変化または改変されている。本明細書で使用される場合、「Fcドメインバリエーション」という用語は、Fcドメインが由来する野生型Fcと比較して、少なくとも1つのアミノ酸改変、例えばアミノ酸置換を有するFcドメインを指す。例えば、FcドメインがヒトIgG1抗体に由来する場合、バリエーションは、ヒトIgG1 Fc領域の対応する位置における野生型アミノ酸と比較して、少なくとも1つのアミノ酸変異（例えば、置換）を含む。Fcバリエーションのアミノ酸置換は、その残基が抗体のFc領域において与えられる位置番号に対応するとみなされるFcドメイン内の位置に位置し得る（ナンバリングはEUIンデックスに従う）。

【0128】

一実施形態では、Fcバリエーションは、ヒンジ領域またはその一部に位置するアミノ酸位置における1つまたはそれを超えるアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、Fcバリエーションは、CH2ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置における1つまたはそれを超えるアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、Fcバリエーションは、CH3ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置における1つまたはそれを超えるアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、Fcバリエーションは、CH4ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置における1つまたはそれを超えるアミノ酸置換を含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、N83において変異（すなわち、KababタンバリングによるN297）を有し、アグリコシル化Fc領域（例えば、Fc N83S；配列番号50）が生じる。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、3つのヒンジ領域システイン（残基220、226および229、ナンバリングはEUIンデックスに従う）の1つまたはそれよりも多くにおける変異を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン中の3つのヒンジシステインの1つまたはそれよりも多くは、SCC（配列番号51）またはSSS（配列番号52）に変異され得、「S」は、セリンによるシステインのアミノ酸置換を表す。したがって、「SCC」は、3つのヒンジ領域システインの第1のシステインのみがセリンにアミノ酸置換されていることを示すのに対して（残基220、226および229、ナンバリングはEUIンデックスに従う）、「SSS」は、ヒンジ領域中の3つのシステインすべてがセリンで置換されていることを示す（残基220、226および229、ナンバリングはEUIンデックスに従う）。

【0130】

いくつかの態様では、Fcドメインは、変異体ヒトIgG1 Fcドメインである。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインにおける1つまたはそれを超える変異を含む。

【0131】

CH2置換

いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238S変異を含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P331S変異を含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238S変異およびP331S変異を含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238Sおよび/またはP331Sを含み、3つのヒンジシステイン（残基220、226および229）の1つまたはそれよりも多くにおける変異を含み得る（ナンバリングはEUIンデックスに従う）。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238Sおよび/もしくはP331S、ならびに/または3つのヒンジシステイン（残基220、226および229）における1つまたはそれを超える変異を含む（ナンバリングはEUIンデックスに従う）。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238Sおよび/もしくはP331S、ならびに/またはヒンジシステインにおけるSCCへの変異、もしくは3つのヒンジシステインにおけるSSSへの変異を含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238SおよびP331S、ならびに3つのヒンジシステインの少なくとも1つにおける変異を含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238SおよびP331SおよびSCCを含む。いくつかの態様では、変

10

20

30

40

50

異体Fcドメインは、P238SおよびP331SおよびSSSを含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P238SおよびSCCまたはSSSを含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、P331SおよびSCCまたはSSSを含む。(ナンバリングはすべてEUIンデックスに従う)。

【0132】

いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、N297などのN結合型グリコシル化部位における変異、例えばセリンなどの別のアミノ酸によるアスパラギンの置換、例えばN297Sを含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、N297などのN結合型グリコシル化部位における変異、例えばセリンなどの別のアミノ酸によるアスパラギンの置換、例えばN297Sと、3つのヒンジシステインの1つまたはそれよりも多くにおける変異とを含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、N297などのN結合型グリコシル化部位における変異、例えばセリンなどの別のアミノ酸によるアスパラギンの置換、例えばN297Sと、3つのヒンジシステインの1つにおけるSCCへの変異、または3つのヒンジシステインのすべてにおけるSSSへの変異とを含む。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、N297などのN結合型グリコシル化部位における変異、例えばセリンなどの別のアミノ酸によるアスパラギンの置換、例えばN297と、CH2ドメインにおける1つまたはそれを超える変異であって、FcR結合および/または補体活性化を減少させる1つまたはそれを超える変異、例えばP238またはP331またはその両方における変異、例えばP238SまたはP331SまたはP238SおよびP331Sの両方とを含む。いくつかの態様では、このような変異体Fcドメインは、ヒンジ領域における変異、例えばSCCまたはSSSをさらに含み得る。(ナンバリングはすべてEUIンデックスに従う)。いくつかの態様では、変異体Fcドメインは、本明細書の配列表または配列リストに示されているとおりである。

【0133】

CH3置換

ヘテロ二量体は、本明細書に開示されるヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質上のFcドメインのCH3ドメインにおける変異によって優先的に形成され得る。最初に、ヘテロ二量体化のために、「ノブ・イントゥ・ホール」戦略(Rigway Bら、Protein Eng., 9(1996)pp. 617-621)を使用して、重鎖を最初に操作した。「ノブ・イントゥ・ホール」という用語は、それらの相互作用面において凸部(ノブ)を一方のポリペプチドに導入し、凹部(ホール)を他方のポリペプチドに導入することによって、2つのポリペプチドがインビトロまたはインビボで互いにペアリングすることを誘導する技術を指す。例えば、国際公開第96/027011号、国際公開第98/050431号、米国特許第5,731,168号、米国特許出願公開第2007/0178552号、国際公開第2009089004号、米国特許出願公開第20090182127号を参照のこと。特に、CH3ドメインにおける変異の組み合わせ、例えば「ノブ」重鎖におけるS354C、T366W、および「ホール」重鎖におけるY349C、T366S、L368A、Y407Vは、ヘテロ二量体を優先的に形成するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ノブ変異T366Wを有する第1のCH3ドメインと、ホール変異T366S、L368AおよびY407Vを有する第2のCH3ドメインとを含む。(ナンバリングはEUIンデックスに従う)。

【0134】

いくつかの実施形態では、CH3変異は、Zymeworks(米国特許出願公開第2012/0149876号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)およびVon Kreudenstein, T.Sら、mAbs, 5(2013), pp. 646-654)によって記載されているものであり、以下の変異が挙げられる: T350V、L351Y、F405AおよびY407V(第1のCH3ドメイン); ならびにT350V、T366L、K392L、T394W(第2のCH3ドメイン)。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、T350V、

10

20

30

40

50

L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V 変異を有する第 1 の C H 3 ドメインと、T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、T 3 9 4 W 変異を有する第 2 の C H 3 ドメインとを含む。(ナンバリングは E U インデックスに従う)。

【0135】

いくつかの実施形態では、C H 3 変異は、Moore, G. L ら、(mAbs, 3 (2011), pp. 546 - 557) によって記載されているものであり、以下の変異が挙げられる：S 3 6 4 H および F 4 0 5 A (第 1 の C H 3 ドメイン)；ならびに Y 3 4 9 T および T 3 9 4 F (第 2 の C H 3 ドメイン)。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、S 3 6 4 H および F 4 0 5 A 変異を有する第 1 の C H 3 ドメインと、Y 3 4 9 T および T 3 9 4 F 変異を有する第 2 の C H 3 ドメインとを含む。(ナンバリングは E U インデックスに従う)。

10

【0136】

いくつかの実施形態では、C H 3 変異は、Gunasekaran, K ら、(J. Biol. Chem., 285 (2010), pp. 19637 - 19646) によって記載されているものであり、以下の変異が挙げられる：K 4 0 9 D および K 3 9 2 D (第 1 の C H 3 ドメイン)；ならびに D 3 9 9 K および E 3 6 5 K (第 2 の C H 3 ドメイン)。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヘテロ二量体二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、K 4 0 9 D および K 3 9 2 D 変異を有する第 1 の C H 3 ドメインと、D 3 9 9 K および E 3 6 5 K 変異を有する第 2 の C H 3 ドメインとを含む。(ナンバリングは E U インデックスに従う)。

20

【0137】

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、当技術分野で認められている F c バリエーションであって、エフェクター機能および/または F c R 結合の変化を付与することが公知の F c バリエーションを用い得る。例えば、国際公開第 8 8 / 0 7 0 8 9 号、国際公開第 9 6 / 1 4 3 3 9 号、国際公開第 9 8 / 0 5 7 8 7 号、国際公開第 9 8 / 2 3 2 8 9 号、国際公開第 9 9 / 5 1 6 4 2 号、国際公開第 9 9 / 5 8 5 7 2 号、国際公開第 0 0 / 0 9 5 6 0 号、国際公開第 0 0 / 3 2 7 6 7 号、国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号、国際公開第 0 2 / 4 4 2 1 5 号、国際公開第 0 2 / 0 6 0 9 1 9 号、国際公開第 0 3 / 0 7 4 5 6 9 号、国際公開第 0 4 / 0 1 6 7 5 0 号、国際公開第 0 4 / 0 2 9 2 0 7 号、国際公開第 0 4 / 0 3 5 7 5 2 号、国際公開第 0 4 / 0 6 3 3 5 1 号、国際公開第 0 4 / 0 7 4 4 5 5 号、国際公開第 0 4 / 0 9 9 2 4 9 号、国際公開第 0 5 / 0 4 0 2 1 7 号、国際公開第 0 4 / 0 4 4 8 5 9 号、国際公開第 0 5 / 0 7 0 9 6 3 号、国際公開第 0 5 / 0 7 7 9 8 1 号、国際公開第 0 5 / 0 9 2 9 2 5 号、国際公開第 0 5 / 1 2 3 7 8 0 号、国際公開第 0 6 / 0 1 9 4 4 7 号、国際公開第 0 6 / 0 4 7 3 5 0 号および国際公開第 0 6 / 0 8 5 9 6 7 号；米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 1 3 2 9 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 1 3 2 9 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 7 7 6 5 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 7 7 6 6 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 7 7 6 7 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 4 3 1 8 8 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 0 2 4 8 6 0 3 号、米国特許出願公開第 2 0 0 7 0 2 8 6 8 5 9 号、米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 0 5 7 0 5 6 号；または米国特許第 5, 6 4 8, 2 6 0 号；米国特許第 5, 7 3 9, 2 7 7 号；米国特許第 5, 8 3 4, 2 5 0 号；米国特許第 5, 8 6 9, 0 4 6 号；米国特許第 6, 0 9 6, 8 7 1 号；米国特許第 6, 1 2 1, 0 2 2 号；米国特許第 6, 1 9 4, 5 5 1 号；米国特許第 6, 2 4 2, 1 9 5 号；米国特許第 6, 2 7 7, 3 7 5 号；米国特許第 6, 5 2 8, 6 2 4 号；米国特許第 6, 5 3 8, 1 2 4 号；米国特許第 6, 7 3 7, 0 5 6 号；米国特許第 6, 8 2 1, 5 0 5 号；米国特許第 6, 9 9 8, 2 5 3 号；米国特許第 7, 0 8 3, 7 8 4 号；および米国特許第 7, 3 1 7, 0 9 1 号(これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているアミノ酸位置の 1 つまたはそれよりも多くにおける変化(例えば、置換)。一実施形態では、特定の変更(例えば、当技術分野で開示されている 1 つまたはそれを超えるアミノ酸の特定の置換)は、開示されるアミノ酸位置の 1 つまたはそれよりも多くにおいて行われ得る。別の実施形態では、開示さ

30

40

50

れるアミノ酸位置の1つまたはそれよりも多くにおける異なる変更（例えば、当技術分野で開示されている1つまたはそれを超えるアミノ酸位置の異なる置換）が行われ得る。

【0138】

Fcドメインにおける他のアミノ酸変異は、Fc受容体およびFc受容体サブタイプに対する結合を減少させると考えられる。Fcドメインへのアミノ酸残基番号の割り当ては、Kabatsの定義に従う。例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections), 5th edition, Bethesda, MD: NIH vol. 1: 647 - 723 (1991); Kabatら、「Introduction」Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of Health and Human Services, NIH, 5th edition, Bethesda, MD vol. 1: xii - xcvi (1991); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987); Chothiaら、Nature 342: 878 - 883 (1989)（これらはそれぞれ、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

10

【0139】

例えば、2004年5月18日に発行された米国特許第6,737,056号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、Fc領域の位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、312、315、322、324、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、356、360、373、376、378、379、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439における変異は、結合を変化させ得る。この特許では、IgG3におけるPro331をSerに変更すると、非変異IgG3と比較して6倍低い親和性がもたらされたことが報告されたが、これは、FcRI結合におけるPro331の関与を示している。加えて、1997年4月29日に発行された米国特許第5,624,821号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）には、位置234、235、236および237、297、318、320および322におけるアミノ酸改変は、受容体結合親和性を潜在的に変化させると開示されている。（ナンバリングはEUIンデックスに従う）。

20

30

【0140】

使用のために企図されるさらなる変異としては、例えば、2006年10月19日に公開された米国特許出願公開第2006/0235208号（これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。この刊行物には、Fc受容体に対する結合の減少、抗体依存性細胞性細胞傷害の減少、または補体依存性細胞傷害の減少を示すFcバリエーションであって、232G、234G、234H、235D、235G、235H、236I、236N、236P、236R、237K、237L、237N、237P、238K、239R、265G、267R、269R、270H、297S、299A、299I、299V、325A、325L、327R、328R、329K、330I、330L、330N、330P、330Rおよび331L（ナンバリングはEUIンデックスに従う）を含む、Fc領域における少なくとも1つのアミノ酸改変を含むFcバリエーション、ならびに二重変異体236R/237K、236R/325L、236R/328R、237K/325L、237K/328R、325L/328R、235G/236R、267R/269R、234G/235G、236R/237K/325L、236R/325L/328R、235G/236R/237Kおよび237K/325L/328Rが記載されている。この刊行物に記載されている使用のため

40

50

に企図される他の変異としては、2 2 7 G、2 3 4 D、2 3 4 E、2 3 4 G、2 3 4 I、
 2 3 4 Y、2 3 5 D、2 3 5 I、2 3 5 S、2 3 6 S、2 3 9 D、2 4 6 H、2 5 5 Y、
 2 5 8 H、2 6 0 H、2 6 4 I、2 6 7 D、2 6 7 E、2 6 8 D、2 6 8 E、2 7 2 H、
 2 7 2 I、2 7 2 R、2 8 1 D、2 8 2 G、2 8 3 H、2 8 4 E、2 9 3 R、2 9 5 E、
 3 0 4 T、3 2 4 G、3 2 4 I、3 2 7 D、3 2 7 A、3 2 8 A、3 2 8 D、3 2 8 E、
 3 2 8 F、3 2 8 I、3 2 8 M、3 2 8 N、3 2 8 Q、3 2 8 T、3 2 8 V、3 2 8 Y、
 3 3 0 I、3 3 0 L、3 3 0 Y、3 3 2 D、3 3 2 E、3 3 5 D、位置2 3 5および2 3
 6の間へのGの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのAの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのSの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのTの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのNの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのDの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのVの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのLの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのGの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのAの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのSの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのTの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのNの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのDの挿入、位置2 3 5および2 3
 6の間へのVの挿入、位置2 3 5および2 3 6の間へのLの挿入、位置2 9 7および2 9
 8の間へのGの挿入、位置2 9 7および2 9 8の間へのAの挿入、位置2 9 7および2 9
 8の間へのSの挿入、位置2 9 7および2 9 8の間へのDの挿入、位置3 2 6および3 2
 7の間へのGの挿入、位置3 2 6および3 2 7の間へのAの挿入、位置3 2 6および3 2
 7の間へのTの挿入、位置3 2 6および3 2 7の間へのDの挿入ならびに位置3 2 6およ
 び3 2 7の間へのEの挿入（ナンバリングはE Uインデックスに従う）が挙げられる。加
 えて、米国特許出願公開第2 0 0 6 / 0 2 3 5 2 0 8号に記載されている変異としては、
 2 2 7 G / 3 3 2 E、2 3 4 D / 3 3 2 E、2 3 4 E / 3 3 2 E、2 3 4 Y / 3 3 2 E、
 2 3 4 I / 3 3 2 E、2 3 4 G / 3 3 2 E、2 3 5 I / 3 3 2 E、2 3 5 S / 3 3 2 E、
 2 3 5 D / 3 3 2 E、2 3 5 E / 3 3 2 E、2 3 6 S / 3 3 2 E、2 3 6 A / 3 3 2 E、
 2 3 6 S / 3 3 2 D、2 3 6 A / 3 3 2 D、2 3 9 D / 2 6 8 E、2 4 6 H / 3 3 2 E、
 2 5 5 Y / 3 3 2 E、2 5 8 H / 3 3 2 E、2 6 0 H / 3 3 2 E、2 6 4 I / 3 3 2 E、
 2 6 7 E / 3 3 2 E、2 6 7 D / 3 3 2 E、2 6 8 D / 3 3 2 D、2 6 8 E / 3 3 2 D、
 2 6 8 E / 3 3 2 E、2 6 8 D / 3 3 2 E、2 6 8 E / 3 3 0 Y、2 6 8 D / 3 3 0 Y、
 2 7 2 R / 3 3 2 E、2 7 2 H / 3 3 2 E、2 8 3 H / 3 3 2 E、2 8 4 E / 3 3 2 E、
 2 9 3 R / 3 3 2 E、2 9 5 E / 3 3 2 E、3 0 4 T / 3 3 2 E、3 2 4 I / 3 3 2 E、
 3 2 4 G / 3 3 2 E、3 2 4 I / 3 3 2 D、3 2 4 G / 3 3 2 D、3 2 7 D / 3 3 2 E、
 3 2 8 A / 3 3 2 E、3 2 8 T / 3 3 2 E、3 2 8 V / 3 3 2 E、3 2 8 I / 3 3 2 E、
 3 2 8 F / 3 3 2 E、3 2 8 Y / 3 3 2 E、3 2 8 M / 3 3 2 E、3 2 8 D / 3 3 2 E、
 3 2 8 E / 3 3 2 E、3 2 8 N / 3 3 2 E、3 2 8 Q / 3 3 2 E、3 2 8 A / 3 3 2 D、
 3 2 8 T / 3 3 2 D、3 2 8 V / 3 3 2 D、3 2 8 I / 3 3 2 D、3 2 8 F / 3 3 2 D、
 3 2 8 Y / 3 3 2 D、3 2 8 M / 3 3 2 D、3 2 8 D / 3 3 2 D、3 2 8 E / 3 3 2 D、
 3 2 8 N / 3 3 2 D、3 2 8 Q / 3 3 2 D、3 3 0 L / 3 3 2 E、3 3 0 Y / 3 3 2 E、
 3 3 0 I / 3 3 2 E、3 3 2 D / 3 3 0 Y、3 3 5 D / 3 3 2 E、2 3 9 D / 3 3 2 E、
 2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 Y、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 L、2 3 9 D / 3 3 2 E /
 3 3 0 I、2 3 9 D / 3 3 2 E / 2 6 8 E、2 3 9 D / 3 3 2 E / 2 6 8 D、2 3 9 D /
 3 3 2 E / 3 2 7 D、2 3 9 D / 3 3 2 E / 2 8 4 E、2 3 9 D / 2 6 8 E / 3 3 0 Y、
 2 3 9 D / 3 3 2 E / 2 6 8 E / 3 3 0 Y、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 2 7 A、2 3 9 D /
 3 3 2 E / 2 6 8 E / 3 2 7 A、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 Y / 3 2 7 A、3 3 2 E /
 3 3 0 Y / 2 6 8 E / 3 2 7 A、2 3 9 D / 3 3 2 E / 2 6 8 E / 3 3 0 Y / 3 2 7 A、
 挿入G > 2 9 7 - 2 9 8 / 3 3 2 E、挿入A > 2 9 7 - 2 9 8 / 3 3 2 E、挿入S > 2 9
 7 - 2 9 8 / 3 3 2 E、挿入D > 2 9 7 - 2 9 8 / 3 3 2 E、挿入G > 3 2 6 - 3 2 7 /
 3 3 2 E、挿入A > 3 2 6 - 3 2 7 / 3 3 2 E、挿入T > 3 2 6 - 3 2 7 / 3 3 2 E、挿
 入D > 3 2 6 - 3 2 7 / 3 3 2 E、挿入E > 3 2 6 - 3 2 7 / 3 3 2 E、挿入G > 2 3 5
 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入A > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入S > 2 3 5 - 2 3 6 / 3
 3 2 E、挿入T > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入N > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入

10

20

30

40

50

D > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入 V > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入 L > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 E、挿入 G > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 A > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 S > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 T > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 N > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 D > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D、挿入 V > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D および挿入 L > 2 3 5 - 2 3 6 / 3 3 2 D (ナンバリングは E U インデックスに従う) が挙げられ、使用のために企図される。例えば、2003 年 6 月 12 日に公開された米国特許出願公開第 2003/010854 号 (これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) には、変異体 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A が記載されている。実施形態では、記載されている改変は、個別にまたは組み合わせて含まれる。(ナンバリングは E U インデックスに従う)。

10

【0141】

リンカードメイン

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカードメインを含む。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、複数のリンカードメインを含む。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、ポリペプチドリinkerである。特定の態様では、ポリペプチドリinkerを用いて、Fc またはそのバリエーションもしくは断片を 1 つまたはそれを超えるヌクレアーゼドメインに融合し、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を形成することが望ましい。

【0142】

一実施形態では、ポリペプチドリinkerは、合成のものである。本明細書で使用される場合、ポリペプチドリinkerに関して「合成」という用語は、それが本来的には元々連結されていない配列 (これは、天然に存在するものでもよいし、または天然に存在するものではなくてもよい) (例えば、Fc 配列) に線状アミノ酸配列で連結されたアミノ酸配列 (これは、天然に存在するものでもよいし、または天然に存在するものではなくてもよい) を含むペプチド (またはポリペプチド) を含む。例えば、ポリペプチドリinkerは、天然に存在するポリペプチドの改変形態である (例えば、変異、例えば付加、置換または欠失を含む) か、または第 1 のアミノ酸配列 (これは、天然に存在するものでもよいし、または天然に存在するものではなくてもよい) を含む天然に存在しないポリペプチドを含み得る。本発明のポリペプチドリinkerは、例えば、機能的 Fc またはそのバリエーションもしくは断片の適切なフォールディングおよび形成を確実にするように Fc またはそのバリエーションもしくは断片を確実に並置させるために用いられ得る。好ましくは、本発明と適合するポリペプチドリinkerは、比較的非免疫原性であり、結合タンパク質の単量体サブユニット間におけるいかなる非共有結合的会合も阻害しないであろう。

20

30

【0143】

特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 41 に記載されている NLG リンカーを用いる。

【0144】

特定の実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ポリペプチドリinkerを用いて、単一ポリペプチド鎖における任意の 2 つまたはそれを超えるドメインをインフレームで接続する。一実施形態では、2 つまたはそれを超えるドメインは、本明細書で議論される Fc ドメインもしくはそのバリエーションもしくは断片またはヌクレアーゼドメインのいずれかから独立して選択され得る。例えば、特定の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、同一の Fc 断片を融合し、それによりホモ二量体 Fc 領域を形成するために使用され得る。他の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、異なる Fc 断片を融合し、それによりヘテロ二量体 Fc 領域を形成するために使用され得る。他の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、第 1 の Fc 断片の C 末端を第 2 の Fc 断片の N 末端に遺伝的に融合して、完全 Fc ドメインを形成するために使用され得る。

40

【0145】

一実施形態では、ポリペプチドリinkerは、Fc ドメインまたはそのバリエーションもしくは断片の一部を含む。例えば、一実施形態では、ポリペプチドリinkerは、Fc 断片 (例

50

えば、CドメインまたはNドメイン)またはFcドメインもしくはそのバリエーションの異なる部分を含み得る。

【0146】

別の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、gly-serリンカーを含むか、またはそれからなる。本明細書で使用される場合、「gly-serリンカー」という用語は、グリシンおよびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的なgly-serリンカーは、式 $(Gly_4Ser)_n$ (配列番号62) (式中、 n は正の整数(例えば、1、2、3、4または5)である)のアミノ酸配列を含む。好ましいgly-serリンカーは、 $(Gly_4Ser)_4$ (配列番号63)である。別の好ましいgly-serリンカーは、 $(Gly_4Ser)_3$ (配列番号30)である。別の好ましいgly-serリンカーは、 $(Gly_4Ser)_5$ (配列番号64)である。特定の実施形態では、gly-serリンカーは、ポリペプチドリンカーの2つの他の配列(例えば、本明細書に記載されるポリペプチドリンカー配列のいずれか)の間に挿入され得る。他の実施形態では、gly-serリンカーは、ポリペプチドリンカーの別の配列(例えば、本明細書に記載されるポリペプチドリンカー配列のいずれか)の一方または両方の末端に付着される。さらに他の実施形態では、2つまたはそれを超えるgly-serリンカーは、ポリペプチドリンカーに直列に組み込まれる。

【0147】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドリンカーは、生物学的に関連性のあるペプチド配列またはその配列部分を含む。例えば、生物学的に関連性のあるペプチド配列としては、限定されないが、拒絶反応抑制ペプチドまたは抗炎症ペプチドに由来する配列が挙げられ得る。前記拒絶反応抑制ペプチドまたは抗炎症ペプチドは、サイトカイン抑制ペプチド、細胞接着抑制ペプチド、トロンビン抑制ペプチドおよび血小板抑制ペプチドからなる群より選択され得る。好ましい実施形態では、ポリペプチドリンカーは、IL-1抑制性またはアンタゴニストペプチド配列、エリスロポエチン(EPO)模倣体ペプチド配列、トロンボポエチン(TPO)模倣体ペプチド配列、G-CSF模倣体ペプチド配列、TNFアンタゴニストペプチド配列、インテグリン結合性ペプチド配列、セレクチンアンタゴニストペプチド配列、抗病原体ペプチド配列、血管作動性腸管ペプチド(VIP)模倣体ペプチド配列、カルモジュリンアンタゴニストペプチド配列、マスト細胞アンタゴニスト、SH3アンタゴニストペプチド配列、ウロキナーゼ受容体(UKR)アンタゴニストペプチド配列、ソマトスタチンまたはコルチスタチン模倣体ペプチド配列、ならびにマクロファージおよび/またはT細胞抑制性ペプチド配列からなる群より選択されるペプチド配列を含む。例示的なペプチド配列(これらのいずれか1つは、ポリペプチドリンカーとして使用され得る)は、米国特許第6,660,843号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0148】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質において使用するために適切な他のリンカーは当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,525,491号に開示されているセリンリッチリンカー、Araiら、Protein Eng 2001;14:529-32に開示されているヘリックス形成ペプチドリンカー(例えば、 $A(EAAAK)_nA$ ($n=2\sim5$) (配列番号65))およびChenら、Mol Pharm 2011;8:457-65に開示されている安定リンカー、すなわち、ジペプチドリンカーLE、トロンビン感受性ジスルフィドシクロペプチドリンカーおよびヘリックス形成リンカーLEA(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄ALE (配列番号53)である。

【0149】

他の例示的なリンカーとしては、GSリンカー(すなわち、 $(GS)_n$ (配列番号66))、GGSG (配列番号70)リンカー(すなわち、 $(GGSG)_n$ (配列番号67))、GSATリンカー(配列番号44)、SEGリンカーおよびGGSLリンカー(すなわち、 $(GGSGGS)_n$ (配列番号68)) (式中、 n は正の整数(例えば、1、2、3、4または5)である)が挙げられる。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質において

使用するための他の適切なリンカーは、公的に利用可能なデータベース、例えばリンカーデータベース (`ibbi.vu.nl/programs/linkerdbwww`) を使用して見出され得る。リンカーデータベースは、新規融合タンパク質におけるリンカー候補となる多機能酵素のドメイン間リンカーのデータベースである (例えば、Georgeら、*Protein Engineering* 2002; 15: 871-9を参照のこと)。

【0150】

これらの例示的なポリペプチドリリンカーのバリエーション形態は、1つまたはそれを超えるアミノ酸置換、付加または欠失がポリペプチドリリンカーに導入されるように、ポリペプチドリリンカーをコードするヌクレオチド配列に1つまたはそれを超えるヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することによって作られ得ることが理解されよう。変異は、部位特異的変異誘発、およびPCRを介した変異誘発などの標準的な技術によって導入され得る。

【0151】

本開示のポリペプチドリリンカーは、少なくとも1アミノ酸長であり、様々な長さのものであり得る。一実施形態では、本発明のポリペプチドリリンカーは、約1～約50アミノ酸長である。この文脈で使用される場合、「約」という用語は、 ± 2 アミノ酸残基を示す。リンカーの長さは正の整数でなければならないので、約1アミノ酸から約50アミノ酸の長さとは、1アミノ酸から48～52アミノ酸の長さを意味する。別の実施形態では、本開示のポリペプチドリリンカーは、約10～20アミノ酸長である。別の実施形態では、本開示のポリペプチドリリンカーは、約15～約50アミノ酸長である。

【0152】

別の実施形態では、本開示のポリペプチドリリンカーは、約20～約45アミノ酸長である。別の実施形態では、本開示のポリペプチドリリンカーは、約15～約25アミノ酸長である。別の実施形態では、本開示のポリペプチドリリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60または61またはそれを超えるアミノ酸長である。

【0153】

ポリペプチドリリンカーは、当技術分野で公知の技術を使用して、ポリペプチド配列に導入され得る。改変は、DNA配列分析によって確認され得る。プラスミドDNAは、産生されるポリペプチドの安定産生のために宿主細胞を形質転換するために使用され得る。

【0154】

例示的な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質

本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質はモジュール式であり、様々な個別のドメインを組み込むように構成され得る。例えば、一実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、(配列番号21)に記載されている変異体ヒトDNase1 A114Fドメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号24に記載されている変異体ヒトDNase1 N18S/N106S/A114Fドメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号27に記載されているヒト野生型RNase1ドメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号28に記載されているヒト変異体RNase1 N34S/N76S/N88Sドメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号30に記載されている(Gly4Ser)3リンカードメインを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号41に記載されているNLGリンカーを含み得る。別の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、VK3LPリーダー(配列番号54)を含み得る。当業者であれば、これらの個別のドメインを任意の順序で互いに作動可能にカップリングして、酵素的に活性な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク

質を形成し得ると理解するであろう。例えば、以下の特定の実施例に詳述されているように、RNase1は、Fcドメインに作動可能にカップリングされ得る。別の例では、RNase1は、(Gly₄Ser)₃(配列番号30)リンカードメインを介してFcドメインに作動可能にカップリングされ得る。さらに別の例では、DNase1 A114Fは、Fcドメインに作動可能にカップリングされ得る。さらに別の例では、DNase1 A114Fは、(Gly₄Ser)₃(配列番号30)リンカードメインを介してFcドメインに作動可能にカップリングされ得る。本明細書、図1および配列表に開示される非限定的な例示的な構成を用いて、他の様々な構成が可能である。

【0155】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、SCCヒンジとCH₂変異P238SおよびP331Sとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた野生型ヒトRNase1ドメインと、ヒトRNase1に作動可能にカップリングされた変異ヒトDNase1ドメインとを含み、それにより、タンデムホモ二量体を形成する。いくつかの実施形態では、DNase1は、ペプチドリinker、例えば本明細書に開示されるNLGリンカーを介してRNase1に連結されている。いくつかの実施形態では、RNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにFcドメインのN末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、RNase1は、リンカーによってまたはリンカーによらずにFcドメインのC末端に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号2に記載されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ホモ二量体またはヘテロ二量体である。

【0156】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH₂変異P238S、P331Sと、CH₃変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vとを有する第1の変異体Fcドメインまたはそのバリエーションもしくは断片に作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH₂変異P238SおよびP331Sと、CH₃変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む第2の変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた野生型ヒトRNase1ドメインとを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1およびRNase1は両方とも、それらの各FcドメインのN末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号3に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号4に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

【0157】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH₂変異P238SおよびP331Sと、CH₃変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む第1の変異体Fcドメインまたはその断片と、変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wを有する第2の変異体Fcドメインまたはその断片とに両方が作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインおよび野生型ヒトRNase1ドメインを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1およびRNase1は、第1のおよび第2のFcドメインのそれぞれN末端およびC末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号5に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号6に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

【0158】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238SおよびP331Sと、CH3変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた野生型ヒトRNase1ドメインとを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1は、FcドメインのN末端に連結されており、RNase1は、FcドメインのC末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号7に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

10

【0159】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238SおよびP331Sと、CH3変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた野生型ヒトRNase1ドメインとを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1およびRNase1は両方とも、それらの各FcドメインのC末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号9に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号10に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号11に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号12に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

20

【0160】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vとを含む変異体Fcドメインまたはその断片と、SCCヒンジと、CH2変異P238SおよびP331Sと、CH3変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む変異体Fcドメインまたはその断片とに両方が作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインおよび野生型ヒトRNase1ドメインを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1およびRNase1は、FcドメインのそれぞれC末端およびN末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号13に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号14に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

30

40

【0161】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異T350V、L351Y、F405AおよびY407Vとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた変異体ヒトDNase1ドメインと、リンカーによってまたはリンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238SおよびP331Sと、CH3変異T350V、T366L、K392LおよびT394Wとを含む変異体Fcドメインまたはその断片に作動可能にカップリングされた野生型ヒトRNase1ドメインとを含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、DNase1は、FcドメインのC末端に連結されており、RNase1は、FcドメインのN

50

末端に連結されている。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 15 に記載されている配列を含むポリペプチドと、配列番号 16 に記載されているアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含むヘテロ二量体である。

【0162】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、配列番号 1 ~ 17 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一、例えば 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または少なくとも 99.5 % 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載されているアミノ酸配列を含む。

10

【0163】

いくつかの実施形態では、上記最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、リーダー配列を有する。

【0164】

当業者であれば、リーダーおよびリンカー配列は任意選択のものであり、上記実施形態に記載されているものに限定されないことを理解するであろう。例えば、RNase および/または DNase ドメインは、Fc またはそのバリエーションもしくは断片の N 末端および/または C 末端に直接融合され得る；リーダードメインは、その意図される目的のために、例えば、タンパク質の発現および/または分泌を増加させるために有用であることが当技術分野で公知のものいずれであり得る（例えば、Gaussial シフェラーゼシグナルペプチド (MGVKVLFALICIAVAEA；配列番号 31)）；リンカーは、当技術分野で公知の任意のリンカー、例えば本明細書に記載される (Gly₄Ser)_n (配列番号 58)、NLG (VDGASSSPVNVSSPSVQDI；配列番号 41)、LE、トロンピン感受性ジスルフィドシクロペプチドリリンカー、LEA (EAAAK)₄ ALA (EAAAK)₄ (配列番号 32) またはインビトロで切断可能なジスルフィドリリンカーであり得る。ルーチンなクローニングおよび組換え方法を使用して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸配列に対して、対応する変更を行うことは当業者の能力の範囲内であることも理解されよう。アミノ酸が N 結合型グリコシル化のアクセプターとして機能しない限り、ヌクレアーゼドメインにおけるアスパラギン残基（すなわち、RNase 1 における N34、N76 および N88、ならびに DNase 1 における N18 および N106）をセリン以外のアミノ酸（例えば、グルタミン）で置換し得ることもまた理解されよう。

20

30

【0165】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を作製する方法

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、組換え DNA 技術を使用して、形質転換またはトランスフェクト宿主細胞において主に作製され得る。そうするために、ペプチドをコードする組換え DNA 分子が調製される。このような DNA 分子を調製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、ペプチドをコードする配列は、適切な制限酵素を使用して DNA から切断され得る。あるいは、DNA 分子は、ホスホルアミデート法などの化学合成技術を使用して合成され得る。また、これらの技術の組み合わせが使用され得る。

40

【0166】

本発明はまた、適切な宿主においてペプチドを発現することができるベクターを含む。ベクターは、発現制御配列に作動可能にカップリングされたペプチドをコードする DNA 分子を含む。DNA 分子をベクターに挿入する前または後のいずれかに、この作動可能な連結に影響を与える方法は周知である。発現制御配列としては、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソームヌクレアーゼドメイン、開始シグナル、終止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル、および転写または翻訳の制御に関与する他のシグナルが挙げられる。

【0167】

50

その上にDNA分子を有する得られたベクターは、適切な宿主を形質転換またはトランスフェクトするために使用される。この形質転換またはトランスフェクションは、当技術分野で周知の方法を使用して行われ得る。

【0168】

多くの利用可能な周知の宿主細胞はいずれも、本発明の実施において使用され得る。特定の宿主の選択は、当技術分野で認められているいくつかの要因に依存する。これらとしては、例えば、選択した発現ベクターとの適合性、DNA分子によってコードされるペプチドの毒性、形質転換またはトランスフェクションの比率、ペプチドの回収の容易さ、発現特性、生物学的安全性および費用が挙げられる。すべての宿主が特定のDNA配列の発現に関して同等に有効であるとは限らないことを理解して、これらの要因のバランスをとらなければならない。これらの一般的なガイドラインでは、有用な微生物宿主としては、培養下にある細菌（大腸菌など）、酵母（サッカロミセスなど）および他の真菌、昆虫、植物、哺乳動物（ヒトを含む）の細胞、または当技術分野で公知である他の宿主が挙げられる。好ましい実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、CHO細胞において産生される。

10

【0169】

次に、形質転換またはトランスフェクト宿主を培養および精製する。宿主細胞は、所望の化合物が発現されるように、従来の発酵または培養条件下で培養され得る。このような発酵および培養条件は、当技術分野で周知である。最後に、ペプチドは、当技術分野で周知の方法によって、培養物から精製される。

20

【0170】

化合物はまた、合成方法によって作製され得る。例えば、固相合成技術が使用され得る。適切な技術は当技術分野で周知であり、*Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davisら、Biochem Intl 1985; 10:394-414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; 米国特許第3,941,763号; Finnら、(1976), The Proteins (3rd ed.) 2:105-253; および Ericksonら、(1976), The Proteins (3rd ed.) 2:257-527に記載されているものが挙げられる。固相合成は、小型ペプチドを作製するために最も費用対効果の高い方法であるので、個別のペプチドを作製するために好ましい技術である。誘導体化ペプチドを含有するか、または非ペプチド基を含有する化合物は、周知の有機化学技術によって合成され得る。*

30

【0171】

分子発現/合成のための他の方法は、当業者に一般に公知である。

【0172】

変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質

グリコシル化（例えば、O結合型またはN結合型グリコシル化）は、例えば、マンノースおよびアシアロ糖タンパク質受容体および他のレクチン様受容体による循環からのそれらの除去を最小化することによって、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期に影響を及ぼし得る。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（the optimized binuclease fusion protein）は、アグリコシル化、脱グリコシル化または低グリコシル化形態で調製される。好ましくは、N結合型グリコシル化が変化され、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質がアグリコシル化される。

40

【0173】

いくつかの実施形態では、Asn-X-Ser/Thr（Xは、Pro以外の任意の他の天然に存在するアミノ酸であり得る）コンセンサスに適合する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質におけるすべてのアスパラギン残基は、N結合型グリコシル化のアクセプ

50

ターとして機能しない残基（例えば、セリン、グルタミン）に変異され、それにより、タンパク質をグリコシル化する細胞において合成される場合、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化が排除される。

【0174】

いくつかの実施形態では、N結合型グリコシル化部位を欠く最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、哺乳動物細胞において産生される。一実施形態では、哺乳動物細胞は、CHO細胞である。したがって、特定の実施形態では、アグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、CHO細胞において産生される。

【0175】

他の実施形態では、N-グリコシル化の減少または欠如は、例えば、宿主（例えば、大腸菌などの細菌）、グリコシル化に重要な1つまたはそれを超える酵素を欠くように操作された哺乳動物細胞、またはグリコシル化を防止する薬剤、例えばツニカマイシン（Dol-P-P-GlcNAc形成の阻害剤）で処理された哺乳動物細胞において最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を産生することによって達成される。

【0176】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、高マンノース型糖ではなく複雑なN-グリカンを含む糖タンパク質を産生するように操作された下等真核生物において産生される（例えば、米国特許出願公開第2007/0105127号を参照のこと）。

【0177】

いくつかの実施形態では、1つまたはそれを超える炭水化物残基（例えば、1つまたはそれを超えるマンノース、フコースおよび/またはN-アセチルグルコサミン残基）を除去するために、または1つまたはそれを超える炭水化物残基を改変もしくは遮蔽するために、グリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（例えば、CHO細胞などの哺乳動物細胞において産生されたもの）は、化学的または酵素的に処理される。このような改変または遮蔽は、マンノース受容体および/またはアシアロ糖タンパク質受容体および/または他のレクチン様受容体に対する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の結合を減少させ得る。化学的脱グリコシル化は、例えば、Sojara、JBC 1989; 264: 2552-9およびSojara、Methods Enzymol 1987; 138: 341-50に開示されているように、トリフルオロメタンスルホン酸（TFMS）で最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を処理することによって、またはSojara、（1987、前掲）に開示されているように、フッ化水素で処理することによって達成され得る。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質からのN結合型炭水化物の酵素的除去は、例えば、Hotakura、（Methods Enzymol 1987; 138: 350-9）に開示されているように、タンパク質N-グリコシダーゼ（PNGase）AまたはFで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を処理することによって達成され得る。他の当技術分野で認められている市販の脱グリコシル化酵素であって、使用に適切な脱グリコシル化酵素としては、エンド- - N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ、エンドグリコシダーゼF1、エンドグリコシダーゼF2、エンドグリコシダーゼF3およびエンドグリコシダーゼHが挙げられる。いくつかの実施形態では、これらの酵素の1つまたはそれよりも多くは、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を脱グリコシル化するために使用され得る。脱グリコシル化のための代替方法は、例えば、米国特許第8,198,063号に開示されている。

【0178】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、部分的に脱グリコシル化されている。部分的な脱グリコシル化は、エンドグリコシダーゼ（例えば、エンドグリコシダーゼH）（これは、N結合型高マンノース炭水化物を切断するが、複合型炭水化物を切断しないので、アスパラギンに連結された単一GlcNAc残基が残る）で最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を処理することによって達成され得る。エンドグリコシダーゼHで処理された最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、高マンノース炭水

10

20

30

40

50

化物を欠き、その結果、肝臓マンノース受容体との相互作用が減少するであろう。この受容体は末端 GlcNAc を認識するが、タンパク質表面上の単一 GlcNAc との生産的相互作用の可能性は、インタクトな高マンノース構造の場合ほど大きくない。

【0179】

他の実施形態では、血液からの最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のクリアランスを減少させるために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化は、例えば、酸化、還元、脱水、置換、エステル化、アルキル化、シアリル化、炭素 - 炭素結合切断などによって改変される。いくつかの実施形態では、炭水化物構造を改変するために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、過ヨウ素酸塩および水素化ホウ素ナトリウムで処理される。過ヨウ素酸塩処理は、隣接ジオールを酸化し、炭素 - 炭素結合を切断し、アルデヒド基でヒドロキシル基を置き換える；水素化ホウ素は、アルデヒドをヒドロキシルに還元する。多くの糖残基は、ピシナルジオールを含むので、この処理によって切断される。過ヨウ素酸塩および水素化ホウ素ナトリウムによる血清半減期の延長は、これらの薬剤によるリソソーム酵素 - グルクロニダーゼの連続処理によって例示される（例えば、Houbara, (1996) Bioconjug Chem 1996: 7: 606 - 11; Stahlら、PNAS 1976; 73: 4045 - 9; Achordら、Pediatr. Res 1977; 11: 816 - 22; Achordら、Cell 1978; 15: 269 - 78 を参照のこと）。過ヨウ素酸塩および水素化ホウ素ナトリウムによる処理のための方法は、Hickmanら、BBRC 1974; 57: 55 - 61 に開示されている。リシンの血清半減期および組織分布を増加させる過ヨウ素酸塩およびシアノ水素化ホウ素による処理のための方法は、Thorpeら、Eur J Biochem 1985; 147: 197 - 206 に開示されている。

【0180】

一実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の炭水化物構造は、マンノース、アシアロ糖タンパク質受容体または他のレクチン様受容体による構造の認識を妨害する1つまたはそれを超えるさらなる部分（例えば、炭水化物基、リン酸基、アルキル基など）の追加によって遮蔽され得る。

【0181】

いくつかの実施形態では、1つまたはそれを超える潜在的グリコシル化部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする核酸の変異によって除去され、それにより、タンパク質をグリコシル化する細胞、例えば哺乳動物細胞、例えばCHO細胞において合成される場合に、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化（低グリコシル化）を減少させる。いくつかの実施形態では、例えば、低グリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が増加した活性を示すか、または血清半減期の増加に寄与する場合には、その中の潜在的N結合型グリコシル化部位を変異させることによって、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼドメインを選択的に低グリコシル化することが望ましい場合がある。他の実施形態では、例えば、このような改変が最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期を向上させる場合には、ヌクレアーゼドメイン以外の領域がN - グリコシル化を欠くように、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の一部を低グリコシル化することが望ましい場合がある。あるいは、グリコシル化アクセプターの近傍の他のアミノ酸を改変して、正常にグリコシル化されるアミノ酸を必ずしも変更せずにグリコシル化酵素の認識モチーフを破壊し得る。

【0182】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化は、グリコシル化部位を導入することによって変化され得る。例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸配列は、Asp - X - Ser / Thr（Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）のN結合型グリコシル化のコンセンサス配列を導入するように改変され得る。さらなるN結合型グリコシル化部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸配列における任意の場所に追加され得る。好ましくは、グリコシル化部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ（例えば、RNaseおよび

び／またはDNase)活性を実質的に減少させないアミノ酸配列における位置において導入される。

【0183】

O結合型グリコシル化部位の追加は、タンパク質、例えば成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン、IGFBP-6、第IX因子および多くの他のものの血清半減期を変化させることが報告されている(例えば、Okadaら、Endocr Rev 2011;32:2-342;Weenenら、J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5204-12;Marinaraら、European Journal of Endocrinology 2000;142:512-6;米国特許出願公開第2011/0154516号に開示されているように)。したがって、いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の(セリン/トレオニン残基上の)O結合型グリコシル化は変化される。O結合型グリコシル化を変化させるための方法は当技術分野でルーチンであり、例えば、脱離によって(例えば、Huangら、Rapid Communications in Mass Spectrometry 2002;16:1199-204;Conrad, Curr Protoc Mol Biol 2001;Chapter 17:Unit 17.15A;Fukuda, Curr Protoc Mol Biol 2001;Chapter 17:Unit 17.15B;Zacharaら、Curr Protoc Mol Biol 2011;Unit 17.6;を参照のこと);市販のキット(例えば、GlycoProfile(商標)Beta-Elimination Kit, Sigma)を使用することによって;または最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を、Gal 1-3GalNAcおよび/または GlcNAc 1-3GalNAcのみが残るまで、一連のエキソグリコシダーゼ、例えば限定されないが、1-4ガラクトシダーゼおよび-N-アセチルグルコサミニダーゼによる処理に供し、続いて、例えばエンド-N-アセチルガラクトサミニダーゼ(すなわち、O-グリコシダーゼ)による処理に供することによって達成され得る。このような酵素は、例えばNew England Biolabsから市販されている。さらに他の実施形態では、例えばOkadaら、(前掲)、Weenenら、(前掲)、米国特許出願公開第2008/0274958号;および米国特許出願公開第2011/0171218号に開示されているように、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質においてO結合型グリコシル化を導入するように変化される。いくつかの実施形態では、CXXGGT/S-C(配列番号33)(van den Steenら、In Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, Michael Cox, ed., 1998;33:151-208)、NST-E/D-A(配列番号34)、NITQS(配列番号35)、QSTQS(配列番号36)、D/E-FT-R/K-V(配列番号37)、C-E/D-SN(配列番号38)およびGGSC-K/R(配列番号39)などの1つまたはそれを超えるO結合型グリコシル化コンセンサス部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質に導入される。さらなるO結合型グリコシル化部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の任意の場所に追加され得る。好ましくは、グリコシル化部位は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ(例えば、RNaseおよび/またはDNase)活性を実質的に減少させないアミノ酸配列における位置において導入される。あるいは、例えば国際公開第87/05330号およびApplinら、CRC Crit Rev Biochem 1981;259-306)に記載されているように、O結合型糖部分は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸を化学的に改変することによって導入される。

【0184】

いくつかの実施形態では、N結合型およびO結合型グリコシル化部位は両方とも、好ましくは最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ(例えば、RNaseおよび/またはDNase)活性を実質的に減少させないアミノ酸配列における位置において導入される。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 5 】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質においてグリコシル化（例えば、N結合型またはO結合型グリコシル化）を導入、減少または排除し、グリコシル化状態のこのような改変が最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ活性または血清半減期を増加または減少させるかを、当技術分野におけるルーチンな方法を使用して決定することは十分に当業者の能力の範囲内である。

【 0 1 8 6 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、変化した糖型（例えば、非フコシル化グリカンまたはフコースを含まないグリカン）を含み得る。

【 0 1 8 7 】

いくつかの実施形態では、変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、対応するグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（例えば、潜在的なN結合型グリコシル化部位が変異されていない最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質）と比べて少なくとも約1.5倍、例えば少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍または1000倍またはそれを超えて増加した血清半減期を有する。当技術分野で認められているルーチンな方法は、変化したグリコシル化状態を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の血清半減期を決定するために使用され得る。

【 0 1 8 8 】

いくつかの実施形態では、変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（例えば、アグリコシル化、脱グリコシル化または低グリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質）は、対応するグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（例えば、潜在的なN結合型グリコシル化部位が変異されていない最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質）の活性の少なくとも50%、例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%または100%を保持する。

【 0 1 8 9 】

いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化状態の変化は、酵素活性を直接増加させることによって、またはバイオアベイラビリティ（例えば、血清半減期）を増加させることによって、ヌクレアーゼ活性を増加させ得る。したがって、いくつかの実施形態では、変化したグリコシル化を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ活性は、対応するグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（例えば、潜在的なN結合型グリコシル化部位が変異されていない最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質）と比べて少なくとも1.3倍、例えば少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも4.5倍、少なくとも5倍、少なくとも5.5倍、少なくとも6倍、少なくとも6.5倍、少なくとも7倍、少なくとも7.5倍、少なくとも8倍、少なくとも8.5倍、少なくとも9倍、少なくとも9.5倍または10倍またはそれを超えて増加している。

【 0 1 9 0 】

当業者であれば、当技術分野で認められている方法を使用して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化状態を容易に決定し得る。好ましい実施形態では、グリコシル化状態は、質量分析を使用して決定される。他の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が低グリコシル化されているかを決定するために、コンカナバリンA（ConA）との相互作用が評価され得る。低グリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融

10

20

30

40

50

合タンパク質は、対応するグリコシル化最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質と比較した場合、ConA - セファロースに対する減少した結合を示すと予想される。低グリコシル化タンパク質および対応するグリコシル化タンパク質の移動度を比較するために、SDS - PAGE 分析も使用され得る。低グリコシル化タンパク質は、SDS - PAGE では、グリコシル化タンパク質と比較して大きな移動度を有すると予想される。タンパク質グリコシル化状態を分析するための他の適切な当技術分野で認められている方法は、例えば、Rothら、International Journal of Carbohydrate Chemistry 2012 ; 1 - 10 に開示されている。

【0191】

異なるグリコシル化状態を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の薬物動態、例えば血清半減期は、ルーチンな方法を使用して、例えば、マウスにおいて最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を例えば静脈内に導入し、所定の時点において血液サンプルを採取し、サンプル中の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のレベルおよび/または酵素活性をアッセイおよび比較することによってアッセイされ得る。

【0192】

医薬組成物

特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、単独で投与される。特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの他の治療剤の投与前に投与される。特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの他の治療剤の投与と同時に投与される。特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの他の治療剤の投与後に投与される。他の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つの他の治療剤の投与前に投与される。当業者によって認識されるように、いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、他の薬剤/化合物と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および他の薬剤は、同時に投与される。いくつかの実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および他の薬剤は同時に投与されず、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、薬剤の投与前または投与後に投与される。いくつかの実施形態では、被験体は、同じ予防期間、障害発生および/または処置期間の間に、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および他の薬剤の両方を受ける。

【0193】

本発明の医薬組成物は、併用療法で、すなわち、他の薬剤と組み合わせて投与され得る。特定の実施形態では、併用療法は、少なくとも1つの他の薬剤と組み合わせて、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む。薬剤としては、限定されないが、インビトロで合成的に調製された化学組成物、抗体、抗原結合領域ならびにそれらの組み合わせおよびコンジュゲートが挙げられる。特定の実施形態では、薬剤は、アゴニスト、アンタゴニスト、アロステリックモジュレーターまたは毒素として作用し得る。

【0194】

特定の実施形態では、本発明は、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤および/またはアジュバントと一緒に、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0195】

特定の実施形態では、本発明は、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤および/またはアジュバントと一緒に、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質と、治療有効量の少なくとも1つのさらなる治療剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0196】

特定の実施形態では、許容され得る製剤化材料は、好ましくは、用いられる投与量および濃度でレシipientに対して非毒性である。いくつかの実施形態では、製剤化材料は、皮下および/または静脈内投与のためのものである。特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば組成物のpH、浸透圧、粘度、清澄度、色調、等張性、香り、滅菌性、安定性、

10

20

30

40

50

溶解もしくは放出の速度、吸着性または浸透性を改変、維持または保存するための製剤化材料を含有し得る。特定の実施形態では、適切な製剤化材料としては、限定されないが、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなど）；抗菌薬；抗酸化物質（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウムなど）；緩衝剤（ホウ酸塩、炭酸水素塩、トリス - HCl、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸など）；増量剤（マンニトールまたはグリシンなど）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル - β -シクロデキストリンなど）；フィラー；単糖類；二糖類；および他の糖質（グルコース、マンノースまたはデキストリンなど）；タンパク質（ゼラチンなど）；着色・香味・希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成性対イオン（ナトリウムなど）；保存剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート類、例えばポリソルベート20、ポリソルベート80など、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポールなど）；安定性強化剤（スクロースまたはソルビトールなど）；張性増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトールなど）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤、ならびに／または薬学的アジュバントが挙げられる。（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)）。いくつかの実施形態では、製剤は、PBS；20mM NaOAc、pH 5.2、50mM NaCl；および／または10mM NaOAc、pH 5.2、9%スクロースを含む。

【0197】

特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および／または治療用分子は、当技術分野で公知の半減期延長ビヒクルに連結される。このようなビヒクルとしては、限定されないが、ポリエチレングリコール、グリコーゲン（例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のグリコシル化）およびデキストランが挙げられる。このようなビヒクルは、例えば、米国特許出願第09/428,082号、現在は米国特許第6,660,843号および公開されている国際公開第99/25044号に記載されている。

【0198】

特定の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、目的の投与経路、送達方式および所望の投与量に応じて、当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、前掲を参照のこと。特定の実施形態では、このような組成物は、本発明の抗体の物理的状態、安定性、インビボ放出速度およびインビボ排出速度に影響を及ぼし得る。

【0199】

特定の実施形態では、医薬組成物における主要なビヒクルまたは担体は、性質が水性または非水性のいずれであり得る。例えば、特定の実施形態では、適切なビヒクルまたは担体は、非経口投与のための組成物において一般的な他の材料が場合により補充された注射用水、生理的食塩液または人工脳脊髄液であり得る。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、等張リン酸緩衝生理食塩水を含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、約pH 7.0～8.5のトリス緩衝液、または約pH 4.0～5.5の酢酸緩衝液（これは、ソルビトールまたはその適切な代替物をさらに含み得る）を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む組成物は、貯蔵のために、所望の純度を有する選択組成物と、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態の任意選択の製剤化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences、前掲）とを混合することによ

10

20

30

40

50

って調製され得る。さらに、特定の実施形態では、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む組成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を使用して、凍結乾燥物として製剤化され得る。

【0200】

特定の実施形態では、医薬組成物は、非経口送達のために選択され得る。特定の実施形態では、組成物は、吸入のために、または消化管を介した送達（例えば、経口）のために選択され得る。このような薬学的に許容され得る組成物の調製は、当業者の能力の範囲内である。

【0201】

特定の実施形態では、製剤成分は、投与部位にとって許容され得る濃度で存在する。特定の実施形態では、生理的pHで、またはわずかに低いpHで、典型的には約5～約8のpH範囲内で組成物を維持するために、緩衝剤が使用される。

【0202】

特定の実施形態では、非経口投与が企図される場合、治療用組成物は、薬学的に許容され得るビヒクル中に、さらなる治療剤と共にまたはさらなる治療剤なしで所望の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む非経口に許容され得るパイロジェンフリー水溶液の形態であり得る。特定の実施形態では、非経口注射のためのビヒクルは、さらなる治療剤と共にまたはさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が、適切に保存された滅菌性等張液として製剤化された滅菌蒸留水である。特定の実施形態では、調製は、生成物の制御放出または持続放出を提供し得る薬剤、例えば注射用マイクロスフェア、生体内分解性粒子、高分子化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームと共に、所望の分子を製剤化することを伴い得、次いで、これは、デポー注射を介して送達され得る。特定の実施形態では、ヒアルロン酸も使用され得、循環中で持続期間を促進する効果を有し得る。特定の実施形態では、所望の分子を導入するために、埋め込み型薬物送達デバイスが使用され得る。

【0203】

特定の実施形態では、医薬組成物は、吸入のために製剤化され得る。特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで、吸入のための乾燥粉末として製剤化され得る。特定の実施形態では、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む吸入用溶液は、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に製剤化され得る。特定の実施形態では、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、国際特許出願第PCT/US94/001875号（これには、化学改変タンパク質の肺送達が記載されている）にさらに記載されている。

【0204】

特定の実施形態では、製剤が経口投与され得ることが企図される。特定の実施形態では、この様式で投与される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで、錠剤およびカプセル剤などの固体剤形の調合に通常使用される担体と共にまたは前記担体なしで製剤化され得る。特定の実施形態では、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、全身前分解が最小化される際に、消化管内で製剤の活性部分を放出するように設計され得る。特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および/または任意のさらなる治療剤の吸収を促進するために、少なくとも1つのさらなる薬剤が含まれ得る。特定の実施形態では、希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤も用いられ得る。

【0205】

特定の実施形態では、医薬組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで、有効量の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を伴い得る。特定の実施形態では、錠

10

20

30

40

50

剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液は、単位用量形態として調製され得る。特定の実施形態では、適切な賦形剤としては、限定されないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、もしくはリン酸カルシウムなどの不活性希釈剤；またはデンプン、ゼラチンもしくはアラビアゴムなどの結合剤；またはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸もしくはタルクなどの滑剤が挙げられる。

【0206】

持続送達製剤または制御送達製剤中に、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む製剤を含むさらなる医薬組成物は、当業者に明らかであろう。特定の実施形態では、様々な他の持続送達手段または制御送達手段、例えばリポソーム担体、生体内分解性微粒子または多孔性ビーズおよびデポー注射を製剤化するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、医薬組成物の送達のための多孔性高分子微粒子の制御放出が記載されている国際特許出願第PCT/US93/00829号を参照のこと。特定の実施形態では、持続放出調製物は、例えば、成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態の半透過性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許出願公開第058,481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとの共ポリマー（Sidmanら、Biopolymers, 22:547-556（1983））、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（Langerら、J Biomed Mater Res, 15:167-277（1981）およびLanger, Chem Tech, 12:98-105（1982））、エチレン酢酸ビニル（Langerら、前掲）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第133,988号）を含み得る。特定の実施形態では、持続放出組成物はまた、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得るリポソームを含み得る。例えば、Eppsteinら、PNAS, 82:3688-3692（1985）；欧州特許出願公開第036,676号；欧州特許出願公開第088,046号および欧州特許出願公開第143,949号を参照のこと。

【0207】

インビボ投与に使用すべき医薬組成物は、典型的には滅菌性である。特定の実施形態では、これは、滅菌ろ過膜によるろ過によって達成され得る。特定の実施形態では、組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用した滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行われ得る。特定の実施形態では、非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態で、または溶液で保存され得る。特定の実施形態では、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射用針によって貫通可能なストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルに入れられる。

【0208】

特定の実施形態では、医薬組成物が製剤化されたら、それは、適切な滅菌バイアル中に、溶液、懸濁液、ゲル、乳濁液、固形物として、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として貯蔵され得る。特定の実施形態では、このような製剤は、即時使用形態で、または投与前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで貯蔵され得る。

【0209】

特定の実施形態では、単回用量投与単位を生産するためのキットが提供される。特定の実施形態では、キットは、乾燥タンパク質を有する第1の容器、および水性製剤を有する第2の容器の両方を含有し得る。特定の実施形態では、単一および複数チャンバー型プレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ）を含有するキットが含まれる。

【0210】

特定の実施形態では、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで、治療的に用いるべき最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含

10

20

30

40

50

む医薬組成物の有効量は、例えば、治療状況および目的に依存するであろう。当業者であれば、したがって、処置のための適切な投与量レベルは、特定の実施形態によれば、部分的には、分子が送達される際に、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質が使用される適応症、投与経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表面積または器官サイズ）および/または状態（年齢および全般的健康状態）に応じて変動することを認識するであろう。特定の実施形態では、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投与量を設定し、投与経路を改変し得る。特定の実施形態では、典型的な投与量は、上述の要因に応じて、約 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 最大約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲またはそれを超えるものであり得る。特定の実施形態では、投与量は、 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 最大約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$; または $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 最大約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$; または $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ 最大約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲であり得る。

10

【0211】

特定の実施形態では、投与頻度は、使用される製剤中の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および/または任意のさらなる治療剤の薬物動態パラメータを考慮するであろう。特定の実施形態では、臨床医は、所望の効果を達成する投与量に達するまで、組成物を投与するであろう。特定の実施形態では、したがって、組成物は、単回投与として、または経時的な2回もしくはそれを超える投与（これは、同じ量の所望の分子を含有していてもよいし、または含有していなくてもよい）として、または埋め込みデバイスもしくはカテーテルを介した連続注入として投与され得る。適切な投与量のさらなる微修正は、当業者によってルーチンに行われ、当業者によってルーチンに実施される作業の範囲内である。特定の実施形態では、適切な投与量は、適切な用量反応データを使用することによって確定され得る。

20

【0212】

特定の実施形態では、医薬組成物の投与経路は、公知の方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、皮下、眼内、動脈内、門脈内もしくは病巣内経路による注射を介して経口による；持続放出システムによる、または埋め込みデバイスによるものである。特定の実施形態では、組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または埋め込みデバイスによって投与され得る。

【0213】

特定の実施形態では、組成物は、所望の分子が吸着または封入された膜、スポンジまたは別の適切な材料の埋め込みを介して局所投与され得る。特定の実施形態では、埋め込みデバイスが使用される場合、デバイスは、任意の適切な組織または器官に埋め込まれ得、所望の分子の送達は、拡散、持続放出ボーラスまたは連続的投与によるものであり得る。

30

【0214】

特定の実施形態では、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む医薬組成物をエキスビボ様式で使うことが望ましい場合がある。このような場合では、患者から取り出され細胞、組織および/または器官は、少なくとも1つのさらなる治療剤と共にまたは少なくとも1つのさらなる治療剤なしで最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を含む医薬組成物に曝露され、その後続いて、細胞、組織および/または器官が患者の体内に再び埋め込まれる。

40

【0215】

特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質および/または任意のさらなる治療剤は、本明細書に記載されている方法などの方法を使用して、ポリペプチドを発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を埋め込むことによって送達され得る。特定の実施形態では、このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、自己、異種またはゼノジェニックであり得る。特定の実施形態では、細胞は、不死化され得る。特定の実施形態では、免疫学的応答の機会を減少させるために、細胞を封入して周囲組織の浸潤を回避し得る。特定の実施形態では、封入材料は、典型的には、タンパク質産物

50

の放出を可能にするが、患者の免疫系による、または周囲組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防止する生体適合性半透性ポリマー封入物または膜である。

【0216】

インビトロアッセイ

本発明の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有効性を評価するために、当技術分野で公知の様々なインビトロアッセイが使用され得る。

【0217】

例えば、正常またはループス患者PBM C由来の培養ヒトPBM Cを単離し、培養し、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の存在下または非存在下、様々な刺激（例えば、TLRリガンド、共刺激抗体、免疫複合体および正常血清または自己免疫血清）で処理する。刺激細胞によるサイトカイン産生は、様々なサイトカイン（例えば、IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、IFN- γ およびTNF- α ）のための市販の試薬、例えばBiolegend (San Diego, CA)製の抗体ペアキットを使用して測定され得る。アッセイのために必要に応じて様々な時点（例えば、24時間、48時間またはそれよりも後の時点）において培養上清を回収して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質がサイトカイン産生に及ぼす効果を決定する。IFN- γ 産生は、例えば、PBL Interferon source (Piscataway, NJ)から入手可能な抗ヒトIFN- γ 抗体および標準曲線試薬を使用して測定される。同様のアッセイは、Miltenyi Biotec (Auburn, CA)から入手可能な市販の磁気ビーズベースの単離キットを使用して精製されたヒトリンパ球亜集団（単離された単球、B細胞、pDC、T細胞など）を使用して実施される。

【0218】

当技術分野で認められているルーチンな方法を使用して、刺激後の様々な時点において、PBM Cまたは単離された細胞亜集団におけるリンパ球活性化受容体、例えばCD5、CD23、CD69、CD80、CD86およびCD25の発現を測定することによって、免疫細胞活性化に対する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の効果を評価するために、マルチカラーフローサイトメトリーが使用され得る。

【0219】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有効性はまた、例えば、Ahlinら、Lupus 2012: 21: 586-95; Mathssonら、Clin Expt Immunol 2007: 147: 513-20; およびChiangら、J Immunol 2011: 186: 1279-1288に記載されているように、SLE患者血清を正常ヒトpDCと共にインキュベートして、IFN α アウトプットを活性化することによって試験され得る。理論に縛られるものではないが、SLE患者血清中の循環核酸含有免疫複合体は、Fc受容体媒介性エンドサイトーシスを介したpDCエンドソームへの核酸抗原侵入、続いて、エンドソームTLR7、8および9に対する核酸の結合およびそれらの活性化を促進する。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の影響を評価するために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質でSLE患者血清または血漿を前処理し、続いて、健常志願者から単離されたpDC細胞の培養物に追加する。次いで、複数の時点において、産生されたIFN- γ のレベルを決定する。免疫複合体を含有する核酸を分解することによって、有効な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、産生されるIFN- γ の量を減少させると予想される。

【0220】

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有効性は、本明細書に開示される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質で処理された細胞からのアッセイの結果と、対照製剤で処理された細胞からのアッセイの結果とを比較することによって実証される。処理後、上記様々なマーカー（例えば、サイトカイン、細胞表面受容体、増殖）のレベルは、一般に、有効な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質処理群では、処理前に存在するマーカーレベルと比べて、または対照群において測定されたレベルと比べて改善される。

【0221】

10

20

30

40

50

処置の方法

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、自己免疫障害または異常免疫応答の処置において特に有効である。これに関して、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、外部抗原および自己抗原の両方に対する望ましくない免疫応答を制御、抑制、モジュレート、処置または排除するために使用され得ると認識されよう。

【0222】

別の態様では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、治療有効量または十分量の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を、それを必要とする哺乳動物に投与することによって、哺乳動物における疾患または障害、例えば自己免疫疾患を予防（予防的）または処置（治療的）するために適合され、疾患は予防または処置される。所望の効果を達成するために適切な任意の投与経路が本発明によって企図される（例えば、静脈内、筋肉内、皮下）。疾患状態の処置は、状態に関連する症候の減少（これは、長期的なものでもよいし、または短期的なものでもよいし、または一時的に有益な効果でさえもよい）をもたらし得る。

10

【0223】

多数の疾患状態が、本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質による処置に適切である。例えば、いくつかの態様では、疾患または障害は、自己免疫疾患または癌である。いくつかのこのような態様では、自己免疫疾患は、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、実験的自己免疫性関節炎、重症筋無力症、甲状腺炎、実験型ブドウ膜網膜炎、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン病、早発閉経、男性不妊症、若年型糖尿病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感性眼炎、水晶体起因性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎 H b s - v e、特発性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、強皮症、ヴェーゲナー肉芽腫症、多発性筋炎、皮膚筋炎、円板状 L E、S L E または結合組織病である。

20

【0224】

特定の実施形態では、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、S L E またはシェーグレン症候群を予防または処置するために使用される。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有効性は、本明細書に開示される最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質で処置された哺乳動物における I F N - レベル、I F N - 応答遺伝子レベル、自己抗体力価、腎臓機能および病状、ならびに / または循環免疫複合体レベルと、対照製剤で処置された哺乳動物とを比較することによって実証される。

30

【0225】

例えば、処置を必要とするヒト被験体が選択または同定される（例えば、S L E に関する American College of Rheumatology 基準を満たす患者、または American-European Consensus Sjogren's Classification Criteria を満たす患者）。被験体は、例えば、S L E またはシェーグレン症候群の原因または症候の軽減を必要とし得る。被験体の同定は、臨床環境において、または他の場所において、例えば被験体の自宅において、被験体自身が自己試験キットを使用することによって行われ得る。

40

【0226】

0 時間の時点において、適切な初回用量の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を被験体に投与する。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、本明細書に記載されるように製剤化される。初回投与後の期間、例えば 7 日、14 日および 21 日後に、例えば、I F N - レベル、I F N - 応答遺伝子レベル、自己抗体力価、腎臓機能および病状、ならびに / または循環免疫複合体レベルを測定することによって、被験体の状態を評価する。他の関連基準も測定され得る。投与の回数および強度は、被験体の要求にしたがって調整される。処置後、被験体の I F N - レベル、I F N - 応答遺伝子レベル、自己抗体力価、腎臓機能および病状、ならびに / または循環免疫複合体レベルは、処置前に存在するレベルと比べて、または未処置である以外は同様に罹患している / 対照被験体において

50

測定されたレベルと比べて低下および／または向上する。

【0227】

別の例では、処置を必要とする齧歯類被験体が選択または同定される（例えば、実施例7を参照のこと）。被験体の同定は、研究室環境において、または他の場所において行われ得る。0時間の時点において、適切な初回用量の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を被験体に投与する。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、本明細書に記載されるように製剤化される。初回投与後の期間、例えば7日、14日および21日後に、例えば、IFN- γ レベル、IFN- γ 応答遺伝子レベル、自己抗体力価、腎臓機能および病状、ならびに／または循環免疫複合体レベルを測定することによって、被験体の状態を評価する。他の関連基準も測定され得る。投与の回数および強度は、被験体の要求にしたがって調整される。

10

【0228】

処置後、被験体のIFN- γ レベル、IFN- γ 応答遺伝子レベル、自己抗体力価、腎臓機能および病状、ならびに／または循環免疫複合体レベルは、処置前に存在するレベルと比べて、または未処置である以外は同様に罹患している／対照被験体において測定されたレベルと比べて低下および／または向上する。

【0229】

本発明の別の態様は、1つまたはそれを超える最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を用いて、障害、疾患および状態を処置または予防するための遺伝子治療方法を使用することである。遺伝子治療方法は、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質核酸（DNA、RNAおよびアンチセンスDNAまたはRNA）配列をそれを必要とする動物に導入して、1つまたは複数の本開示のポリペプチドの発現を達成することに関する。この方法は、プロモーターと、標的組織によるポリペプチドの発現に必要な他の任意の遺伝的エレメントとに作動可能にカップリングされた本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする1つまたはそれを超えるポリヌクレオチドの導入を含み得る。

20

【0230】

遺伝子治療用途では、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質遺伝子が細胞に導入される。「遺伝子治療」は、単回処置によって持続効果が達成される従来の遺伝子治療、および治療的に有効なDNAまたはmRNAの1回または反復投与を伴う遺伝子治療剤の投与の両方を含む。オリゴヌクレオチドは、例えば、それらの負荷電ホスホジエステル基を非荷電基で置換することによって、それらの取り込みを増強するように改変され得る。

30

【実施例】

【0231】

以下は、本発明を行うための特定の実施形態の例である。実施例は、例示目的のみのために提供されるものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図しない。使用される数字（例えば、量、温度など）に関して、精度を確保するための努力がなされているが、当然のことながら、いくらかの実験誤差および偏差は許容されるべきである。

【0232】

特に指示がない限り、本発明の実施は、当技術分野の技術範囲内のタンパク質化学、生化学、組換えDNA技術および薬理学の従来の方法を用いる。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, P

40

50

ennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)
; Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照のこと。

【0233】

実施例1

発現ベクターをコードする最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の生成

本開示の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の様々な実施形態は図1に示されており、各アミノ酸配列は配列表に示されている。例示的な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質として、図1に示されている構成を有する二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を構築した。具体的には、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のアミノ酸配列から出発して、哺乳動物細胞における最適な発現を可能にするためにGenescript (Genescript, Piscataway, N. J.) によるコドン最適化を使用して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを直接合成した。最適化のプロセスは、例えば、可能な場合には非常に高い(>80%)または非常に低い(<30%)GC含有量の領域を回避することと、シス作用配列モチーフ、例えば内部TATAボックス、カイ部位およびリボソーム侵入部位、ATリッチなまたはGCリッチな配列ストレッチ、RNA不安定性モチーフ、反復配列およびRNA二次構造、ならびに高等真核生物における潜在的スプライスドナーおよびアクセプター部位を回避することとを伴っていた。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードするDNAをpcDNA3.1+哺乳動物発現ベクターにクローニングする。以下の構成を有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を生成した。

【0234】

タンデムホモ二量体RSLV-145(配列番号1)は、DNase-リンカー-RNase-Fcという構成を有し、野生型ヒトRNase1ドメイン(配列番号27)は、リンカーによらずに、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331S(配列番号55)とを含む変異体Fc領域のN末端に作動可能にカップリングされており、変異体ヒトDNase1ドメイン(配列番号25)は、NLGリンカー(配列番号41)を介してRNase1ドメインのN末端に作動可能にカップリングされている。

【0235】

ヘテロ二量体を優先的に形成するために、以下の構築物における各Fcドメインは、相補的CH3変異:T350V、L351Y、F405AおよびY407V;ならびにT350V、T366L、K392LおよびT394Wを含んでいた(ナンバリングはEUIンデックスに従う)。

【0236】

タンデムヘテロ二量体RSLV-147は、DNase-Fc(配列番号3)およびRNase-Fc(配列番号4)という構成を有し、変異体ヒトDNase1ドメイン(配列番号25)は、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異とを含む第1の変異体Fc領域のN末端に作動可能にカップリングされており、野生型ヒトRNase1ドメイン(配列番号27)は、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異とを含む第2の変異体Fc領域のN末端に作動可能にカップリングされている。

【0237】

ヘテロ二量体RSLV-148は、DNase-第1のFcドメイン-リンカー-RNase(配列番号5)および第2の変異体Fcドメイン(CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異とを含む)(配列番号6)(CCCヒンジにおいて第1のシステインを含むN末端切断型)という構成を有し、変異体ヒトDNase1ドメイン(配列番号25)は、SCCヒンジと、CH2変異P238S、P331Sと、CH3変異とを含む第1の変異体Fc領域のN末端に作動可能にカップリングされており、野生型ヒトRNase1ドメイン(配列番号27)は、NLGリンカーを介して第1のFc領域のC末端に作

動可能にカップリングされている。

【0238】

ヘテロ二量体 R S L V - 149 は、D N a s e - F c (配列番号7) および F c - リンカー - R N a s e (配列番号8) という構成を有し、変異体ヒト D N a s e 1 ドメイン (配列番号25) は、S C C ヒンジと、C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む第1の変異体 F c 領域の N 末端に作動可能にカップリングされており、野生型ヒト R N a s e 1 ドメイン (配列番号27) は、N L G リンカーを介して、C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む第2の変異体 F c 領域 (配列番号6) の C 末端に作動可能にカップリングされている。

【0239】

ヘテロ二量体 R S L V - 152 は、R N a s e - 第1の変異体 F c - リンカー - D N a s e (配列番号13) および第2の変異体 F c ドメイン (C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む) (配列番号14) という構成を有し、野生型ヒト R N a s e 1 ドメイン (配列番号27) は、S C C ヒンジと、C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む第1の変異体 F c 領域の N 末端に作動可能にカップリングされており、変異体ヒト D N a s e 1 ドメイン (配列番号25) は、N L G リンカー (N L G l i n e r) を介して第1の変異体 F c 領域の C 末端に作動可能にカップリングされている。

【0240】

ヘテロ二量体 R S L V - 153 は、F c - リンカー - D N a s e (配列番号15) および R N a s e - F c (配列番号16) という構成を有し、変異体ヒト D N a s e 1 ドメイン (配列番号25) は、N L G リンカーを介して、C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む第1の変異体 F c 領域の C 末端に作動可能にカップリングされており、野生型ヒト R N a s e 1 ドメイン (配列番号27) は、S C C ヒンジと、C H 2 変異 P 2 3 8 S、P 3 3 1 S と、C H 3 変異とを含む第2の変異体 F c 領域の N 末端に作動可能にカップリングされている。

【0241】

構築物 R L S V - 327 (ヒト血清アルブミンに連結された R N a s e 1 および D N a s e 1 を含有する二重ヌクレアーゼ; R N a s e - リンカー - H S A - リンカー - D N a s e E 13 R / N 74 K / A 114 F / T 205 K) および R S L V - 132 (R N a s e - F c) (D N a s e および R N a s e 部分を含有する) を対照として使用した。

【0242】

実施例2

最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を発現する安定哺乳動物細胞株の一過性発現

一過性発現のために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質インサートを含有する実施例1の発現ベクターを、製造業者が推奨するトランスフェクションプロトコルを使用し、FreeStyle (商標) MAX 試薬を使用して、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、例えば CHO - S 細胞 (例えば、FreeStyle (商標) CHO - S 細胞、Invitrogen) に一過性にトランスフェクトする。2 mM L - グルタミンおよびペニシリン - ストレプトマイシンを含有する FreeStyle (商標) CHO 発現培地中で、CHO - S 細胞を維持する。

【0243】

当技術分野で公知のルーチンな方法を使用して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を発現する安定 CHO - S 細胞株を生成する。例えば、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の核酸配列と、例えばフローサイトメトリーまたは磁気ビーズ分離 (例えば、MACSelect (商標) システム) を使用して選択されるマーカー (例えば、GFP、磁気ビーズによって選択可能な表面マーカー) をコードする核酸配列とを含むウイルス (例えば、レトロウイルス、レンチウイルス) を CHO - S 細胞に感染させ得る。あるいは、当技術分野で公知の任意のトランスフェクション方法、例えばエレクトロポレーション (Lonza) または上記 FreeStyle (商標) MAX 試薬を使用して、最適化二

10

20

30

40

50

重ヌクレアーゼ融合タンパク質の核酸配列と、選択可能なマーカーとを含むベクターを CHO-S 細胞にトランスフェクトし、続いて、例えばフローサイトメトリーを使用して選択する。選択可能なマーカーを、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードするものと同じベクターまたは別個のベクターに組み込み得る。

【0244】

プロテイン A セファロースビーズを充填したカラムを使用して分子を捕捉し、続いて、カラム洗浄緩衝液（例えば、90 mM トリス、150 mM NaCl、0.05% アジ化ナトリウム）で洗浄し、適切な溶出緩衝液（例えば、0.1 M クエン酸緩衝液、pH 3.0）を使用してカラムから分子を放出させることによって、培養上清から最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質を精製する。Centricon 濃縮器を使用して PBS 中で連続スピンによって緩衝液交換し、続いて、0.2 μm フィルタデバイスによってろ過することによって、溶出物質をさらに濃縮する。標準的な分光光度法（例えば、Bradford, BCA, Lowry, Biuret アッセイ）を使用して、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の濃度を決定する。

【0245】

実施例 3

精製最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼ活性

マウス血清中に存在する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の RNase 活性を分析した。50 mM Hepes および 100 mM NaCl (pH 7.3) 中、12.5 ~ 100 ng から 2.5 mg/ml のポリ-IC (Sigma) の用量でタンパク質を追加し、50 分間 37 °C でインキュベートした。TCA を 5% の最終濃度まで追加し、氷上で放置した。サンプルをろ過して沈殿物を除去し、OD₂₆₀ の読み取りのために、ろ液を収集した。結果は、図 2 に示されている。RSLV-132 および RSLV-145（これらは両方とも、構築物 1 モル当量当たり 2 つの RNase 部分を含有する）は両方とも活性であり、RSLV-145 は、RSLV-132 よりも活性であった。モル基準で 1 つの RNase 部分のみを含有する他の構築物（RSLV-147、RSLV-152、RSLV-153 および RSLV-327）は同程度であり、RSLV-132 と一致していた。驚くべきことに、RSLV-148 および RLSV-149 は、RSLV-132 および他の単一 RNase 構築物よりも高い活性を有していた。これらの構築物はそれぞれ、Fc ドメインの C 末端に付着された RNase 部分を含有する。

【0246】

ODN-2006-G5 (InvivoGen, tlr1-2006g5) (TLR9 の DNA オリゴヌクレオチドアゴニスト) を使用して、DNase 1 ドメインを含有する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の DNase 1 活性を測定した。25 mM Hepes および 10% FBS を含有する DMEM 中で、0.24 ng/ml ~ 500 ng/ml の範囲の投与量のタンパク質を ODN-2006-G5 と共に 37 °C で 1 時間インキュベートした。反応混合物を、TLR9 アゴニストに応答してアルカリホスファターゼ (SEAP) を分泌するように操作した hTLR9 HEKBlue 細胞に 37 °C で一晩適用した。培養培地を回収し、比色基質を使用して SEAP についてアッセイし、次いで、OD₆₂₀ で読み取った。GraphPad Prism (登録商標) バージョン 6.0 e ソフトウェアを使用して、IC₅₀ 値を計算した。結果は、図 3 に示されている。6 つの構築物（RSLV-145、RSLV-147、RSLV-148、RSLV-149、RSLV-152 および RSLV-153）はすべて、ロバストな DNase 活性を有しており、組換え体 huDNase 1 よりも少なくとも 5000 倍活性であった。RSLV-145 は、他のヘテロ二量体構築物および RSLV-327 よりも約 2 倍活性であると思われるが、これはおそらく、他の構築物における DNase ドメインが 1 つであることと比較して、RSLV-145 における DNase ドメインは 2 つであることに起因する。RSLV-152 は、一貫して最低活性の構築物であった。

【0247】

実施例 4

インビトロにおける最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有効性
サイトカイン発現に対する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の効果

正常患者およびループス患者からヒトPBM Cを単離し、培養する。実施例2の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有無の下、様々な刺激性TLRリガンド、共刺激抗体、免疫複合体および正常血清または自己免疫血清で細胞を処理する。様々な時点（例えば、6時間、12時間、24時間、48時間など）において培養上清を収集し、例えばThermo Fisher Scientific, Inc.製の市販のELISAキットを使用して、ヒトIL-6、IL-8、IL-10、IL-4、IFN- γ 、IFN- α およびTNF- α を含む一団のサイトカインのレベルを測定する。有効な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、対照と比べて、刺激PBM Cによって産生されるサイトカインのレベルを減少させると予想される。

10

【0248】

リンパ球活性化受容体発現に対する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の効果

正常患者およびループス患者からヒトPBM Cを単離し、培養する。実施例2の最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の有無の下、様々な刺激性TLRリガンド、共刺激抗体、免疫複合体および正常血清または自己免疫血清で細胞を処理する。次いで、細胞をマルチカラーフローサイトメトリーに供して、刺激後の様々な時点（例えば、6時間、12時間、24時間、48時間など）において、当技術分野で認められているルーチンな方法を使用して、リンパ球活性化受容体CD5、CD23、CD69、CD80、CD86およびCD25の発現を測定する。これらの受容体のための適切な抗体は、例えばBD/PharMingenから市販されている。有効な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、対照と比較して、刺激PBM Cにおけるリンパ球活性化受容体の発現を減少させると予想される。

20

【0249】

形質細胞様樹状細胞(pDC)インターフェロンアウトプットに対する最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の効果

当技術分野で認められている方法または市販のキット、例えばEasySep(商標) Human EpCAM Positive Selection Kit(StemCell Technologies, Inc.)を使用して、健常志願者由来のpDCを単離する。例えば、96ウェル平底プレートにおいて、0.1mlの適切な培地（例えば、10% FBS、2mM グルタミン、55 μ M β -メルカプトエタノール、1mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/ml ペニシリンおよび100 μ g/ml ストレプトマイシンを含有する完全RPMI培地）中、 $5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 個/ウェルの範囲の密度で、単離pDCを培養する。培養培地によって1:5の比率で希釈した個々のSLE患者由来の血清または血漿を追加することによって、培養pDCを活性化し、0.1mlのこれらのサンプルを細胞含有ウェルに追加する（最終患者血清濃度は10%である）。培養物を37℃で40時間インキュベートし、その後、馴化培地を回収し、市販のELISAキットを使用して、IFN- γ 含有量について評価する。健常志願者から得た血清サンプルを対照として使用する。最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質の影響を評価するために、最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質（1~10 μ g/ml）でSLE患者の血清または血漿を30分間前処理し、pDC培養物に追加する。有効な最適化二重ヌクレアーゼ融合タンパク質は、核酸含有ICを分解する結果として、産生されるIFN- γ の量を減少させると予想される。

30

40

【0250】

好ましい実施形態および様々な代替的な実施形態を参照して、本発明を特に示して説明したが、当業者であれば、本発明の精神および範囲から逸脱せずに、形態および詳細における様々な変更が行われ得ると理解するであろう。

【0251】

本明細書の本文内で引用されている参考文献、発行特許および特許出願はすべて、任意の目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

50

【表 1 - 1】

配列表

配列番号	説明	配列
1	RSLV-145 (DNase-NLGリンカー- RNase-Fc) アミノ酸配列 成熟ヒトDNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K(下線) NLGリンカー(太字) 成熟ヒトRNase1 (太字下線) Fcドメイン	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRVDIALVQEV</u> <u>RDSHLTAVGKLLDNLNODAPDTYHYVVSEPLGRKSYK</u> <u>ERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPF</u> <u>VRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDV</u> <u>QEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPT</u> <u>FOWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDS</u> <u>ALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK</u> VDGASSP VNVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDS SDSSPSSSSTYCN OMMRRRNMT OGRC PKPVNTFVHEPLVDVONVCF OEKV TCKNGOG NCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSP KERHII VACEGSPYVPVHEDASVEDSTEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	RSLV-146 (Fc-リンカー-RNase- NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGS <u>KESRAKKFOROHMDS</u> SDSSPSSSSTYCNOMMRRR NMT OGRC PKPVNTFVHEPLVDVONVCF OEKV TCKNGOG NCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSP KERHII V CEGSPYVPVHEDASVEDST VDGASSP VNVSSPSVQDI <u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRVDIALVQEV</u> <u>RDSHLTAVGKLLDNLNODAPDTYHYVVSEPLGRKSYK</u> <u>ERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPF</u> <u>VRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDV</u> <u>QEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPT</u> <u>FOWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDS</u> <u>ALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK</u>
3	RSLV-147 DNase鎖 (Dnase-FcA) アミノ酸配列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRVDIALVQEV</u> <u>RDSHLTAVGKLLDNLNODAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSA</u> <u>LPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLKEPKSSDKT</u>

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

		HTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	RSLV-147 RNase鎖 (RNase-FcB) アミノ酸配列	<u>KESRAKKFOROHMDS</u> <u>DSSPSSSSTYC</u> <u>NOMMRRRNMTQ</u> <u>GRCKPVNTFVHEPLVDVONVCFOEKVTCKNGOGNCYK</u> <u>SNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIVACEGSP</u> <u>YVPVHFDASVEDST</u> EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	RSLV-148 (DNase-FcA- NLGリンカー-RNase) アミノ酸配列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEV</u> <u>RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIIVAGMLLRGAVVPDSA</u> <u>LPFNFAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLKEPKSSDKT</u> HTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVDGAS SPVNVSSPSVQDI <u>KESRAKKFOROHMDS</u> <u>DSSPSSSSTYC</u> <u>NOMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVONVCFOEK</u> <u>VTCKNGOGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTS</u> <u>PKERHIIVACEGSPYVPVHFDASVEDST</u>
6	RSLV-148 FcB鎖 アミノ酸配列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	RSLV-149 DNase鎖 (DNase-Fc) アミノ酸配列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEV</u> <u>RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIIVAGMLLRGAVVPDSA</u>

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

		<p><u>LPFNFOAAYGLSDQLAQAI</u><u>SDHYPVEVMLKEPKSSDKT</u> <u>HTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> <u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKS</u> <u>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
8	RSLV-149 RNase鎖 (Fc-NLG-リンカー-RNase) アミノ酸配列	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVD GASSPVNVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDSDSSPSSSS TYCNOMMRRRNMTOGRCKPVNTFVHEPLVDVONVCE QEKVTCKNGOGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAY RTSPKERHIIVACEGSPYVPVHFDASVEDST</p>
9	RSLV-150 DNase鎖 (FcA-NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	<p>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKVDGASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNA TLVSYIVQILSRDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQD APDTYHYVVSEPLGRKSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYY YDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAA PGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAG CSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAY DRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK</p>
10	RSLV-150 RNase鎖 (FcB-NLGリンカー-RNase) アミノ酸配列	<p>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKVDGASSPVNVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDSDSS PSSSSTYCNOMMRRRNMTOGRCKPVNTFVHEPLVDVONV CFOEKVTCKNGOGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYP NCAVRTSPKERHIIVACEGSPYVPVHFDASVEDST</p>
11	RSLV-151 DNase鎖 (Fc-NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK</p>

10

20

30

40

【表 1 - 4】

		<p>TISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVD <u>GASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVS</u> <u>YIVQILSRDIALVQEVDRSHLTAVGKLLDNLNODAPDT</u> <u>YHYVVSEPLGRKSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDD</u> <u>GCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSY</u> <u>VRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAVDRI</u> <u>VVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDH</u> <u>YPVEVMLK</u></p>	10
12	RSLV-151 RNase鎖 (Fc-NLGリンカー-RNase) アミノ酸配列	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVD <u>GASSPVNVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDS DSSPSSSS</u> <u>TYCNOMMRRRNMT OGRCKPVNTFVHEPLVDVONVCF</u> <u>OEKVTCKNGOGNICYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAY</u> <u>RTSPKERHII VACEGSPYVPVHFDASVEDST</u></p>	20
13	RSLV-152 (RNase-Fc- NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	<p><u>KESRAKKFOROHMDS DSSPSSSSSTYCNOMMRRRNMT O</u> <u>GRCKPVNTFVHEPLVDVONVCF OEKVTCKNGOGNICYK</u> <u>SNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII VACEGSP</u> <u>YVPVHFDASVEDSTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSV</u> <u>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPS</u> <u>RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGKVDGASSPVNVSSPSVQDILKIA</u> <u>AFNIQTFGRTKMSNATLVS YIVQILSRDIALVQEVDRSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNODAPDTYHYVVSEPLGRKSYKERYLF</u> <u>VYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSR</u> <u>FTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWG</u> <u>LEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP</u> <u>DSADTTAKPTHCAVDRI VVAGMLLRGAVVPDSALPFNF</u> <u>QAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK</u></p>	30
14	RSLV-152 Fcドメイン鎖 アミノ酸配列	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV</p>	40

【表 1 - 5】

		DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	RSLV-153 DNase鎖 (Fc-NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI ETISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK VD GASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVS YIVQILSRDIALVQEV RDSH LTAVGKLLDNLNQDAPDT YHYV VSEPLGRKSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDD GCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAI VPLHAAPGD AVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSY VRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCA YDRI VVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQ AISDH YPVEVMLK
16	RSLV-153 RNase鎖 (RNase-Fc) アミノ酸配列	KESRAKKFOROHMDSDSSPSSSSTYC NOMMRRRNMTQ GRCKPVNTFVHEPLVDVONVCFQEKVTCKNGOGNCYK SNSSMHITD CRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII VACEGSP YVPVHEDASVEDST EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIETISKAKGQPREPQVY VLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLT WPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
17	RSLV-154 (RNase-Fc- NLGリンカー-DNase) アミノ酸配列	KESRAKKFOROHMDSDSSPSSSSTYC NOMMRRRNMTQ GRCKPVNTFVHEPLVDVONVCFQEKVTCKNGOGNCYK SNSSMHITD CRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII VACEGSP YVPVHEDASVEDST ELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVNTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLNSTL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK VDGASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNATL VSYIVQILSRDIALVQEV RDSH LTAVGKLLDNLNQDAP DTYHYV VSEPLGRKSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYY DDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAI VPLHAAP GDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCA YD RIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQ AIS DHYPVEVMLK
18	Fc-NLG-リンカー-DNase (対照構築物)	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

		NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK V <u>GASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGETKMSNATLVS</u> <u>YIVQILSRDYDIALVQEV RDSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNQDAPDT</u> <u>YHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDD</u> <u>GCEPCRNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSY</u> <u>VRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA</u> <u>YDRIV</u> <u>VAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQ</u> <u>AISDHYP</u> <u>PVEVMLK</u>	10
19	DNase-Fc (対照構築物)	<u>LKIAAFNIQTFGR</u> <u>TKMSNATLVSYIVQILSRDYDIALVQEV</u> <u>RDSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTAKPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSA</u> <u>LPNFQAAYGLSDQLAQ</u> <u>AISDHYPVEVMLKEPKSSDKT</u> <u>HTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> <u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
20	成熟野生型ヒトDNase1	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIALVQEV</u> <u>RDSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTATPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSAL</u> <u>PFNFQAAYGLSDQLAQ</u> <u>AISDHYPVEVMLK</u>	
21	成熟ヒトDNase1 A114F	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIALVQEV</u> <u>RDSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTATPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSAL</u> <u>PFNFQAAYGLSDQLAQ</u> <u>AISDHYPVEVMLK</u>	30
22	成熟ヒトDNase1 G105R	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIALVQEV</u> <u>RDSH</u> <u>LTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKE</u> <u>RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCRNDTFNREPAIV</u> <u>RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGD</u> <u>AVAEIDALYDVYLDVQ</u> <u>EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF</u> <u>QWLIPDSADTTATPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSAL</u> <u>PFNFQAAYGLSDQLAQ</u> <u>AISDHYPVEVMLK</u>	40

【表 1 - 7】

23	前駆体ヒトDNase1	MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKM SNATLVSYIVQILSRDIALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLN QDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLH AAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFN AGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTH AYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQ AISDHYPVEVMLK
24	成熟ヒトDNase1 N18S/N106S/A114F	LKIAAFNIQTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDIALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKE RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREFIVR FFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ KWGLEDMMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQ WLIPDSADTTATPTHCAAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALP FNFQAAYGLSDQLAQ AISHYPVEVMLK
25	成熟ヒトDNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K	LKIAAFNIQTFGR TKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREFIV RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF QWLIPDSADTTAK PTHCAAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSA LPFNFQAAYGLSDQLAQ AISHYPVEVMLK
26	成熟ヒトDNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K/N18S/N106S	LKIAAFNIQTFGR TKMS SATLVSYIVQILSRDIALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKE RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREFIV RFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQ EKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTF QWLIPDSADTTAK PTHCAAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSA LPFNFQAAYGLSDQLAQ AISHYPVEVMLK
27	成熟ヒトRNase1	KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQ GRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCKNGQGNCYK SNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSP YVPVHFDASVEDST
28	成熟ヒトRNase1 N34S/N76S/N88S	KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRSMTQ GRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCKNGQGNCYK SSSMHITDCRLTSGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPY VPVHFDASVEDST
29	前駆体ヒトRNase1	MALEKSLVRLLLLVLILLVLGWVQPSLGKESRAKKFQR QHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFV HEPLVDVQNVCFQEKVTCKNGQGNCYKSNSSMHITDC RLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFDASV EDST
30	(Gly ₄ Ser) ₃ リンカー	GGGGSGGGSGGGGS
31	Gaussiaルシフェラーゼ シグナルペプチド	MGVKVLFALICIAVAEA
32	リンカー	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄

10

20

30

40

【表 1 - 8】

33	O結合型グリコシル化 コンセンサス	CXXGG-T/S-C
34	O結合型グリコシル化 コンセンサス	NST-E/D-A
35	O結合型グリコシル化 コンセンサス	NITQS
36	O結合型グリコシル化 コンセンサス	QSTQS
37	O結合型グリコシル化 コンセンサス	D/EFT-R/K-V
38	O結合型グリコシル化 コンセンサス	C-E/D-SN
39	O結合型グリコシル化 コンセンサス	GGSC-K/R
40	VK3 軽鎖 シグナルペプチド	METPAQLLFLLLLWLPDTTG
41	NLG リンカー	VDGASSPVNVSSPSVQDI
42	リンカー	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ ALE
43	リンカー	GGSG
44	リンカー	GSAT
45	ヒト野生型 IgG1 Fcドメイン	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLTQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
46	成熟ヒトDNase1L3	MRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVME IKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYK EQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVV WFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKH RWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFV WLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNS VFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKK SVTLRKKTKSKRS
47	ヒトTrex1	MGP GARRQGRIVQGRPEMCF CPPPTPLPPLRILTLGTHTP TPCSSPGSAAGTYPTMGSQLPPGPMQTLIFFDMEATGL PFSQPKVTELCLLAVHRCALSPPTSQGPPTVPPPPRVV DKLSLCVAPGKACSPAASEITGLSTAVLAAHGRQCDDN

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

		LANLLLAFLRRQPQPWCLVAHNGDRYDFPLLQAELAML GLTSALDGAFCVDSITALKALERASSPSEHGPRKSYSLGS IYTRLYGQSPPDSTHTAEGDVLALLSICQWRPQALLRWV DAHARPFGTIRPMYGVITASARTKPRPSAVTTTAHLATTR NTSPSLGESRGTKDLPPVKDPGALSREGLLAPLGLLAILT LAVATLYGLSLATPGE
48	ヒトDNase2 α (NP_001366.1)	MIPLLLAALLCVPAGALTCYGDSGQPVDWVYKLPAL RSGGEAAQRGLQYKYLDSSGGWRDGRALINSPEGAV GRSLQPLYRSNTSQLAFLLYNDQPPQPSKAQDSSMRGH TKGVLLLDHDGGFWLVHVSVPNFPPASSAAYSWPHSAC TYGQTLICVSFPFAQFSKMGKQLTYTPWVYNYQLEGI FAQEFPDLENVVKGHHVSQEPWNSSITLTSQAGAVFQSF AKFSKFGDDLYSGLWLAALGTNLQVQFWHKTGILPS NCSDIWQVLNVNQIAFPAGPSFNSTEDHSHKWCVSPK GPWTCVGDMMNRNQGEQRRGGTLCALPALWKAQPL VKNYQPCNGMARKPSRAYKI
49	ヒトDNase2 β	MKQKMMARLLRTSFALLFLGLFGVLGAATISCRNEEGK AVDWFTFYKLPKRQNKESGETGLELYLDSTTRSWRKS EQLMNDTKSVLGRTLQQLYEAYASKSNNTAYLIYNDG VPKPVNYSRKYGHTKGLLLWNRVQGFVLIHSIPQFPPI EEGYDYPPTGRRNGQSGICITFKYNQYEIDSQLLVCNP NVYSCSIPATFHQELIHMPQLCTRASSSEIPGRLLTTLQS AQGQKFLHFAKSDSFLDDIFAAWMAQRLKTHLLTETW QRKRQELPSNCSLPYHVYNIKAIKLSRHSYFSSYQDHAK WCISQKGTKNRWTCIGDLNRSPHQAFRSGGFICTQNWQ IYQAFQGLVLYYESCK
50	Fc領域N83S	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
51	SCCを有するFc領域	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
52	SSSを有するFc領域	EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

		K
53	リンカー	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ ALE
54	VK3LP リーダー	METPAQLLFLLLLWLPDTTG
55	SCC, P238S, P331S変異 を有するFc領域	EPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
56	P238S, P331S変異 を有するFc領域	EPKCSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
57	RSLV-327 (RNase-リンカー- HSA-リンカー-DNase E13R/N74K/A114F/ T205K)	METPAQLLFLLLLWLPDTTGKESRAKKFQRQHMDSDSS PSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQ NVCFQEKVTCKNGQGNCYKSNSMHTDCRLTNGSRYP NCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFDASVEDSTGGGG SGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAF AQYLQQCPFEDHVKLNVTEFAKTCVADESAENCCKS LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL QHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLP KLDEL RDEGKASSAKQRLKCA SLQKFGERA FKAWAVAR LSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK QTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD DKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGG SLKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQE VRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYK ERYLFFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFI VRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDV QEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPT FQWLIPDSADTTAKPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDS ALPFNFQAAYGLSDQLAQ AISDHYPVEVMLK

10

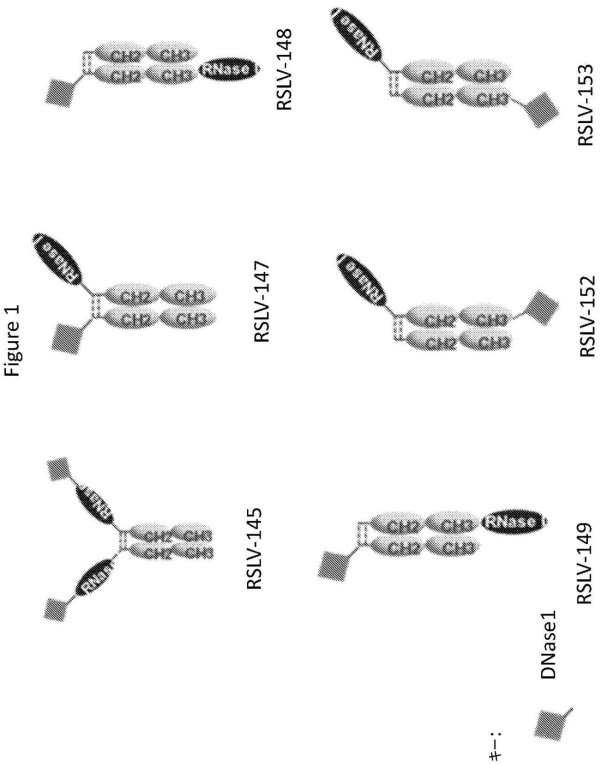
20

30

40

【図面】

【図 1】



【図 2】

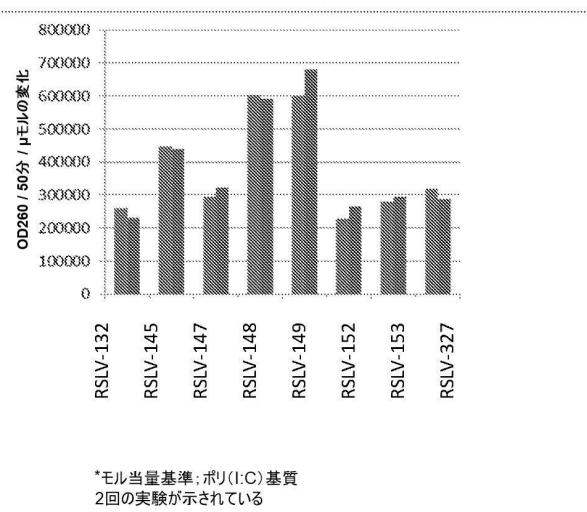
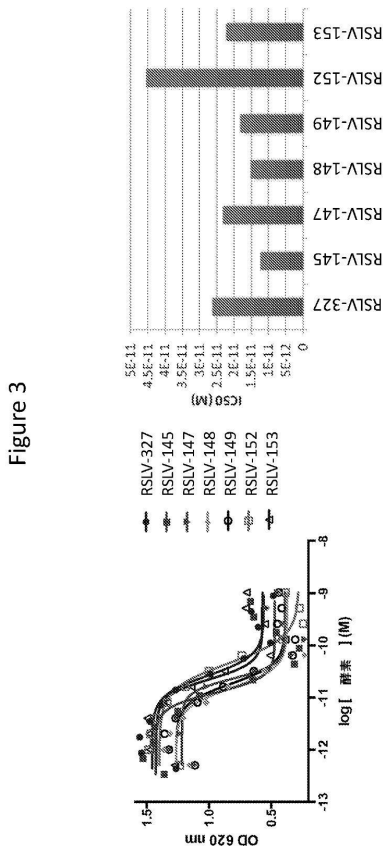


Figure 2

【図 3】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007308034000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
		A 6 1 P	37/02	

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ボサダ, ジェイムズ アーサー

アメリカ合衆国 フロリダ 3 3 7 0 1, セント ピーターズバーグ, 1 エスティー アベニュー
エヌ 7 2 1

(72)発明者 バテル, サンジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, サイエンス センター ドライブ
1 0 4 1 0

(72)発明者 ユー, ウェイホン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, サイエンス センター ドライブ
1 0 4 1 0

(72)発明者 ガベル, クリス

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 3 6, シアトル, エスダブリュー ローズ ストリート 4 4 1 9

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 0 9 2 0 1 (J P , A)

特表 2 0 1 4 - 5 1 9 8 0 9 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 6 6 5 5 0 (W O , A 1)

特表 2 0 1 4 - 5 3 3 2 4 3 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d