



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119120423 A

(43) 申请公布日 2024.12.13

(21) 申请号 202410960265.X

A61K 38/46 (2006.01)

(22) 申请日 2017.06.30

A61P 3/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/357,756 2016.07.01 US

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201780053637.9 2017.06.30

A61P 21/04 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(71) 申请人 分解治疗有限责任公司

A61P 1/00 (2006.01)

地址 美国华盛顿州

A61P 15/08 (2006.01)

(72) 发明人 J·A·波萨达 S·帕特尔

A61P 1/16 (2006.01)

余维红 C·加贝尔

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

A61P 37/00 (2006.01)

11256

A61P 19/04 (2006.01)

专利代理人 陈文平 徐志明

C07K 19/00 (2006.01)

(51) Int.Cl.

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

权利要求书4页 说明书49页

A61K 47/65 (2017.01)

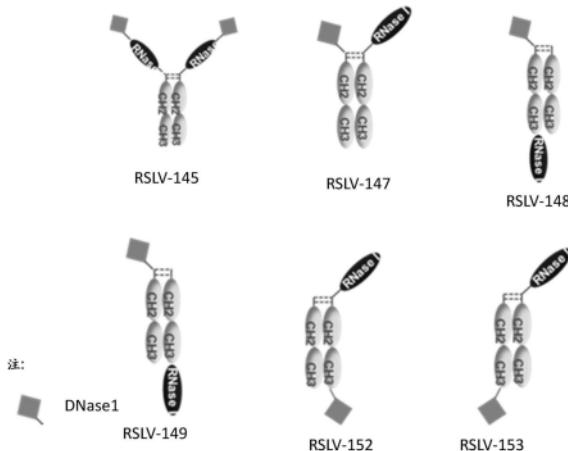
序列表 (电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

优化的二核酸酶融合蛋白和方法

(57) 摘要

本发明提供了具有增强的药代动力学特性的优化的二核酸酶融合蛋白。本发明的优化的二核酸酶融合蛋白包含可操作地与Fc结构域偶联的两个或更多个核酸酶结构域(例如, RNase和DNase结构域)。本发明还提供了治疗或预防与异常免疫应答相关的病症的方法。



1. 一种包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域、第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚体,其中所述第一核酸酶结构域是DNase1和所述第二核酸酶结构域是RNase1,其中所述DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-或C-末端,并且所述RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的N-或C-末端。

2. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第二Fc结构域的N-末端。

3. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的N-末端。

4. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的C-末端。

5. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第二Fc结构域的C-末端。

6. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的C-末端。

7. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端,并且所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的C-末端。

8. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第一Fc结构域的C-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接到所述第二Fc结构域的C-末端。

9. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的N-末端。

10. 根据权利要求1所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端,并且所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第二Fc结构域的N-末端。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的异二聚体,其中所述RNase是野生型人RNase1或突变体RNase,如非糖基化、低糖基化或去糖基化的RNase1,如人RNase1 N34S/N76S/N88S。

12. 根据权利要求11所述的异二聚体,其中所述RNase是野生型人RNase1。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的异二聚体,其中所述DNase是野生型人DNase1或突变体人DNase1 A114F,或非糖基化、低糖基化或去糖基化的突变体人DNase1 N18S/N106S/A114F。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

15. 根据权利要求14所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含三个铰链区半胱氨酸残基中一个或多个被丝氨酸的置换。

16. 根据权利要求15所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的选自SCC、SSS(残基220、226和229)、G236R、L328R、L234A和L235A的突变。

17. 根据权利要求16所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的SCC突变(残基220、226和229)。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的P238S和P331突变。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含一个或多个CH3突变以优先形成异二聚体。

20. 根据权利要求19所述的异二聚体,其中所述第一Fc结构域包含根据EU索引编号的CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V,并且所述第二Fc结构域包含CH3突变T350V、T366L、K392L、T394W。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述接头结构域是多肽接头,如gly-ser接头或NLG接头(vdgasspvnvsspsvqdi)。

22. 一种包含选自下组的第一和第二多肽序列的异二聚体:

(i) 包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的第一多肽,或含有与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的第二多肽,或含有与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽,或

(ii) 包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的第一多肽,或含有与SEQ ID NO:7所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的第二多肽,或含有与SEQ ID NO:8所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽,或

(iii) 包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的第一多肽,或包含与SEQ ID NO:9所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的第二多肽,或包含与SEQ ID NO:10所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽,或

(iv) 包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的第一多肽,或包含与SEQ ID NO:11所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和包含SEQ ID NO:12所示氨基酸的序列的第二多肽,或包含与SEQ ID NO:12所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽,或

(v) 包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的第一多肽,或包含与SEQ ID NO:15所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽;和包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的第二多肽,或包含与SEQ ID NO:16所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽。

23. 一种包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域及第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚体,其中所述第一核酸酶结构域是DNase1和所述第二核酸酶结构域是RNase1,其中

(i) 所述DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端,或

(ii) 所述RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端。

端。

24. 根据权利要求23所述的异二聚体,其中所述DNase 1在没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端。

25. 根据权利要求23所述的异二聚体,其中所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端。

26. 根据权利要求23所述的异二聚体,其中所述RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端。

27. 根据权利要求23所述的异二聚体,其中所述RNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的N-末端,并且所述DNase1在具有接头的情况下可操作地连接至所述第一Fc结构域的C-末端。

28. 根据权利要求23-27中任一项所述的异二聚体,其中所述RNase是野生型人RNase1或突变体RNase,如非糖基化、低糖基化或去糖基化的RNase1,如人RNase1 N34S/N76S/N88S。

29. 根据权利要求28所述的异二聚体,其中所述RNase是野生型人RNase1。

30. 根据权利要求23-29中任一项所述的异二聚体,其中所述DNase是野生型人DNase1或突变体人DNase1 A114F,或非糖基化的、低糖基化的或去糖基化的突变体人DNase1 N18S/N106S/A114F。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

32. 根据权利要求31所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含三个铰链区半胱氨酸残基中一个或多个被丝氨酸的置换。

33. 根据权利要求32所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的选自SCC、SSS(残基220、226和229)、G236R、L328R、L234A和L235A的突变。

34. 根据权利要求33所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的SCC突变(残基220、226和229)。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含根据EU索引编号的P238S和P331突变。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述第一和第二Fc结构域包含一个或多个CH3突变以优先形成异二聚体。

37. 根据权利要求36所述的异二聚体,其中所述第一Fc结构域包含根据EU索引编号的CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V,并且所述第二Fc结构域包含CH3突变T350V、T366L、K392L、T394W。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的异二聚体,其中所述接头结构域是多肽接头,如gly-ser接头或NLG接头(vdgasspvnvsspsvqdi)。

39. 一种异二聚体,其包含选自下组的第一和第二多肽序列:

(i) 包含SEQ ID N0:5所示的氨基酸序列的第一多肽,或包含与SEQ ID N0:5所示氨基

酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽；和包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的第二多肽，或包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽，或

(ii) 包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的第一多肽，或包含与SEQ ID NO:13所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽；和包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的第二多肽，或包含与SEQ ID NO:14所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽。

40. 一种组合物，其包含前述权利要求中任一项所述的异二聚体和药学上可接受的载体。

41. 编码前述权利要求中任一项所述的异二聚体的核酸分子。

42. 一种重组表达载体，其包含根据权利要求41的核酸分子。

43. 一种用根据权利要求42的重组表达载体转化的宿主细胞。

44. 一种制备权利要求1-39中任一项所述的异二聚体的方法，包括：提供包含编码所述异二聚体的核酸序列的宿主细胞；和在其中所述异二聚体被表达的条件下维持所述宿主细胞。

45. 一种治疗或预防与异常免疫应答相关的病症的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求1-39中任一项所述的异二聚体。

46. 根据权利要求45所述的方法，其中所述病症是自身免疫疾病。

47. 根据权利要求46所述的方法，其中所述自身免疫疾病选自胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、类风湿性关节炎、实验性自身免疫性关节炎、重症肌无力、甲状腺炎、葡萄膜视网膜炎的实验形式、桥本氏甲状腺炎、原发性粘液性水肿、甲状腺毒症、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、艾迪生病、过早绝经、男性不育、青少年糖尿病、Goodpasture综合征、寻常型天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、晶状体源性葡萄膜炎、自身免疫性溶血性贫血、特发性白细胞减少症、原发性胆汁性肝硬化、活动性慢性肝炎Hbs-ve、隐源性肝硬化、溃疡性结肠炎、干燥综合征、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、多发性肌炎、皮肌炎、盘状LE、系统性红斑狼疮(SLE)和结缔组织病。

48. 根据权利要求47所述的方法，其中所述自身免疫疾病是SLE。

49. 根据权利要求47所述的方法，其中所述自身免疫疾病是干燥综合征。

50. 一种治疗SLE的方法，包括向受试者施用有效降解含有RNA、DNA或RNA和DNA两者的免疫复合物的量的异二聚体，其中所述组合物包含药学上可接受的载体和权利要求1-39中任一项的异二聚体。

51. 一种治疗干燥综合征的方法，包括向受试者施用有效降解含有RNA、DNA或RNA和DNA两者的免疫复合物的量的异二聚体，其中所述组合物包含药学上可接受的载体和权利要求1-39中任一项的异二聚体。

优化的二核酸酶融合体和方法

[0001] 本申请是申请日为2017年6月30日和发明名称为“优化的二核酸酶融合体和方法”的201780053637.9号中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2016年7月1日提交的美国临时申请No.62/357756的优先权。上述申请的内容通过引用结合于此。

背景技术

[0004] 已知来自死亡和垂死细胞的(核糖)核蛋白颗粒的累积在系统性红斑狼疮(SLE)患者中通过至少两种机制诱导炎症级联: (i) 染色质/抗染色质复合物的沉积或原位形成引起肾炎并导致肾功能丧失; 和 (ii) 与自身抗体复合的核酸通过Toll样受体(TLR)7、8和9以及非TLR依赖性途径激活先天免疫。核蛋白的释放可以在SLE中用作自身抗体的强效抗原, 从而通过抗原受体和TLR的共同接合提供B细胞的扩增和DC活化。因此, 存在着对于在需要的受试者中除去与自身抗体抗原结合的核酸和/或减弱免疫刺激、免疫放大和免疫复合物介导的疾病的方法的需要, 例如, 利用通过消化其中包含的核酸来攻击循环免疫复合物的长效核酸酶分子。

发明内容

[0005] 本发明部分地涉及优化的二核酸酶(binuclease)融合蛋白, 其是能够以高核酸酶活性结合多种底物的串联的二核酸酶融合蛋白或异二聚体二核酸酶融合蛋白。在一些方面, 串联的二核酸酶融合蛋白包含与一个或多个Fc结构域可操作地串联连接的一个或多个DNase1和一个或多个RNase1结构域。在一些方面, 异二聚体二核酸酶融合蛋白包含与一个或多个Fc结构域可操作地连接的单个DNase1结构域和单个RNase1结构域, 使得DNase1和RNase1结构域位于Fc结构域的N-或C-末端。在一些方面, 优化的二核酸酶融合蛋白缓和了表达双功能性核酸酶-Fc链的问题并减轻了一个或多个核酸酶结构域的潜在空间位阻。在一些方面, 异二聚体二核酸酶融合蛋白在Fc结构域中包含一个或多个突变以最大化异二聚体的形成。

[0006] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是串联的二核酸酶融合蛋白, 其包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域和Fc区, 其中第一核酸酶结构域是DNase1和第二核酸酶结构域是RNase1, 其中DNase1在有或没有接头的情况下从N-末端到C-末端串联地可操作地连接到RNase1, 并且RNase1可操作地连接到Fc区的N-或C-末端。串联的二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域表现出增强的药代动力学活性。这种串联二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域表现出改变的(例如改善的)血清半衰期。

[0007] 在一些方面, 优化的二核酸酶融合蛋白是异二聚体二核酸酶融合蛋白, 其包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域和Fc区, 其中第一核酸酶结构域是DNase1和第二核酸酶结构域是RNase1, 其中DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接到Fc区的N-或C-末

端,并且RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接到Fc区的N-或C-末端,从而形成异二聚体。异二聚体二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域表现出增强的药代动力学活性。这种异二聚体二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域表现出改变的(例如改善的)血清半衰期。

[0008] 在一些方面,优化的二核酸酶融合蛋白是图1中呈现的那些。

[0009] 在一些方面,本发明提供了优化的二核酸酶融合蛋白,其包含人DNase1、人RNase1和突变体人IgG1 Fc,其中人DNase1通过接头(例如,gly-ser接头)从N-末端至C-末端与人RNase1可操作地连接,并且其中人RNase1通过接头与突变体人IgG1 Fc结构域可操作地连接,其中突变体人IgG1具有突变铰链区(例如,半胱氨酸置换,例如用丝氨酸的置换,例如SCC)和一个或多个CH2突变以降低Fc γ 受体结合(例如,P238S、P331S或P238S和P331S两者,根据EU索引编号)。在一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含通过肽接头(例如,gly-ser接头)与人RNase1可操作地连接的人DNase1(N-末端-DNase1-接头-RNase1-C末端),并且人RNase1通过肽接头(例如,gly-ser接头)与具有突变铰链区、SCC铰链及P238S和P331S突变的突变体人IgG1 Fc结构域可操作地连接。在另一个实施方案中,Fc结构域还包括在N-连接糖基化位点处的突变,例如在N297处的置换(按照Kabat编号)。

[0010] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白还包含第一接头结构域,并且第一核酸酶结构域经由第一接头结构域与第二核酸酶结构域可操作地偶联。

[0011] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白还包含第二接头结构域,并且第二核酸酶结构域经由第二接头结构域与Fc结构域可操作地偶联。

[0012] 在一些实施方案中,RNase结构域是野生型RNase,例如野生型人RNase1。在其他实施方案中,RNase结构域是突变体RNase,例如非糖基化的、低糖基化的或去糖基化的RNase1,例如人RNase1N34S/N76S/N88S (SEQ ID NO:28)。在一些实施方案中,含有RNase的优化的二核酸酶融合蛋白降解循环RNA和免疫复合物中的RNA,或抑制干扰素- α 产生,或两者。在再其他的实施方案中,RNase的活性不低于对照RNase分子的活性约10倍,例如低9倍、低8倍、低7倍、低6倍、低5倍、低4倍、低3倍或低2倍。在再其他实施方案中,RNase的活性约等于对照RNase分子的活性。

[0013] 在一些实施方案中, DNase结构域是野生型DNase,例如野生型人DNase1。在其他实施方案中, DNase结构域是突变体DNase结构域,例如突变体人DNase1 A114F (SEQ ID NO:21)或非糖基化、低糖基化或去糖基化的人DNase,例如突变体人DNase1N18S/N106S/A114F (SEQ ID NO:24)。在一些实施方案中,含有DNase的优化的二核酸酶融合蛋白降解循环DNA和免疫复合物中的DNA,或抑制干扰素- α 的产生,或两者。在再其他的实施方案中, DNase的活性不低于对照DNase分子的活性约10倍,例如低9倍、低8倍、低7倍、低6倍、低5倍、低4倍、低3倍或低2倍。在其他实施方案中, DNase的活性约等于对照DNase分子的活性。

[0014] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白具有将第一和第二核酸酶结构域和/或第二核酸酶结构域与Fc结构域分开的gly-ser接头。

[0015] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白相对于不含Fc结构域的分子具有增加的血清半衰期和/或活性。

[0016] 在一些方面,优化的二核酸酶融合蛋白可包括SEQ ID NO:21中所示的突变体人DNase1 A114F结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包括SEQ ID NO:

24中所示的突变体人DNase1 N18S/N106S/A114F结构域。在一些实施方案中, DNase结构域是突变体人DNase1 E13R/N74K/A114F/T205K (SEQ ID NO:25)。在其他实施方案中, DNase结构域是突变体人DNase1E13R/N74K/A114F/T205K/N18S/N106S (SEQ ID NO:26)。

[0017] 在一些实施方案中, DNase1和RNase1结构域是非糖基化的、低糖基化的或去糖基化的。在一些实施方案中, DNase结构域是突变体DNase结构域, 例如突变体人DNase1和非糖基化的、低糖基化的或去糖基化的DNase结构域, 例如非糖基化的、低糖基化的或去糖基化的人DNase1。在一个实施方案中, 人DNase1包括在一个或多个N-连接糖基化位点处(例如N18和N106)的改变(例如, 置换), 以及选自A114、E13、N74、T205及其组合的至少一个另外的突变。在另一个实施方案中, 人DNase1包括N18、N106或N18和N106两者处的改变(例如, 置换)和A114、E13、N74、T205及其组合处的另外的改变(例如, 置换)。在又一个实施方案中, 人DNase1包括N18、N106、A114、E13、N74和T205处的改变, 如置换, 例如N18S/N106S/A114F/E13R/N74K/T205K (SEQ ID NO:26)。在另一个实施方案中, 具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白包括SEQ ID NO:27中所示的人野生型RNase1结构域。在另一个实施方案中, 具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白包括如SEQ ID NO:28中所示的人突变体RNase1 N34S/N76S/N88S结构域。

[0018] 在一些方面, 本发明提供了优化的二核酸酶融合蛋白, 其包含具有SEQ ID NO:1-17所示氨基酸序列的多肽。在其他方面, 优化的二核酸酶融合蛋白具有与SEQ ID NO:1-17中所示的氨基酸序列至少90%相同或至少95%相同的氨基酸序列。

[0019] 在一些方面, 优化的二核酸酶融合蛋白包含含有第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域和Fc结构域的多肽, 其中第一核酸酶结构域是DNase1, 和第二核酸酶结构域是RNase1, 其中DNase1在有或没有接头的情况下串联地从N-末端到C-末端与RNase1可操作地连接, 并且RNase1在有或没有接头的情况下与Fc区可操作地连接。在一些方面, RNase 1在没有接头的情况下可操作地连接到Fc结构域的N-末端。在一些方面, RNase 1在没有接头的情况下可操作地连接到Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase1通过接头与RNase1可操作地连接。在一些方面, 所述多肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列, 或包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的串联融合蛋白。在一些方面, 串联二核酸酶融合蛋白是包含任何前述多肽的同型二聚体。

[0020] 在一些方面, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域、第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚体, 其中第一核酸酶结构域是DNase1, 和第二核酸酶结构域是RNase1, 其中DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-或C-末端, 并且RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-或C-末端。在前述异二聚体的一些方面, DNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-末端。

[0021] 在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第

二Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端, 并且RNase1在有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端, 并且RNase1在有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-末端。

[0022] 在一些方面, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含选自下组的第一和第二多肽序列的异二聚体:

[0023] (i) 包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的第一多肽, 或包含与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽; 和包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的第二多肽, 或包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽, 或者

[0024] (ii) 包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的第一多肽, 或包含与SEQ ID NO:7所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽; 和包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的第二多肽, 或包含与SEQ ID NO:8所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽, 或者

[0025] (iii) 包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的第一多肽, 或包含与SEQ ID NO:9所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽; 和包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的第二多肽, 或包含与SEQ ID NO:10所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽, 或者

[0026] (iv) 包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的第一多肽, 或包含与SEQ ID NO:11所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽; 和包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的第二多肽, 或包含与SEQ ID NO:12所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽, 或者

[0027] (v) 包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的第一多肽, 或包含与SEQ ID NO:15所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽; 和包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的第二多肽, 或包含与SEQ ID NO:16所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽。

[0028] 其他方面涉及包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域及第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚体, 其中第一核酸酶结构域是DNase1, 和第二核酸酶结构域是RNase1, 其中

[0029] (i) DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端, 或者

[0030] (ii) RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。

[0031] 在前述异二聚体的一些方面中, DNase 1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。在一些方面, DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且RNase1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。在一些方面, RNase 1在没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端, 并且DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。在一些方面, RNase 1在有接头的情况下可操

作地连接至第一Fc结构域的N-末端，并且DNase 1在有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。

[0032] 在一些方面，异二聚体包含选自下组的第一和第二多肽序列：

[0033] (i) 包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的第一多肽，或包含与SEQ ID NO:5所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽；和包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的第二多肽，或包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽，或者

[0034] (ii) 包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的第一多肽，或包含与SEQ ID NO:13所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽；和包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的第二多肽，或包含与SEQ ID NO:14所示氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列的多肽。

[0035] 在一些方面，任何前述异二聚体在Fc结构域中包含一个或多个CH3突变以优先形成异二聚体。在一些方面，异二聚体包含含有根据EU索引编号的CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V的第一Fc结构域，以及含有CH3突变T350V、T366L、K392L、T394W的第二Fc结构域。

[0036] 本公开的其他方面涉及包含任何前述异二聚体和药学上可接受的载体的组合物。还公开了编码前述异二聚体的核酸分子、重组表达载体和用该重组表达载体转化的宿主细胞，以及制备上述异二聚体的方法。

[0037] 本文还公开了制备本文公开的串联的优化二核酸酶融合蛋白的方法，包括提供包含编码优化的二核酸酶融合蛋白的核酸序列的宿主细胞；和将宿主细胞维持在优化的二核酸酶融合蛋白被表达的条件下。

[0038] 本文还公开了通过向需要的患者施用有效量的本文公开的优化二核酸酶融合蛋白来治疗或预防与异常免疫应答相关的病症的方法。在一些实施方案中，所述病症是自身免疫疾病。在一些实施方案中，自身免疫疾病选自胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、类风湿性关节炎、实验性自身免疫性关节炎、重症肌无力、甲状腺炎、实验形式的葡萄膜炎、桥本氏甲状腺炎、原发性粘液性水肿、甲状腺毒症、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、IgG4相关疾病、艾迪生病、过早绝经、男性不育、青少年糖尿病、Goodpasture综合征、寻常型天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、晶状体源性葡萄膜炎、自身免疫性溶血性贫血、特发性白细胞减少症、原发性胆汁性肝硬化、活动性慢性肝炎Hbs-ve、隐源性肝硬化、溃疡性结肠炎、干燥综合征、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、多肌炎、皮肌炎、盘状LE、系统性红斑狼疮(SLE)和结缔组织病。在一些实施方案中，自身免疫疾病是SLE或干燥综合征。

[0039] 本文还公开了一种治疗SLE或干燥综合征的方法，包括向受试者施用有效地降解含有RNA、DNA或RNA和DNA两者的免疫复合物的量的包含优化二核酸酶融合蛋白的组合物。在一些方面，组合物包含药学上可接受的载体和如本文所述的优化的二核酸酶融合蛋白。在其他方面，组合物包括具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的优化的二核酸酶融合蛋白。

[0040] 另一方面，本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白，其用于治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病，例如SLE。在一些实施方案中，优化的二核酸酶融合蛋白包含SEQ ID NO:4和5中所示的氨基酸序列。

[0041] 另一方面，本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白用于制备药物的用途，所述药物用于治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病，例如SLE。在一些实施

方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列。

[0042] 另一方面,本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病,例如SLE。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含SEQ ID NO:7和8中所示的氨基酸序列。

[0043] 另一方面,本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病,例如SLE。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含SEQ ID NO:13和14中所示的氨基酸序列。

[0044] 另一方面,本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病,例如SLE。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含SEQ ID NO:15和16中所示的氨基酸序列。

附图说明

[0045] 参考以下描述和附图,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,其中:

[0046] 图1是示例性的优化的二核酸酶融合蛋白的描述。

[0047] 图2是显示通过OD260测量的RNase活性的曲线图。

[0048] 图3显示通过OD₆₂₀ (左) 和IC₅₀ (右) 测量的DNase活性。

具体实施方式

[0049] 系统性红斑狼疮(SLE)是一种多系统自身免疫疾病,其特征在于存在针对自身核蛋白的高滴度自身抗体。有强有力的证据表明,SLE中死亡和垂死细胞的清除或处理的缺陷导致疾病,主要是通过核糖核蛋白和脱氧核糖核蛋白(缩写核蛋白)的积聚。核蛋白通过三种机制引起损伤:i)激活先天免疫系统以产生炎性细胞因子;ii)用作抗原以产生循环免疫复合物;和iii)用作抗原以在诸如肾的局部部位处产生原位复合物形成。

[0050] 本发明提供了通过施用有效量的长效核酸酶活性以降解细胞外含RNA和DNA免疫复合物来治疗以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理缺陷为特征的疾病(例如SLE和干燥综合征)的方法。这种治疗可以抑制I型干扰素(IFN)的产生,其是SLE中的重要细胞因子并且与疾病活动性和肾炎强烈相关。

[0051] 本发明部分地涉及提供这种长效核酸酶。特别地,本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白,例如包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域和Fc区的串联二核酸酶融合蛋白,其中第一核酸酶结构域是DNase1,和第二核酸酶结构域是RNase1,其中DNase1在有或没有接头的情况下串联地从N-末端至C-末端与RNase1可操作地连接,并且RNase1可操作地连接到Fc区的N-末端或C-末端。

[0052] 在其他实施方案中,本发明涉及优化的二核酸酶融合蛋白,例如包含第一核酸酶结构域、第二核酸酶结构域和Fc区的异二聚体二核酸酶融合蛋白,其中第一核酸酶结构域是DNase1,和第二核酸酶结构域是RNase1,其中DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至Fc区的N-或C-末端,并且RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至Fc区的N-或C-末端,从而形成异二聚体。

[0053] 在一些方面,优化的二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域表

现出增强的药代动力学活性。这种优化的二核酸酶融合蛋白相对于单独的第一或第二核酸酶结构域显示出改变的(例如,改善的)血清半衰期。

[0054] 在一些方面,本发明提供了优化的二核酸酶融合蛋白,其包含人DNase1、人RNase1和突变体人IgG1 Fc,其中人DNase1从N-末端至C末端通过接头(例如,gly-ser接头)与人RNase1可操作地连接,并且其中人RNase1通过接头与突变体人IgG1 Fc结构域可操作地连接,其中突变体人IgG1具有突变的铰链区(例如,半胱氨酸置换,例如用丝氨酸的置换,例如SCC)和一个或多个CH2突变以降低Fc γ 受体结合(例如,P238S、P331S或P238S和P331S两者,根据EU索引编号)。在一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含通过肽接头(例如,gly-ser接头)与人RNase1可操作地连接的人DNase1(N-末端-DNase1-接头-RNase1-C末端),并且人RNase1通过肽接头(例如,gly-ser接头)与具有突变铰链区、SCC铰链及P238S和P331S突变的突变体人IgG1 Fc结构域可操作地连接。

[0055] 因此,在一个实施方案中,通过施用优化的二核酸酶融合蛋白(其包括DNase1和RNase1两者)来治疗患有以凋亡细胞和细胞碎片的清除或处理的缺陷为特征的疾病的受试者,使得优化的二核酸酶融合蛋白相对于非缀合核酸酶结构域具有增加的生物利用度和/或血清半衰期。

[0056] 定义

[0057] 除非另有说明,否则权利要求书和说明书中使用的术语定义如下。

[0058] “氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砜、蛋氨酸甲基锍。此类类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

[0059] 氨基酸在本文中可以通过它们通常已知的三字母符号或通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号指代。同样,核苷酸可以通过它们通常接受的单字母代码来指代。

[0060] “氨基酸置换”是指用第二个不同的“替代”氨基酸残基替代预定的氨基酸序列(起始多肽的氨基酸序列)中的至少一个现有氨基酸残基。“氨基酸插入”是指将至少一个另外的氨基酸并入预定的氨基酸序列中。虽然插入通常由一个或两个氨基酸残基的插入构成,但可以形成较大的“肽插入”,例如,约3至约5个或甚至多达约10、15或20个氨基酸残基的插入。插入的残基可以是天然存在的或非天然存在的,如上所述。“氨基酸缺失”是指从预定的氨基酸序列中除去至少一个氨基酸残基。

[0061] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0062] “核酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其单链或双链形式的聚合物。除非特别限定,该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合

特性并以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有说明,特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子置换)和互补序列,以及明确指出的序列。具体地,简并密码子置换可以通过产生其中一个或多个选定的(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res 1991;19:5081;Ohtsuka等,JBC 1985;260:2605-8);Rossolini等,Mol Cell Probes 1994;8:91-8)。对于精氨酸和亮氨酸,第二碱基处的修饰也可以是保守的。术语核酸可与基因、cDNA和基因编码的mRNA互换使用。

[0063] 本发明的多核苷酸可以由任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸组成,其可以是未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。例如,多核苷酸可以由单链和双链DNA、作为单链和双链区域的混合物的DNA、单链和双链RNA以及作为单链和双链区域的混合物的RNA、包含可以是单链的或更通常是双链的或者单链和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子组成。另外,多核苷酸可以由包含RNA或DNA或者RNA和DNA两者的三链区域组成。多核苷酸还可而含有一个或多个修饰的碱基或者为稳定性或其他原因而修饰的DNA或RNA骨架。“修饰的”碱基包括,例如,三苯甲基化的碱基和不常见的碱基,例如肌苷。可以对DNA和RNA进行各种修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶促或代谢地修饰的形式。

[0064] 如本文所用,术语“可操作地连接”或“可操作地偶联”是指其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并置。

[0065] 如本文所用,术语“糖基化”或“糖基化的”是指将糖部分添加至分子(例如,优化的二核酸酶融合蛋白)的过程或结果。

[0066] 如本文所用,术语“改变的糖基化”是指非糖基化、去糖基化或低糖基化的分子。

[0067] 如本文所用,“糖基化位点”是指潜在地可能接受碳水化合物部分的位点以及蛋白质内其上实际上已连接碳水化合物部分的位点,并且包括可以充当寡糖和/或碳水化合物的受体的任何氨基酸序列。

[0068] 如本文所用,术语“非糖基化”或“非糖基化的”是指以未糖基化形式产生分子(例如,优化的二核酸酶融合蛋白)(例如,通过优化的二核酸酶融合蛋白的工程化以缺乏用作糖基化的受体的氨基酸残基)。或者,优化的二核酸酶融合蛋白可以在例如大肠杆菌中表达,以产生非糖基化的优化二核酸酶融合蛋白。

[0069] 如本文所用,术语“去糖基化”或“去糖基化的”是指酶促除去分子上糖部分的过程或结果。

[0070] 如本文所用,术语“低糖基化”或“低糖基化的”是指其中如果在哺乳动物细胞中产生则通常存在的一种或多种碳水化合物结构已被省略、去除、改变或掩蔽的分子。

[0071] 如本文所用,术语“Fc区”和“Fc结构域”是由其两条重链的相应Fc结构域(或Fc部分)形成而没有结合抗原的可变区的天然免疫球蛋白的部分。在一些实施方案中,Fc结构域在紧邻木瓜蛋白酶切割位点上游的铰链区中开始并终止于抗体的C末端。因此,完整的Fc结构域至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方案中,Fc结构域包含以下中的至少一个:铰链(例如,上、中间和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域或者其变体、部分或片段。在其他实施方案中,Fc结构域包含完整的Fc结构域(即,铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域)。在一个实施方案中,Fc结构域包含与CH3结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)。在另一个实施方案中,Fc结构域包含与CH3结构域(或其

部分)融合的CH2结构域(或其部分)。在另一个实施方案中,Fc结构域由CH3结构域或其部分组成。在另一个实施方案中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)组成。在另一个实施方案中,Fc结构域由CH2结构域(或其部分)和CH3结构域组成。在另一个实施方案中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH2结构域(或其部分)组成。在一个实施方案中,Fc结构域缺少CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。在一个实施方案中,本发明的Fc结构域包含至少本领域已知为FcRn结合所需的Fc分子的部分。在一个实施方案中,本发明的Fc结构域包含至少本领域已知为蛋白A结合所需的Fc分子的部分。在一个实施方案中,本发明的Fc结构域包含至少本领域已知为蛋白G结合所需的Fc分子的部分。本文的Fc结构域通常是指包含免疫球蛋白重链的Fc结构域的全部或部分的多肽。这包括但不限于包含完整CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域的多肽以及仅包含例如铰链、CH2和CH3结构域的此类肽的片段。Fc结构域可以源自任何物种和/或任何亚型(包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体)的免疫球蛋白。Fc结构域包括天然Fc和Fc变体分子。与Fc变体和天然Fc一样,术语Fc结构域包括单体或多聚体形式的分子,无论是从完整抗体消化还是通过其他方式产生。

[0072] 如本文所述,本领域普通技术人员将理解,可以修饰任何Fc结构域以使得其氨基酸序列从天然存在的免疫球蛋白分子的天然Fc结构域发生改变。

[0073] 本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的Fc结构域可以源自不同的免疫球蛋白分子。例如,优化的二核酸酶融合蛋白的Fc结构域可包含源自IgG1分子的CH2和/或CH3结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可包含部分地源自IgG1分子和部分地源自IgG3分子的嵌合铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可包含部分地源自IgG1分子并部分地源自IgG4分子的嵌合铰链。野生型人IgG1Fc结构域具有SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列。

[0074] 如本文所用,术语“血清半衰期”是指优化的二核酸酶融合蛋白的体内血清浓度下降50%所需的时间。优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期越短,其发挥治疗效果的时间越短。

[0075] 如本文所用,术语“优化的二核酸酶融合蛋白”是指包含在具有或不具有接头的情况下与Fc结构域或其变体或片段可操作地连接的至少两个核酸酶结构域的多肽,以及编码这些多肽的核酸。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是串联二核酸酶融合蛋白,例如串联连接至一个或多个Fc结构域的N-或C-末端的一个或多个DNase1结构域和一个或多个RNase 1结构域。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是异二聚体二核酸酶融合蛋白。

[0076] 如本文所用,术语“串联二核酸酶融合蛋白”是指包含串联连接(从N-末端到C-末端)的至少两个核酸酶结构域和Fc结构域或其变体或片段的多肽,和编码这种多肽的核酸。例如,在一个实施方案中,串联二核酸酶融合蛋白是包含串联地与至少一个Fc结构域可操作地连接的至少一个DNase1结构域和至少一个RNase1结构域的多肽。作为另一个实例,串联二核酸酶融合蛋白从N-末端到C-末端包括DNase1结构域、第一接头、RNase1结构域、第二接头和Fc结构域或其变体或片段。

[0077] 如本文所用,术语“异二聚体二核酸酶融合蛋白”是指包含第一和第二多肽(其一起包含至少两个核酸酶结构域和两个Fc结构域、其变体或片段)的异二聚体,以及编码这些

多肽的核酸。在一些实施方案中,异二聚体二核酸酶融合蛋白是包含与至少一个Fc结构域可操作地连接的至少一个DNase1结构域和至少一个RNase1结构域的异二聚体,其中DNase1结构域在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-或C-末端,和RNase1结构域在有或没有接头的情况下可操作地连接至相同Fc结构域(第一Fc结构域)或不同Fc结构域(第二Fc结构域)的N-或C-末端,使得DNase1结构域和RNase1结构域位于相同Fc结构域(第一Fc结构域)或不同Fc结构域(第二Fc结构域)的相对端(N-或C-末端)上。在一些实施方案中,异二聚体包含在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-或C-末端的DNase1结构域,和在有或没有接头的情况下可操作地连接至第二Fc结构域的N-或C-连接的RNase1,使得DNase1和RNase1结构域串联地位于异二聚体的相同端(N-或C-末端)。在一些实施方案中,异二聚体包含在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N末端的DNase1结构域,和在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端的RNase1。在一些实施方案中,RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的N-末端,和DNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至第一Fc结构域的C-末端。

[0078] 如本文所用,术语“变体”是指衍生自野生型核酸酶或Fc结构域并且与野生型不同在于一个或多个位置处的一种或多种改变(即,置换、插入和/或缺失)的多肽。置换是指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸。缺失意味着去除占据某一位置的氨基酸。插入意味着紧邻占据某一位置的氨基酸添加1个或多个,例如1-3个氨基酸。变体多肽必然与野生型多肽具有小于100%的序列同一性或相似性。在一些实施方案中,变体多肽例如在变体多肽的整个长度上将具有与野生型多肽的氨基酸序列约75%至小于100%的氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列,或约80%至小于100%,或约85%至小于100%,或约90%至小于100%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)或大约95%至小于100%。

[0079] 在某些方面,优化的二核酸酶融合蛋白采用一个或多个“接头结构域”,例如多肽接头。如本文所用,术语“接头结构域”是指连接线性多肽序列中的两个或更多个肽结构域的一个或多个氨基酸。如本文所用,术语“多肽接头”是指连接蛋白质的线性氨基酸序列中的两个或更多个多肽结构域肽或多肽序列(例如,合成肽或多肽序列)。例如,多肽接头可用于将第一和第二核酸酶结构域彼此可操作地连接,或将第一或第二核酸酶结构域与Fc结构域可操作地连接。在一些实施方案中,此类多肽接头为多肽分子提供灵活性。在一些实施方案中,多肽接头用于将DNase1与RNase1和/或将RNase1与Fc结构域连接(例如,遗传融合)。优化的二核酸酶融合蛋白可包括一个以上的接头结构域或肽接头。各种肽接头在本领域中是已知的。

[0080] 如本文所用,术语“gly-ser多肽接头”是指由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性的gly-ser多肽接头包含氨基酸序列(Gly₄Ser)_n(SEQ ID N0:58)。在一些实施方案中,n为1或更多,例如2或更多,3或更多,4或更多,5或更多,6或更多,7或更多,8或更多,9或更多,或者10或更多(例如,(Gly₄Ser)10)(SEQ ID N0:59)。另一种示例性的gly-ser多肽接头包含氨基酸序列Ser(Gly₄Ser)_n(SEQ ID N0:60)。在一些实施方案中,n为1或更多,例如2或更多,3或更多,4或更多,5或更多,6或更多,7或更多,8或更多,9或更多,或者10或更多(例如,Ser(Gly₄Ser)10)(SEQ ID N0:61)。

[0081] 如本文所用,术语“偶联的”、“连接的”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组方式的无论任何方式将两个或更多元件或组分或结构域连接在一起。化学缀合的方法(例如,使用异双功能交联剂)是本领域已知的。

[0082] “源自”指定多肽或蛋白质的多肽或氨基酸序列是指多肽的来源。优选地,源自特定序列的多肽或氨基酸序列具有与该序列或其部分基本相同的氨基酸序列(其中该部分由至少10-20个氨基酸,优选至少20-30个氨基酸,更优选至少30-50个氨基酸组成),或者其对于本领域普通技术人员而言可另外识别为具有其序列起源。源自另一肽的多肽相对于起始多肽可以具有一个或多个突变,例如,已被另一个氨基酸残基置换或具有一个或多个氨基酸残基插入或缺失的一个或多个氨基酸残基。

[0083] 在一个实施方案中,起始多肽序列与由其衍生的序列之间存在一个氨基酸差异。关于该序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列和引入空位(如果需要)以实现最大百分序列同一性之后,候选序列中与起始氨基酸残基相同的氨基酸残基(即,相同残基)的百分比。

[0084] 在一个实施方案中,本公开的多肽由本文公开的序列表或序列表格中列出的氨基酸序列及其功能活性变体组成、基本上由其组成或包含该氨基酸序列及其功能活性变体。在一个实施方案中,多肽包含与本文公开的序列表或序列表格中列出的氨基酸序列至少80%,例如至少81%,至少82%,至少83%,至少84%,至少85%,至少86%,至少87%,至少88%,至少89%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽包含与本文公开的序列表或序列表格中列出的连续氨基酸序列至少80%,例如至少81%,至少82%,至少83%,至少84%,至少85%,至少86%,至少87%,至少88%,至少89%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%相同的连续氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽包含具有本文公开的序列表或序列表格中列出的氨基酸序列的至少10,例如至少15,至少20,至少25,至少30,至少35,至少40,至少45,至少50,至少55,至少60,至少65,至少70,至少75,至少80,至少85,至少90,至少95,至少100,至少200,至少300,至少400或至少500(或这些数字内的任何整数)个连续氨基酸的氨基酸序列。

[0085] 在一些实施方案中,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白由核苷酸序列编码。本公开的核苷酸序列可用于许多应用,包括:克隆、基因治疗、蛋白质表达和纯化、突变引入、需要的宿主的DNA疫苗接种、用于例如被动免疫的抗体产生、PCR、引物和探针生成、siRNA设计和产生(参见例如Dharmacon siDesign网站)等。在一些实施方案中,本公开的核苷酸序列包含编码选自序列表格或序列表的优化的二核酸酶融合蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列、由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,核苷酸序列包括与编码本文公开的序列表或序列表格的氨基酸序列的核苷酸序列至少80%,例如至少81%,至少82%,至少83%,至少84%,至少85%,至少86%,至少87%,至少88%,至少89%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,核苷酸序列包括与编码本文公开的序列表或序列表格中列出的氨基酸序列的连续核苷酸序列至少80%,例如至少81%,至少82%,至少83%,至少84%,至少85%,至少86%,至少87%,至少88%,至少89%,至少90%,至少91%,

至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%或至少99%相同的连续核苷酸序列。在一些实施方案中，核苷酸序列包括具有编码本文公开的序列表或序列表格中列出的氨基酸序列的核苷酸序列的至少10个，例如至少15个，例如至少20个，至少25个，至少30个，至少35个，至少40个，至少45个，至少50个，至少55个，至少60个，至少65个，至少70个，至少75个，至少80个，至少85个，至少90个，至少95个，至少100个，至少200个，至少300个，至少400个或至少500个(或这些数字内的任何整数)连续核苷酸的核苷酸序列。

[0086] 本领域普通技术人员还将理解，可以改变优化的二核酸酶融合蛋白使得它们在序列上从其组分(例如，核酸酶结构域、接头结构域和Fc结构域)所来源的天然存在或天然序列发生变化，而同时保留天然序列的所需活性。例如，可以进行导致“非必需”氨基酸残基处的保守置换或改变的核苷酸或氨基酸置换。编码非天然变体的分离的核酸分子可以通过将一个或多个核苷酸置换、添加或缺失引入优化的二核酸酶融合蛋白的核苷酸序列中来产生，使得引入一个或多个氨基酸置换、添加或缺失到编码的蛋白质中。可以通过标准技术引入突变，例如定点诱变和PCR介导的诱变。

[0087] 优化的二核酸酶融合蛋白可以在一个或多个氨基酸残基处，例如在必需或非必需氨基酸残基处包含保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族，包括碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，优化的二核酸酶融合蛋白中的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代。在另一个实施方案中，一串氨基酸可以用在顺序和/或侧链家族成员的组成上不同的结构相似的串替代。或者，在另一个实施方案中，可以沿着编码序列的全部或部分随机地引入突变，例如通过饱和诱变，并且可以将得到的突变体并入优化的二核酸酶融合蛋白中和针对它们与所需靶标结合的能力进行筛选。

[0088] 术语“改善”是指治疗疾病状态，例如自身免疫疾病状态(例如，SLE、干燥综合征)的治疗中的任何有益的结果，包括其预防、严重性或进展的减轻、消退或治愈。

[0089] 术语“原位”是指在从活生物体分离的生长(例如在组织培养中生长)的活细胞中发生的过程。

[0090] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0091] 本文所用的术语“哺乳动物”或“受试者”或“患者”包括人和非人两者，且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、牛科动物、马类和猪类。

[0092] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下，术语百分“同一性”是指当为最大对应而进行比较和比对(如使用下面描述的序列比较算法之一时，两个或更多个序列或子序列具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基(例如，BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查测量的)。取决于应用，百分“同一性”可以存在于待比较的序列的区域上，例如，在功能域上，或者，存在于待比较的两个序列的全长上。

[0093] 对于序列比较，通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时，将测试和参考序列输入计算机中，指定子序列坐标(如果需要)，并指定序列算

法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分序列同一性。

[0094] 用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman, Adv Appl Math 1981;2:482的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch, J Mol Biol 1970;48:443的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman, PNAS1988;85:2444的相似性检索方法,通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过目视检查(一般地参见Ausubel等人,下文)进行。

[0095] 适用于确定百分序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于Altschul等, J Mol Biol 1990;215:403-10中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心网站公开获得。

[0096] 术语“足够量”是指足以产生所需效果的量。

[0097] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为预防可以被认为是疗法。

[0098] 术语“约”将由普通技术人员理解,并且根据其使用的背景在某种程度上改变。如果在给定其使用的背景时该术语的使用对于普通技术人员是不清楚的,则“约”将意味着达到特定值的正负10%。

[0099] 必须注意,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。

[0100] 优化的二核酸酶融合蛋白

[0101] 本发明的优化的二核酸酶融合蛋白包括Fc结构域或者其变体或片段,其与未与Fc结构域或者其变体或片段融合的核酸酶分子相比,该Fc结构域或者其变体或片段改变与其融合的核酸酶分子的血清半衰期。

[0102] 在一些实施方案中,本公开的组合物包括优化的二核酸酶融合蛋白。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括可操作地与Fc结构域或者其变体或片段偶联的核酸酶结构域。

[0103] 在一些实施方案中,核酸酶结构域经由接头结构域可操作地偶联至Fc结构域或者其变体或片段。在一些实施方案中,接头结构域是接头肽。在一些实施方案中,接头结构域是接头核苷酸。

[0104] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括前导分子,例如前导肽。在一些实施方案中,前导分子是位于核酸酶结构域的N-末端的前导肽。在一些实施方案中,本发明的优化的二核酸酶融合蛋白在分子的N-末端包含前导肽,其中前导肽随后从优化的二核酸酶融合蛋白切割。产生编码与重组蛋白融合的前导肽的核酸序列的方法是本领域熟知的。在一些实施方案中,本发明的任何优化的二核酸酶融合蛋白可以在有或没有与其N-末端融合的前导肽的情况下表达。本领域技术人员可以预测和/或推断本公开的优化的二核酸酶融合蛋白在融合的前导肽切割后的蛋白质序列。

[0105] 在一些实施方案中,前导肽是VK3前导肽(VK3LP),其中前导肽与优化的二核酸酶融合蛋白的N-末端融合。这种前导序列可以改善哺乳动物细胞中优化的二核酸酶融合蛋白的合成和分泌水平。在一些实施方案中,前导序列被切割,从而产生优化的二核酸酶融合蛋白。

白。在一些实施方案中,表达本发明的优化的二核酸酶融合蛋白而没有与其N-末端融合的前导肽,并且所得的优化的二核酸酶融合蛋白具有N-末端甲硫氨酸。

[0106] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括两个核酸酶结构域,其串联地彼此可操作地偶联并且还可操作地偶联至相同或不同Fc结构域或者其变体或片段的N-或C-末端。

[0107] 图1显示了优化的二核酸酶融合蛋白的示例性构型,并且序列表格提供了各种构型的示例性优化的二核酸酶融合蛋白的序列。

[0108] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是与相同或不同Fc结构域或者其变体或片段融合的多-核酸酶蛋白(例如,RNase和DNase两者或者具有不同的底物特异性的两种RNA或DNA核酸酶),其特异性结合细胞外免疫复合物。

[0109] 在一个实施方案中,核酸酶结构域可操作地偶联(例如,化学缀合或遗传融合(例如,直接地或通过多肽接头))至Fc结构域或者其变体或片段的N-末端。在另一个实施方案中,核酸酶结构域可操作地偶联(例如,化学缀合或遗传融合(例如,直接地或通过多肽接头))至Fc结构域或者其变体或片段的C-末端。在其他实施方案中,核酸酶结构域经由Fc结构域或者其变体或片段的氨基酸侧链可操作地偶联(例如,化学缀合或遗传融合(例如,直接地或经由多肽接头))。

[0110] 在某些实施方案中,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白包含两个或更多个核酸酶结构域和至少一个Fc结构域或者其变体或片段。例如,核酸酶结构域可以可操作地偶联至相同或不同Fc结构域或者其变体或片段的N-末端和C-末端两者,具有在核酸酶结构域和Fc结构域、其变体或片段之间的任选接头。在一些实施方案中,核酸酶结构域是相同的,例如RNase和RNase,或DNase1和DNase1。在其他实施方案中,核酸酶结构域是不同的,例如DNase和RNase。

[0111] 在一些实施方案中,两个或更多个核酸酶结构域彼此串联地可操作地偶联(例如,通过多肽接头),并且核酸酶结构域的串联阵列可操作地偶联(例如,化学缀合或遗传融合(例如,直接地或通过多肽接头))至相同或不同Fc结构域或者其变体或片段的C-末端或N-末端。在其他实施方案中,核酸酶结构域的串联阵列可操作地偶联至相同Fc结构域或者其变体或片段的N-末端和C-末端两者。在一些实施方案中,核酸酶结构域在有或没有接头的情况下串联地可操作地连接(例如,N-DNase-RNase-C或N-RNase-DNase-C)至相同或不同Fc结构域的N-或C-末端。在一些实施方案中,串联二核酸酶融合蛋白形成同二聚体或异二聚体。

[0112] 在其他实施方案中,可以将一个或多个核酸酶结构域插入在两个Fc结构域或者其变体或片段之间。例如,一个或多个核酸酶结构域可以形成本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的多肽接头的全部或部分。

[0113] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含至少两个核酸酶结构域(例如,RNase和DNase)、至少一个接头结构域和至少一个Fc结构域或者其变体或片段。

[0114] 在一些实施方案中,如上所述的,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白包含Fc结构域或者其变体或片段,从而增加优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期和生物利用度。

[0115] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含一种或多种多肽,例如包含SEQ ID NO:1-17中任一所示的氨基酸序列的多肽。

[0116] 本领域技术人员将理解,核酸酶结构域和Fc结构域的其他构型是可能的,在核酸酶结构域之间和/或核酸酶结构域与Fc结构域之间包括任选的接头。还应理解,可以改变结构域取向,只要核酸酶结构域在所测试的特定构型中是活性的。

[0117] 在某些实施方案中,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白具有至少一个对介导生物学效应的靶分子特异性的核酸酶结构域。在另一个实施方案中,本发明的优化的二核酸酶融合蛋白与靶分子(例如,DNA或RNA)的结合导致靶分子从例如细胞、组织或从循环的减少或消除。

[0118] 在其他实施方案中,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白可以组装在一起或与其他多肽组装以形成具有两种或更多种多肽的结合蛋白(“多聚体”),其中多聚体的至少一种多肽是本发明的优化的二核酸酶融合蛋白。示例性的多聚体形式包括二聚体、三聚体、四聚体和六聚体的改变的结合蛋白等。在一个实施方案中,多聚体的多肽是相同的(即,同聚的改变的结合蛋白,例如同型二聚体、同型四聚体)。在另一个实施方案中,多聚体的多肽是不同的(例如,异聚的)。

[0119] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期相对于未与Fc结构域或者其变体或片段融合的相应核酸酶分子增加至少约1.5倍,例如至少3倍,至少5倍,至少10倍,至少约20倍,至少约50倍,至少约100倍,至少约200倍,至少约300倍,至少约400倍,至少约500倍,至少约600倍,至少约700倍,至少约800倍,至少约900倍,至少约1000倍,或者1000倍或更多。在其他实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期相对于未与Fc结构域或者其变体或片段融合的相应核酸酶分子降低至少约1.5倍,例如至少3倍,至少5倍,至少10倍,至少约20倍,至少约50倍,至少约100倍,至少约200倍,至少约300倍,至少约400倍,至少约500倍,或者500倍或更低。常规的本领域公认的方法可用于确定本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期。

[0120] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白中RNase的活性不低于对照RNase分子的活性的约10倍,例如低9倍,低8倍,低7倍,低6倍,低5倍,低4倍,低3倍或低2倍。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白中RNase的活性约等于对照RNase分子的活性。

[0121] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白中DNase的活性不低于对照DNase分子的活性的约10倍,例如低9倍,低8倍,低7倍,低6倍,低5倍,低4倍,低3倍或低2倍。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白中DNase的活性约等于对照DNase分子的活性。

[0122] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可以对于含有DNA和/或RNA的细胞外免疫复合物(例如,以可溶形式或作为不溶性复合物沉积的)具有活性。

[0123] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的活性可在体外和/或体内检测。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白结合细胞、恶性细胞或癌细胞并干扰其生物学活性。

[0124] 在另一个方面,提供了多功能的RNase或DNase分子,其与具有结合特异性的另一种酶或抗体(例如靶向RNA或DNA的scFv)或具有与第一结构域相同或不同特异性的第二核酸酶结构域连接。

[0125] 在一些实施方案中,接头结构域包括(gly4ser)3、4或5变体,其按照5个氨基酸的增量改变接头的长度。在另一个实施方案中,接头结构域长度为约18个氨基酸并且包括N-连接的糖基化位点,其可能对体内蛋白酶切割敏感。在一些实施方案中,N-连接的糖基化位

点可以保护优化的二核酸酶融合蛋白免于接头结构域中的切割。在一些实施方案中, N-连接的糖基化位点可以帮助分离由接头结构域分开的独立功能结构域的折叠。

[0126] 在一些实施方案中,接头结构域是NLG接头 (VDGASSPVNVSSPSVQDI) (SEQ ID NO: 41)。

[0127] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括DNase的基本上全部或至少酶活性片段。在一些实施方案中, DNase是I型分泌DNase, 优选人DNase, 例如成熟的人胰腺DNase 1 (UniProtKB登录号P24855, SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,天然存在的变体等位基因A114F (SEQ ID NO:21) (其显示对肌动蛋白的降低的敏感性) 包括在DNase1优化的二核酸酶融合蛋白中 (参见Pan等, JBC 1998; 273:18374-81; Zhen等, BBRC 1997; 231:499-504; Rodriguez等, Genomics 1997; 42:507-13)。在其他实施方案中,天然存在的变体等位基因G105R (SEQ ID NO:22) (其相对于野生型DNase1表现出高DNase活性) 包括在DNase1优化的二核酸酶融合蛋白中 (参见Yasuda等, Int J Biochem Cell Biol 2010; 42:1216-25)。在一些实施方案中,将该突变引入优化的二核酸酶融合蛋白中以产生人DNase1的更稳定的衍生物。在一些实施方案中, DNase是人野生型DNase1或经突变以去除所有潜在的N-连接糖基化位点 (即SEQ ID NO:20中所示的DNase1结构域的18和106位的天冬酰胺残基, 其分别对应于具有天然前导序列的全长胰腺DNase1 (SEQ ID NO:23) 的第40和128位的天冬酰胺残基) 的人DNase1 A114F (即, 人DNase1N18S/N106S/A114F, SEQ ID NO:24)。

[0128] 在一些实施方案中, DNase是人DNase1, 其包含一个或多个碱性 (即带正电荷的) 氨基酸置换以增加DNase功能性和染色质切割。在一些实施方案中, 碱性氨基酸在DNA结合界面处被引入人DNase1中以增强与DNA底物上的带负电荷的磷酸酯的结合 (参见US 7407785; US 6391607)。这种过度活性的DNase1可称为“染色质切割器(chromatin cutter)”。

[0129] 在一些实施方案中, 将1、2、3、4、5或6个碱性氨基酸置换引入DNase1中。例如, 以下一个或多个残基被突变以增强DNA结合: Gln9、Glu13、Thr14、His44、Asn74、Asn110、Thr205。在一些实施方案中, 一个或多个前述氨基酸被碱性氨基酸如精氨酸、赖氨酸和/或组氨酸置换。例如, 突变体人DNase可包括一个或多个以下置换: Q9R、E13R、T14K、H44K、N74K、N110R、T205K。在一些实施方案中, 突变体人DNase1还包括A114F置换, 其降低对肌动蛋白的敏感性 (参见US 6348343)。在一个实施方案中, 突变体人DNase1包括以下置换: E13R、N74K、A114F和T205K。

[0130] 在一些实施方案中, 突变体人DNase1还包括突变以去除潜在的糖基化位点, 例如SEQ ID NO:20中所示的DNase1结构域的18和106位的天冬酰胺残基, 其分别对应于具有天然前导序列的全长胰腺DNase1的40和128位的天冬酰胺残基。在一个实施方案中, 突变体人DNase1包括以下置换: E13R/N74K/A114F/T205K/N18S/N106S。

[0131] 在一些实施方案中, DNase是DNase 1样 (DNaseL) 酶, 1-3 (UniProtKB登录号Q13609; SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中, DNase是3启动修复外切核酸酶1 (TREX1; UniProtKB登录号Q9NSU2; SEQ ID NO:47)。在一些实施方案中, DNase是DNase2。在一些实施方案中, DNase2是DNase2 α (即DNase2; UnitProtKB登录号000115; SEQ ID NO:48) 或DNase2 β (即DNase2样酸性DNase; UnitProtKB登录号Q8WZ79; SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中, DNase1L3、TREX1、DNase2 α 或DNase2 β 的N-连接糖基化位点被突变以除去潜在的N-连接糖基化位点。在一些实施方案中, 制备含有20或25aa接头结构域的DNase-接头-Fc结构域。

[0132] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括RNase1,优选RNase A家族的人胰腺RNase1 (UniProtKB登录号P07998; SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,人RNase1被突变以去除所有潜在的N-连接糖基化位点,即SEQ ID NO:27中所示的RNase1结构域的34、76和88位的天冬酰胺残基(人RNase1 N34S/N76S/N88S,SEQ ID NO:28),其分别对应于具有天然前导序列的全长胰腺RNase1 (SEQ ID NO:29) 的62、104和116位的天冬酰胺残基。在一些实施方案中,制备含有20或25aa的接头结构域的RNase1-接头-Fc。

[0133] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括DNase-接头-RNase-Fc,其中RNase1结构域位于Fc的COOH侧。在其他实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括DNase-接头-RNase-Fc,其中RNase1结构域位于Fc的NH₂侧。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括:DNase-Fc和RNase-Fc;DNase1-Fc-接头-RNase和Fc结构域;DNase1-Fc和Fc-接头-RNase;Fc-接头-DNase1和Fc-接头-RNase;RNase-Fc-接头-DNase和Fc结构域;Fc-接头-DNase和RNase-Fc;及RNase-Fc-接头-DNase。

[0134] 在一些实施方案中,酶结构域与优化的二核酸酶融合蛋白的其他结构域之间的融合接合部被优化。

[0135] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的RNase酶活性的靶标主要是细胞外的,由例如包含在具有抗RNP自身抗体的免疫复合物中的RNA和在经历凋亡的细胞表面上表达的RNA组成。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白在内吞囊泡的酸性环境中具有活性。在一些实施方案中,包含Fc结构域或其变体或片段的优化的二核酸酶融合蛋白适应于在细胞外和内吞环境中具有活性。在一些方面,这允许包括野生型Fc结构域或其变体或片段的优化二核酸酶融合蛋白来终止通过先前吞噬的免疫复合物或通过病毒感染后激活TLR7的RNA的TLR7信号传导。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的野生型RNase对于RNase胞质抑制剂的抑制不是抗性的。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的野生型RNase在细胞的胞质中不是活性的。

[0136] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括DNase和RNase两者。在一些实施方案中,这些优化的二核酸酶融合蛋白改善了SLE的治疗,因为它们消化或降解含有RNA、DNA或RNA和DNA两者的组合的免疫复合物,并且在细胞外是活性的。

[0137] Fc结构域

[0138] 在一些实施方案中,包含一个或多个核酸酶结构域的多肽可操作地与Fc结构域偶联,该Fc结构域用作支架以及增加多肽的血清半衰期的手段。在一些实施方案中,一个或多个核酸酶结构域和/或Fc结构域是非糖基化的、去糖基化的或低糖基化的。

[0139] 合适的Fc结构域是本领域公知的,且包括但不限于Fc和Fc变体,例如W02011/053982、W002/060955、W002/096948、W005/047327、W005/018572和US2007/0111281中公开的那些(前述文献的内容通过引用并入本文)。本领域技术人员能够使用常规方法(例如,克隆、缀合)将Fc结构域引入本文公开的优化的二核酸酶融合蛋白(具有或不具有改变的糖基化)中。

[0140] 在一些实施方案中,Fc结构域是野生型人IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:45中所示的。

[0141] 在一些实施方案中,Fc结构域例如通过导致氨基酸添加、缺失或置换的突变来改变或修饰。如本文所用,术语“Fc结构域变体”是指与该Fc结构域来源的野生型Fc相比,具有至少一个氨基酸修饰(例如氨基酸置换)的Fc结构域。例如,在其中Fc结构域源自人IgG1抗

体的情况下,变体与人IgG1 Fc区的相应位置处的野生型氨基酸相比包含至少一个氨基酸突变(例如,置换)。Fc变体的氨基酸置换可以位于Fc结构域内称为对应于该残基在抗体的Fc区中给出的位置编号(根据EU索引编号)的位置处。

[0142] 在一个实施方案中,Fc变体包含一个或多个位于铰链区或其部分中的氨基酸位置处的氨基酸置换。在另一个实施方案中,Fc变体包含一个或多个在位于CH2结构域或其部分中的氨基酸位置处的氨基酸置换。在另一个实施方案中,Fc变体包含一个或多个在位于CH3结构域或其部分中的氨基酸位置处的氨基酸置换。在另一个实施方案中,Fc变体包含一个或多个在位于CH4结构域或其部分中的氨基酸位置处的氨基酸置换。

[0143] 在一些实施方案中,Fc区在N83(即,根据Kabat编号的N297)处具有突变,从而产生非糖基化的Fc区(例如,Fc N83S;SEQ ID NO:50)。在一些实施方案中,Fc结构域包括在三个铰链区半胱氨酸(残基220、226和229,根据EU索引编号)的一个或多个中的突变。在一些实施方案中,Fc结构域的三个铰链半胱氨酸中的一个或多个可以突变为SCC(SEQ ID NO:51)或SSS(SEQ ID NO:52),其中“S”表示半胱氨酸用丝氨酸的氨基酸置换。因此,“SCC”表示三个铰链区半胱氨酸(残基220、226和229,根据EU索引编号)的仅第一个半胱氨酸的氨基酸置换为丝氨酸,而“SSS”表示所有三个铰链区半胱氨酸(残基220、226和229,根据EU索引编号)用丝氨酸置换。

[0144] 在一些方面,Fc结构域是突变的人IgG1 Fc结构域。在一些方面,突变Fc结构域包含铰链、CH2和/或CH3结构域中的一个或多个突变。

[0145] CH2置换

[0146] 在一些方面,突变Fc结构域包括P238S突变。在一些方面,突变Fc结构域包括P331S突变。在一些方面,突变Fc结构域包括P238S突变和P331S突变。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和/或P331S,并且可以包括三个铰链半胱氨酸(残基220、226和229)的一个或多个的突变,根据EU索引编号。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和/或P331S,和/或三个铰链半胱氨酸(残基220、226和229)中的一个或多个突变,根据EU索引编号。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和/或P331S,和/或在铰链半胱氨酸中至SCC或在三个铰链半胱氨酸中至SSS的突变。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和P331S以及三个铰链半胱氨酸的至少一个中的突变。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和P331S和SCC。在一些方面,突变Fc结构域包含P238S和P331S和SSS。在一些方面,突变Fc结构域包括P238S和SCC或SSS。在一些方面,突变Fc结构域包括P331S和SCC或SSS。(所有编号均根据EU索引)。

[0147] 在一些方面,突变Fc结构域包括在N-连接糖基化位点处的突变,如N297,例如天冬酰胺置换另一氨基酸如丝氨酸,例如N297S。在一些方面,突变Fc结构域包括在N-连接糖基化位点处的突变(如N297,例如天冬酰胺置换另一氨基酸如丝氨酸,例如N297S)和三个铰链半胱氨酸的一个或多个中的突变。在一些方面,突变Fc结构域包括N-连接糖基化位点处的突变(如N297,例如,天冬酰胺置换另一氨基酸如丝氨酸,例如N297S)以及三个铰链半胱氨酸之一突变为SCC或所有三个半胱氨酸突变为SSS。在一些方面,突变Fc结构域包括N-连接糖基化位点处的突变(如N297,例如,天冬酰胺置换另一氨基酸如丝氨酸,例如N297)以及CH2结构域中的一个或多个突变(其降低Fc γ R结合和/或补体活化),如P238或P331或两者处的突变,例如P238S或P331S或P238S和P331S两者。在一些方面,此类突变Fc结构域还可包括铰链区中的突变,例如SCC或SSS。(所有编号根据EU索引)。在一些方面,突变Fc结构域如本

文的序列表或序列表格中所示。

[0148] CH3置换

[0149] 异二聚体可以通过本文公开的异二聚体二核酸酶融合蛋白上Fc结构域的CH3结构域中的突变优先形成。首先使用“杵-臼(knobs-into-holes)”策略将重链工程化用于异二聚化(Rigway B等,Protein Eng.,9(1996)pp.617-621)。术语“杵-臼”是指通过在两个多肽相互作用的界面处在一个多肽中引入突起(杵)和在另一多肽中引入空腔(臼)来在体外或体内指导两个多肽配对在一起的技术。参见例如WO 96/027011、WO 98/050431、US 5,731,168、US2007/0178552、WO2009089004、US20090182127。特别地,CH3结构域中突变的组合可用于优先形成异二聚体,例如,在“杵”重链中的S354C、T366W和在“臼”重链中的Y349C、T366S、L368A、Y407V。在一些实施方案中,本文公开的异二聚体二核酸酶融合蛋白包括具有杵突变T366W的第一CH3结构域和具有臼突变T366S、L368A和Y407V的第二CH3结构域。(根据EU索引编号。)

[0150] 在一些实施方案中,CH3突变是由Zymeworks (US2012/0149876A1,通过引用并入;和Von Kreudenstein, T.S.等mABs,5(2013),pp.646-654)描述的那些并且包括以下突变:T350V、L351Y、F405A和Y407V(第一CH3结构域);和T350V、T366L、K392L、T394W(第二CH3结构域)。在一些实施方案中,本文公开的异二聚体二核酸酶融合蛋白包括具有T350V、L351Y、F405A和Y407V突变的第一CH3结构域和具有T350V、T366L、K392L、T394W突变的第二CH3结构域。(根据EU索引编号。)

[0151] 在一些实施方案中,CH3突变是由Moore, G. L.等(mABs,3(2011),pp.546-557)描述的那些并包括以下突变:S364H和F405A(第一CH3结构域);和Y349T和T394F(第二CH3结构域)。在一些实施方案中,本文公开的异二聚体二核酸酶融合蛋白包括具有S364H和F405A突变的第一CH3结构域和具有Y349T和T394F突变的第二CH3结构域。(根据EU索引编号。)

[0152] 在一些实施方案中,CH3突变是由Gunasekaran, K.等(J. Biol. Chem.,285(2010),pp.19637-19646)描述的那些并包括以下突变:K409D和K392D(第一CH3结构域);和D399K和E365K(第二CH3结构域)。在一些实施方案中,本文公开的异二聚体二核酸酶融合蛋白包括具有K409D和K392D突变的第一CH3结构域和具有D399K和E365K突变的第二CH3结构域。(根据EU索引编号。)

[0153] 本公开的优化的二核酸酶融合蛋白可以使用本领域公认的Fc变体,其已知产生效应子功能和/或FcR结合的改变。例如,国际PCT公开W088/07089A1,W096/14339A1,W098/05787A1,W098/23289A1,W099/51642A1,W099/58572A1,W000/09560A2,W000/32767A1,W000/42072A2,W002/44215A2,W002/060919A2,W003/074569A2,W004/016750A2,W004/029207A2,W004/035752A2,W004/063351A2,W004/074455A2,W004/099249A2,W005/040217A2,W004/044859,W005/070963A1,W005/077981A2,W005/092925A2,W005/123780A2,W006/019447A1,W006/047350A2和W006/085967A2;US专利公开No.US2007/0231329,US2007/0231329,US2007/0237765,US2007/0237766,US2007/0237767,US2007/0243188,US2007/0248603,US2007/0286859,US2008/0057056或U.S.专利No.5,648,260;5,739,277;5,834,250;5,869,046;6,096,871;6,121,022;6,194,551;6,242,195;6,277,375;6,528,624;6,538,124;6,737,056;6,821,505;6,998,253;7,083,784和7,317,091中公开的一个或多个氨基酸位置处的变化(例如,置换),其各自通过引用并入本文中。在一个实施方案

中,可以在一个或多个公开的氨基酸位置处进行特定改变(例如,本领域公开的一种或多种氨基酸的特定置换)。在另一个实施方案中,可以在一个或多个公开的氨基酸位置进行不同的改变(例如,本领域公开的一个或多个氨基酸位置处的不同置换)。

[0154] 预期Fc结构域中的其他氨基酸突变降低与Fc γ 受体和Fc γ 受体亚型的结合。将氨基酸残基编号分配至Fc结构域是按照Kabat的定义。参见,例如,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等, "Introduction" Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of Health and Human Services, NIH, 5th edition, Bethesda, MD vol.1:xiii-xcvi (1991); Chothia& Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia等, Nature 342:878-883 (1989), 其各自出于所有目的通过引用结合到本文中。

[0155] 例如,Fc区的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、303、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或439位的突变可以改变结合,如2004年5月18日授权的美国专利No. 6,737,056中所述,其全部内容通过引用并入本文。该专利报告,与未突变的IgG3相比,将IgG3中的Pro331改变为Ser导致6倍低的亲和力,表明Pro331参与Fc γ RI结合。此外,在1997年4月29日授权的U.S. 5,624,821中公开了234、235、236和237、297、318、320和322位处的氨基酸修饰为潜在地改变受体结合亲和力,该文献通过引用整体并入本文。(根据EU索引编号。)

[0156] 预期使用的进一步的突变包括例如2006年10月19日公开的美国专利申请公开No. 2006/0235208中所述的那些,其全部内容通过引用并入本文。该公开描述了表现出与Fc γ 受体的结合降低,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性降低,或补体依赖性细胞毒性降低的Fc变体,其包含Fc区中的至少一个氨基酸修饰,包括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和331L(编号根据EU索引),以及双重突变体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和237K/325L/328R。如该公开中描述的预期使用的其他突变包括227G、234D、234E、234G、234I、234Y、235D、235I、235S、236S、239D、246H、255Y、258H、260H、264I、267D、267E、268D、268E、272H、272I、272R、281D、282G、283H、284E、293R、295E、304T、324G、324I、327D、327A、328A、328D、328E、328F、328I、328M、328N、328Q、328T、328V、328Y、330I、330L、330Y、332D、332E、335D,在235和236位之间G的插入、在235和236位之间A的插入、在235和236位之间S的插入、在235和236位之间T的插入、在235和236位之间N的插入、在235和236位之间D的插入、在235和236位之间V的插入、在235和236位之间L的插入、在235和236位之间G的插入、在235和236位之间A的插入、在235和236位之间S的插入、在235和236位之间T的插入、在235和236位之间N的插入、在235和236位之间D的插入、在235和236位之间V的插入、在235和236位之间L的插入、在297和298位之间G的插入、在297和298位之间A的插入、在297和298位之间S的插入、在297和298位之间D的插入、在326和327位之间G的插入、在326和327位

之间A的插入、在326和327位之间T的插入、在326和327位之间D的插入以及在326和327位之间E的插入(编号是根据EU索引)。另外,在美国专利申请公开No.2006/0235208中描述的突变包括227G/332E、234D/332E、234E/332E、234Y/332E、234I/332E、234G/332E、235I/332E、235S/332E、235D/332E、235E/332E、236S/332E、236A/332E、236S/332D、236A/332D、239D/268E、246H/332E、255Y/332E、258H/332E、260H/332E、264I/332E、267E/332E、267D/332E、268D/332D、268E/332D、268E/332E、268D/332E、268E/330Y、268D/330Y、272R/332E、272H/332E、283H/332E、284E/332E、293R/332E、295E/332E、304T/332E、324I/332E、324G/332E、324I/332D、324G/332D、327D/332E、328A/332E、328T/332E、328V/332E、328I/332E、328F/332E、328Y/332E、328M/332E、328D/332E、328E/332E、328N/332E、328Q/332E、328A/332D、328T/332D、328V/332D、328I/332D、328F/332D、328Y/332D、328M/332D、328D/332D、328E/332D、328N/332D、328Q/332D、330L/332E、330Y/332E、330I/332E、332D/330Y、335D/332E、239D/332E、239D/332E/330Y、239D/332E/330L、239D/332E/330I、239D/332E/268E、239D/332E/268D、239D/332E/327D、239D/332E/284E、239D/268E/330Y、239D/332E/268E/330Y、239D/332E/327A、239D/332E/268E/327A、239D/332E/330Y/327A、332E/330Y/268E/327A、239D/332E/268E/330Y/327A、插入G>297-298/332E、插入A>297-298/332E、插入S>297-298/332E、插入D>297-298/332E、插入G>326-327/332E、插入A>326-327/332E、插入T>326-327/332E、插入D>326-327/332E、插入E>326-327/332E、插入G>235-236/332E、插入A>235-236/332E、插入S>235-236/332E、插入T>235-236/332E、插入N>235-236/332E、插入D>235-236/332E、插入V>235-236/332E、插入L>235-236/332E、插入G>235-236/332D、插入A>235-236/332D、插入S>235-236/332D、插入T>235-236/332D、插入N>235-236/332D、插入D>235-236/332D、插入V>235-236/332D、插入L>235-236/332D(根据EU索引编号),其预期使用。突变体L234A/L235A描述于例如2003年6月12日公开的美国专利申请公开No.2003/0108548中,其全部内容通过引用并入本文。在实施方案中,所描述的修饰单独或组合地包括。(根据EU索引编号。)

[0157] 接头结构域

[0158] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括接头结构域。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包括多个接头结构域。在一些实施方案中,接头结构域是多肽接头。在某些方面,期望使用多肽接头将Fc或者其变体或片段与一个或多个核酸酶结构域融合以形成优化的二核酸酶融合蛋白。

[0159] 在一个实施方案中,多肽接头是合成的。如本文所用,关于多肽接头的术语“合成的”包括在氨基酸的线性序列中包含与不是天然与其连接的序列(其可以是或不是天然存在的)(例如,Fc序列)连接的氨基酸序列(其可以是或不是天然存在的)的肽(或多肽)。例如,多肽接头可以包含非天然存在的多肽,其是天然存在的多肽的修饰形式(例如,包含诸如添加、置换或缺失的突变)或其包含第一氨基酸序列(其可以是或不是天然存在的)。例如,可以使用本发明的多肽接头以确保Fc或者其变体或片段并置而确保正确折叠和功能性Fc或者其变体或片段的形成。优选地,与本发明相容的多肽接头是相对非免疫原性的并且不抑制结合蛋白的单体亚基之间的任何非共价结合。

[0160] 在某些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白使用如SEQ ID NO:41所示的NLG接头。

[0161] 在某些实施方案中,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白使用多肽接头以在单个多肽链中连接任何两个或更多个同框的结构域。在一个实施方案中,两个或更多个结构域可以独立地选自本文讨论的任何Fc结构域或其变体或片段,或者核酸酶结构域。例如,在某些实施方案中,多肽接头可用于融合相同的Fc片段,从而形成同型二聚体Fc区。在其他实施方案中,多肽接头可用于融合不同的Fc片段,从而形成异二聚体Fc区。在其他实施方案中,本发明的多肽接头可用于将第一Fc片段的C-末端遗传融合至第二Fc片段的N-末端以形成完整的Fc结构域。

[0162] 在一个实施方案中,多肽接头包含Fc结构域或者其变体或片段的一部分。例如,在一个实施方案中,多肽接头可包含Fc片段(例如,C或N结构域),或者Fc结构域或其变体的不同部分。

[0163] 在另一个实施方案中,多肽接头包含gly-ser接头或由gly-ser接头组成。如本文所用,术语“gly-ser接头”是指由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性的gly-ser接头包含式(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列,其中n是正整数(例如,1、2、3、4或5)。优选的gly-ser接头是(Gly₄Ser)₄(SEQ ID NO:63)。另一种优选的gly-ser接头是(Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO:30)。另一种优选的gly-ser接头是(Gly₄Ser)₅(SEQ ID NO:64)。在某些实施方案中,gly-ser接头可以插入在两个其他序列的多肽接头(例如,本文所述的任何多肽接头序列)之间。在其他实施方案中,gly-ser接头连接在另一序列的多肽接头(例如,本文所述的任何多肽接头序列)的一端或两端。在再其他实施方案中,两个或更多个gly-ser接头在多肽接头中串联并入。

[0164] 在其他实施方案中,本发明的多肽接头包含生物学相关的肽序列或其序列部分。例如,生物相关肽序列可包括但不限于衍生自抗排斥或抗炎肽的序列。所述抗排斥或抗炎肽可选自细胞因子抑制肽、细胞粘附抑制肽、凝血酶抑制肽和血小板抑制肽。在优选的实施方案中,多肽接头包含选自下组的肽序列:IL-1抑制或拮抗肽序列、促红细胞生成素(EPO)-模拟肽序列、血小板生成素(TPO)-模拟肽序列、G-CSF模拟肽序列、TNF-拮抗剂肽序列、整联蛋白结合肽序列、选择素拮抗剂肽序列、抗病原性肽序列、血管活性肠肽(VIP)模拟肽序列、钙调蛋白拮抗剂肽序列、肥大细胞拮抗剂、SH3拮抗剂肽序列、尿激酶受体(UKR)拮抗剂肽序列、生长抑素或皮质抑素模拟肽序列以及巨噬细胞和/或T细胞抑制肽序列。示例性肽序列(其任何一种可以用作多肽接头)公开于美国专利No.6,660,843中,其通过引用并入本文。

[0165] 适用于优化的二核酸酶融合蛋白的其他接头是本领域已知的,例如,US 5,525,491中公开的富丝氨酸接头,在Arai等,Protein Eng 2001;14:529-32中公开的螺旋形成的肽接头(例如,A(EAAAK)_nA(n=2-5)(SEQ ID NO:65)),和Chen等,Mol Pharm 2011;8:457-65中公开的稳定接头,即二肽接头LE,凝血酶敏感的二硫键环肽接头和形成 α -螺旋的接头LEA(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄ALE(SEQ ID NO:53)。

[0166] 其他示例性接头包括GS接头(即,(GS)_n(SEQ ID NO:66)、GGSG(SEQ ID NO:70)接头(即,(GGSG)_n(SEQ ID NO:67)、GSAT接头(SEQ ID NO:44)、SEG接头和GGS接头(即,(GGSGGS)_n(SEQ ID NO:68),其中n是正整数(例如,1、2、3、4或5)。用于优化的二核酸酶融合蛋白的其他合适的接头可以使用公众可获得的数据库找到,例如Linker Database(ibi.vu.nl/programs/linkerdbwww)。接头数据库是用作新融合蛋白中的潜在接头的多功能酶中的结构域间接头的数据库(参见,例如,George等,Protein Engineering 2002;15:

871-9)。

[0167] 应当理解,这些示例性多肽接头的变体形式可以通过在编码多肽接头的核苷酸序列中引入一个或多个核苷酸取代、添加或缺失来产生,使得一个或多个氨基酸置换、添加或缺失被引入到多肽接头中。突变可以通过标准技术引入,例如定点诱变和PCR介导的诱变。

[0168] 本公开的多肽接头长度为至少一个氨基酸,并且可以具有不同的长度。在一个实施方案中,本发明的多肽接头长度为约1至约50个氨基酸。如在该情况中使用的,术语“约”指示+/-两个氨基酸残基。由于接头长度必须是正整数,因此长度为约1至约50个氨基酸的长度是指长度为1至48-52个氨基酸的长度。在另一个实施方案中,本公开的多肽接头长度为约10-20个氨基酸。在另一个实施方案中,本公开的多肽接头长度为约15至约50个氨基酸。

[0169] 在另一个实施方案中,本公开的多肽接头长度为约20至约45个氨基酸。在另一个实施方案中,本公开的多肽接头长度为约15至约25个氨基酸。在另一个实施方案中,本公开的多肽接头长度是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或61或更多个氨基酸。

[0170] 可以使用本领域已知的技术将多肽接头引入多肽序列中。修饰可以通过DNA序列分析确认。质粒DNA可用于转化宿主细胞以稳定地产生所产生的多肽。

[0171] 示例性的优化二核酸酶融合蛋白

[0172] 本发明的优化的二核酸酶融合蛋白是模块化的,并且可以配置成合并各种单个结构域。例如,在一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包括(SEQ ID NO:21)中所示的突变体人DNase1 A114F结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包括SEQ ID NO:24中所示的突变体人DNase1 N18S/N106S/A114F结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包括SEQ ID NO:27中所示的人野生型RNase1结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可以包括SEQ ID NO:28中所示的人突变体RNase1N34S/N76S/N88S结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可以包括SEQ ID NO:30中所示的(Gly₄Ser)3接头结构域。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包括SEQ ID NO:41所示的NLG接头。在另一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可以包括VK3LP前导序列(SEQ ID NO:54)。本领域技术人员将理解,这些单个结构域可以以任何顺序可操作地彼此偶联以形成酶活性的优化的二核酸酶融合蛋白。例如,如下文具体实施例中所述的,RNase1可以可操作地与Fc结构域偶联。在另一个实例中,RNase1可以通过(Gly₄Ser)3(SEQ ID NO:30)接头结构域操作性地与Fc结构域偶联。在又一个实例中,DNase1 A114F可以操作性地与Fc结构域偶联。在又一个实例中,DNase1 A114F可通过(Gly₄Ser)3(SEQ ID NO:30)接头结构域操作性地与Fc结构域偶联。在图1和序列表格中具有本文公开的非限制性示例性构型,各种其他构型是可能的。

[0173] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含可操作地与包含SCC铰链和CH2突变P238S和P331S的突变Fc结构域或其片段偶联的野生型人RNase1结构域,以及可操作地与人RNase1偶联的突变的人DNase1结构域,从而形成串联同型二聚体。在一些实施方案中,DNase1通过肽接头,例如本文公开的NLG接头与RNase1连接。在一些实施方案中,RNase1在有或没有接头的情况下可操作地连接至Fc结构域的N-末端。在一些实施方案中,优化的二

核酸酶融合蛋白包含具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, RNase1 在有或没有接头的情况下可操作地连接至Fc结构域的C-末端。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白包含具有SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是同型二聚的或异二聚的。

[0174] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含在有或没有接头的情况下可操作地与第一突变Fc结构域(具有SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V)或者其变体或片段偶联的突变体人DNase 1结构域, 及在有或没有接头的情况下可操作地与第二突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S和P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段偶联的野生型人RNase 1结构域的异二聚体。在一些实施方案中, DNase1和RNase 1两者与它们各自的Fc结构域的N-末端连接。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列的多肽和含有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0175] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含突变体人DNase 1结构域和野生型人RNase 1结构域的异二聚体, 该两者在有或没有接头的情况下可操作地与第一突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S和P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段和第二突变Fc结构域(具有突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段偶联。在一些实施方案中, DNase1和RNase1分别与第一和第二Fc结构域的N-末端和C-末端连接。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:5中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0176] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V)或其片段偶联的突变体人DNase 1结构域, 及在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段偶联的野生型人RNase 1结构域的异二聚体。在一些实施方案中, DNase1与Fc结构域的N-末端连接和RNase1与Fc结构域的C-末端连接。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:7中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0177] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V)或其片段偶联的突变体人DNase 1结构域, 及在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段偶联的野生型人RNase 1结构域的异二聚体。在一些实施方案中, DNase1和RNase1两者与其相应Fc结构域的C-末端连接。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:9中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:11中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:12中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0178] 在一些实施方案中, 优化的二核酸酶融合蛋白是包含突变体人DNase1结构域和野生型人RNase1结构域的异二聚体, 该两者在有或没有接头的情况下可操作地与包含SCC铰链, CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V的突变Fc结构域或其片段

及包含SCC铰链,CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W的突变Fc结构域或其片段偶联。在一些实施方案中,DNase1和RNase1分别与Fc结构域的C-末端和N-末端连接。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:13中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0179] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是包含在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链,CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、L351Y、F405A和Y407V)或其片段偶联的突变体人DNase 1结构域及在有或没有接头的情况下可操作地与突变Fc结构域(包含SCC铰链,CH2突变P238S、P331S及CH3突变T350V、T366L、K392L和T394W)或其片段偶联的野生型人RNase 1结构域的异二聚体。在一些实施方案中,DNase1与Fc结构域的C-末端连接,和RNase1与Fc结构域的N-末端连接。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白是包含含有SEQ ID NO:15中所示序列的多肽和含有SEQ ID NO:16中所示氨基酸序列的多肽的异二聚体。

[0180] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白包含具有与SEQ ID NO:1-17中任一个的氨基酸序列至少80%相同,例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或至少99.5%相同的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1-17中任一个所示的氨基酸序列。

[0181] 在一些实施方案中,前述优化的二核酸酶融合蛋白具有前导序列。

[0182] 本领域普通技术人员将理解,前导序列和接头序列是任选的,并且不限于上述实施方案中描述的那些。例如,RNase和/或DNase结构域可以直接地与Fc或其变体或片段的N-和/或C-末端融合;前导结构域可以是本领域已知可用于其预期目的的那些结构域中任一种,例如,用于增加蛋白质表达和/或分泌(例如,Gaussia荧光素酶信号肽(MGVKVLFALICIAVAEA;SEQ ID NO:31));接头可以是本领域已知的任何接头,例如(Gly₄Ser)n(SEQ ID NO:58)、NLG(VDGASSPVNVSSPSVQDI;SEQ ID NO:41)、LE、凝血酶敏感的二硫化物环肽接头、LEA(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄(SEQ ID NO:32)或体内可裂解的二硫化物接头,如本文中所述的。还应理解,使用常规克隆和重组方法对优化的二核酸酶融合蛋白的氨基酸序列进行相应的改变在本领域技术人员的能力范围内。还应理解,核酸酶结构域中的天冬酰胺残基(即RNase1中的N34、N76和N88,以及DNase1中的N18和N106)可以被丝氨酸以外的氨基酸(例如谷氨酰胺)置换,只要该氨基酸不用作N-连接糖基化的受体。

[0183] 制备优化的二核酸酶融合蛋白的方法

[0184] 本公开的优化的二核酸酶融合蛋白主要地可使用重组DNA技术在转化或转染的宿主细胞中制备。为此,制备编码肽的重组DNA分子。制备这类DNA分子的方法是本领域熟知的。例如,可以使用合适的限制性酶从DNA切除编码肽的序列。或者,可以使用化学合成技术合成DNA分子,例如氨基磷酸酯方法。而且,可以使用这些技术的组合。

[0185] 本发明还包括能够在合适的宿主中表达肽的载体。载体包含可操作地与合适的表达控制序列偶联的编码肽的DNA分子。在DNA分子插入到载体中之前或之后,影响这种有效连接的方法是众所周知的。表达控制序列包括启动子、激活子、增强子、操纵子、核糖体核酸酶结构域、起始信号、终止信号、帽信号、多腺苷酸化信号和涉及转录或翻译控制的其他信号。

[0186] 其上具有DNA分子的所得载体用于转化或转染合适的宿主。可以使用本领域熟知

的方法进行这种转化或转染。

[0187] 大量可用和公知的宿主细胞中的任一种可用于本发明的实施中。特定宿主的选择取决于本领域公认的许多因素。这些包括,例如,与所选表达载体的相容性、由DNA分子编码的肽的毒性、转化或转染的速率、肽的回收方便性、表达特征、生物安全性和成本。这些因素的平衡必须在并非所有宿主对于特定DNA序列的表达可能同样有效的理解下达成。在这些一般指导原则中,有用的微生物宿主包括细菌(例如大肠杆菌)、酵母(例如酵母属)和培养中的其他真菌、昆虫、植物、哺乳动物(包括人)细胞或本领域已知的其他宿主。在优选的实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白在CHO细胞中产生。

[0188] 接下来,培养并纯化转化或转染的宿主。宿主细胞可以在常规发酵或培养条件下培养,以便表达所需的化合物。这些发酵和培养条件是本领域熟知的。最后,通过本领域熟知的方法从培养物纯化肽。

[0189] 化合物也可以通过合成方法制备。例如,可以使用固相合成技术。合适的技术是本领域熟知的,且包括Merrifield(1973),Chem.Polypeptides,pp.335-61(Katsoyannis和Panayotis eds.);Merrifield(1963),J.Am.Chem.Soc.85:2149;Davis等,Biochem Intl 1985;10:394-414;Stewart和Young(1969),Solid Phase Peptide Synthesis;U.S.专利No.3,941,763;Finn等(1976),The Proteins(3rd ed.)2:105-253;和Erickson等(1976),The Proteins(3rd ed.)2:257-527中描述的那些。固相合成是制备单个肽的优选技术,因为它是制备小肽的最具成本效益的方法。含有衍生化肽或含有非肽基团的化合物可以通过众所周知的有机化学技术合成。

[0190] 其他分子表达/合成方法是本领域普通技术人员通常已知的。

[0191] 具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白

[0192] 糖基化(例如,0-连接或N-连接的糖基化)可以例如通过甘露糖和去唾液酸糖蛋白受体和其他凝集素样受体使它们从循环中的去除最小化而影响本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期。因此,在一些实施方案中,本发明的优化的二核酸酶融合蛋白以非糖基化、去糖基化或低糖基化形式制备。优选地,改变N-连接的糖基化并且优化的二核酸酶融合蛋白是非糖基化的。

[0193] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白中符合Asn-X-Ser/Thr(X可以是除Pro之外的任何其他天然存在的氨基酸)共有序列的所有天冬酰胺残基突变为不用作N-连接的糖基化的受体的残基(例如,丝氨酸、谷氨酰胺),从而消除在使蛋白质糖基化的细胞中合成时优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化。

[0194] 在一些实施方案中,在哺乳动物细胞中产生缺乏N-连接糖基化位点的优化的二核酸酶融合蛋白。在一个实施方案中,哺乳动物细胞是CHO细胞。因此,在具体实施方案中,在CHO细胞中产生非糖基化的优化二核酸酶融合蛋白。

[0195] 在其他实施方案中,通过例如在宿主(例如,细菌如大肠杆菌),工程化为缺乏一种或多种对糖基化重要的酶的哺乳动物细胞或用防止糖基化的药剂如衣霉素(Dol-PP-GlcNAc形成的抑制剂)处理的哺乳动物细胞中产生优化的二核酸酶融合蛋白来实现N-糖基化的减少或缺乏。

[0196] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白在经工程化以产生具有复合N-聚糖而不是高甘露糖型糖的糖蛋白的低等真核生物中产生(参见例如US2007/0105127)。

[0197] 在一些实施方案中,糖基化的优化二核酸酶融合蛋白(例如,在哺乳动物细胞如CHO细胞中产生的那些)经化学或酶促处理以除去一个或多个碳水化合物残基(例如,一个或多个甘露糖、岩藻糖和/或N-乙酰葡萄糖胺残基)或者修饰或掩蔽一个或多个碳水化合物残基。此类修饰或掩蔽可降低优化的二核酸酶融合蛋白与甘露糖受体和/或唾液酸糖蛋白受体和/或其他凝集素样受体的结合。化学去糖基化可以通过用三氟甲磺酸(TFMS)处理优化的二核酸酶融合蛋白来实现,如在例如Sojar等,JBC 1989;264:2552-9和Sojar等,Methods Enzymol 1987;138:341-50中所公开的,或者通过用氟化氢处理优化的二核酸酶融合蛋白来实现,如Sojar等(1987,同上)人所公开的。通过用蛋白质N-糖苷酶(PNGase)A或F处理优化的二核酸酶融合蛋白可以实现从优化的二核酸酶融合蛋白酶促去除N-连接的碳水化合物,如Thotakura等(Methods Enzymol 1987;138:350-9)中所公开的。其他适用的本领域公认的市售去糖基化酶包括内切- α -N-乙酰基-半乳糖苷酶、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3和内切糖苷酶H。在一些实施方案中,可以使用这些酶中的一种或多种使本发明的优化的二核酸酶融合蛋白去糖基化。用于去糖基化的替代方法公开于例如US 8,198,063中。

[0198] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白部分去糖基化。部分去糖基化可以通过用内切糖苷酶(例如,内切糖苷酶H)处理优化的二核酸酶融合蛋白来实现,该内切糖苷酶切割N-连接的高甘露糖碳水化合物而不是复合型碳水化合物,从而留下与天冬酰胺连接的单一GlcNAc残基。用内切糖苷酶H处理的优化的二核酸酶融合蛋白缺乏高甘露糖碳水化合物,导致与肝甘露糖受体的相互作用减少。尽管该受体识别末端GlcNAc,但是与蛋白质表面上的单一GlcNAc的生产性相互作用的可能性不如完整的高甘露糖结构那么大。

[0199] 在其他实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化被修饰,例如通过氧化、还原、脱水、取代、酯化、烷基化、唾液酸化、碳-碳键裂解等,以减少优化的二核酸酶融合蛋白从血液的清除。在一些实施方案中,用高碘酸盐和硼氢化钠处理优化的二核酸酶融合蛋白以修饰碳水化合物结构。高碘酸盐处理氧化邻位二醇,从而裂解碳-碳键并用醛基取代羟基;硼氢化物将醛还原为羟基。许多糖残基包括邻位二醇,且因此通过该处理裂解。用高碘酸盐和硼氢化钠延长血清半衰期的例子通过用这些试剂顺序处理溶酶体酶 β -葡萄糖醛酸酶来示例(参见,例如,Houba等(1996)Bioconjug Chem 1996;7:606-11;Stahl等PNAS 1976;73:4045-9;Achord等Pediat.Res 1977;11:816-22;Achord等Cell 1978;15:269-78)。Hickman等,BBRC 1974;57:55-61中公开了用高碘酸盐和硼氢化钠处理的方法。Thorpe等Eur J Biochem 1985;147:197-206公开了用高碘酸盐和氰基硼氢化物处理的方法,其增加蓖麻毒素的血清半衰期和组织分布。

[0200] 在一个实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的碳水化合物结构可以通过添加一个或多个另外的部分(例如,碳水化合物基团、磷酸酯基团、烷基等)来掩蔽,所述另外的部分干扰甘露糖或脱唾液酸糖蛋白受体或其他凝集素样受体对结构的识别。

[0201] 在一些实施方案中,通过编码优化的二核酸酶融合蛋白的核酸的突变去除一个或多个潜在的糖基化位点,从而当在使蛋白质糖基化的细胞(例如哺乳动物细胞如CHO细胞)中合成时,减少优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化(低糖基化)。在一些实施方案中,如果例如低糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白表现出增加的活性或有助于增加的血清半衰期,可能需要通过突变二核酸酶融合蛋白的核酸酶结构域中潜在的N-连接糖基化位点来选择性

地使优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶结构域低糖基化。在其他实施方案中,如果例如这种修饰改善优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期,可能需要使优化的二核酸酶融合蛋白的部分低糖基化使得除核酸酶结构域之外的区域缺乏N-糖基化。或者,可以修饰糖基化受体附近的其他氨基酸,从而破坏糖基化酶的识别基序而不必改变通常被糖基化的氨基酸。

[0202] 在一些实施方案中,可以通过引入糖基化位点来改变优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化。例如,可以修饰优化的二核酸酶融合蛋白的氨基酸序列以引入Asp-X-Ser/Thr(X是除脯氨酸之外的任何氨基酸)的N-连接糖基化的共有序列。可以在优化的二核酸酶融合蛋白的整个氨基酸序列的任何地方添加额外的N-连接糖基化位点。优选地,糖基化位点被引入氨基酸序列中基本上不降低优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶(例如,RNase和/或DNase)活性的位置。

[0203] 据报道,添加O-连接的糖基化位点改变蛋白质如生长激素、促卵泡激素、IGFBP-6、因子IX和许多其他蛋白质的血清半衰期(例如,如Okada等,Endocr Rev 2011;32:2-342;Weenen等,J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5204-12;Marinaro等,European Journal of Endocrinology 2000;142:512-6;US2011/0154516中所公开的)。因此,在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白的O-连接的糖基化(在丝氨酸/苏氨酸残基上)被改变。用于改变O-连接的糖基化的方法是本领域的常规方法,并且可以例如通过β-消除(参见,例如,Huang等,Rapid Communications in Mass Spectrometry 2002;16:1199-204;Conrad,Curr Protoc Mol Biol 2001;Chapter 17:Unit17.15A;Fukuda,Curr Protoc Mol Biol 2001;Chapter 17;Unit 17.15B;Zachara等,Curr Protoc Mol Biol 2011;Unit 17.6);通过使用市售试剂盒(例如,GlycoProfileTM Beta-Elimination Kit,Sigma);或者通过对优化的二核酸酶融合蛋白进行一系列外切糖苷酶(例如但不限于β1-4半乳糖苷酶和β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶)处理直至仅保留Galβ1-3GalNAc和/或GlcNAcβ1-3GalNAc,然后用例如内切-α-N-乙酰半乳糖胺酶(即O-糖苷酶)处理来实现。这些酶可从例如New England Biolabs商购获得。在再其他实施方案中,改变优化的二核酸酶融合蛋白以在优化的二核酸酶融合蛋白中引入O-连接的糖基化,如在例如Okada等(同上),Weenen等(同上),US2008/0274958和US2011/0171218中所述。在一些实施方案中,将一个或多个O-连接的糖基化共有位点引入优化的二核酸酶融合蛋白中,如CXXGGT/S-C(SEQ ID NO:33)(van den Steen等,Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,Michael Cox,ed.,1998;33:151-208)、NST-E/D-A(SEQ ID NO:34)、NITQS(SEQ ID NO:35)、QSTQS(SEQ ID NO:36)、D/E-FT-R/K-V(SEQ ID NO:37)、C-E/D-SN(SEQ ID NO:38)和GGSC-K/R(SEQ ID NO:39)。可以在优化的二核酸酶融合蛋白的整个氨基酸序列的任何地方添加额外的O-连接的糖基化位点。优选地,糖基化位点被引入氨基酸序列中基本上不降低优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶(例如,RNase和/或DNase)活性的位置中。或者,通过化学修饰优化的二核酸酶融合蛋白中的氨基酸引入O-连接的糖部分,如在例如WO 87/05330和Aplin等,CRC Crit Rev Biochem 1981;259-306中所述的。

[0204] 在一些实施方案中,将N-连接和O-连接的糖基化位点两者引入优化的二核酸酶融合蛋白中,优选在氨基酸序列中不显著降低优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶(例如,RNase和/或DNase)活性的位置中。

[0205] 在优化的二核酸酶融合蛋白中引入、减少或消除糖基化(例如,N-连接或O-连接的

糖基化)并且使用本领域的常规方法确定糖基化状态中的这种改变是否增加或减少优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶活性或血清半衰期完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0206] 在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白可包含改变的糖型(例如,低岩藻糖基化或无岩藻糖的聚糖)。

[0207] 在一些实施方案中,具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白相对于相应的糖基化的优化二核酸酶融合蛋白(例如,其中潜在的N-连接糖基化位点未突变的优化的二核酸酶融合蛋白)具有增加至少约1.5倍,例如至少3倍,至少5倍,至少10倍,至少10倍,至少约20倍,至少约50倍,至少约100倍,至少约200倍,至少约300倍,至少约400倍,至少约500倍,至少约600倍,至少约700倍,至少约800倍,至少约900倍,至少约1000倍,或1000倍或更多倍的血清半衰期。常规的本领域公认的方法可用于确定具有改变的糖基化状态的优化的二核酸酶融合蛋白的血清半衰期。

[0208] 在一些实施方案中,具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白(例如,非糖基化的、去糖基化的或低糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白)保留相应的糖基化优化的二核酸酶融合蛋白(例如,其中潜在的N-连接的糖基化位点未突变的优化的二核酸酶融合蛋白)的活性的至少50%,例如至少60%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.5%或100%。

[0209] 在一些实施方案中,改变优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化状态可以通过直接增加酶活性或通过提高生物利用度(例如,血清半衰期)来提高核酸酶活性。因此,在一些实施方案中,具有改变的糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白的核酸酶活性相对于相应的糖基化的优化二核酸酶融合蛋白(例如,其中潜在的N-连接糖基化位点未突变的优化的二核酸酶融合蛋白)增加至少1.3倍,例如至少1.5倍,至少2倍,至少2.5倍,至少3倍,至少3.5倍,至少4倍,至少4.5倍,至少5倍,至少5.5倍,至少6倍,至少6.5倍,至少7倍,至少7.5倍,至少8倍,至少8.5倍,至少9倍,至少9.5倍,或10倍或更多。

[0210] 本领域技术人员可以使用本领域公认的方法容易地确定优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化状态。在优选的实施方案中,使用质谱法测定糖基化状态。在其他实施方案中,可以评估与伴刀豆球蛋白A(Con A)的相互作用以确定优化的二核酸酶融合蛋白是否是低糖基化的。与相应的糖基化的优化二核酸酶融合蛋白相比时,预期低糖基化的优化的二核酸酶融合蛋白表现出与Con A-琼脂糖的结合降低。SDS-PAGE分析也可用于比较低糖基化蛋白和相应糖基化蛋白的迁移率。与糖基化蛋白相比,预期低糖基化的蛋白在SDS-PAGE中具有更大的迁移率。用于分析蛋白糖基化状态的其他合适的本领域公认的方法公开在例如Roth等,International Journal of Carbohydrate Chemistry 2012;1-10中。

[0211] 可以使用常规方法测定具有不同糖基化状态的优化的二核酸酶融合蛋白的药代动力学如血清半衰期,例如,通过在小鼠中引入优化的二核酸酶融合蛋白(例如,静脉内),在预定的时间点采集血液样品,并测定和比较样品中优化的二核酸酶融合蛋白的水平和/或酶活性。

[0212] 药物组合物

[0213] 在某些实施方案中,单独施用优化的二核酸酶融合蛋白。在某些实施方案中,在施用至少一种其他治疗剂之前施用优化的二核酸酶融合蛋白。在某些实施方案中,优化的二

核酸酶融合蛋白与至少一种其他治疗剂的施用同时施用。在某些实施方案中,在施用至少一种其他治疗剂之后施用优化的二核酸酶融合蛋白。在其他实施方案中,在施用至少一种其他治疗剂之前施用优化的二核酸酶融合蛋白。如本领域技术人员所理解的,在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白与其他药剂/化合物组合。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白和其他药剂同时施用。在一些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白和其他药剂不同时施用,其中优化的二核酸酶融合蛋白在施用药剂之前或之后施用。在一些实施方案中,受试者在预防疾病发生的同时和/或在治疗期间接受优化的二核酸酶融合蛋白和其他药剂两者。

[0214] 本发明的药物组合物可以在联合疗法中,即与其他药剂组合施用。在某些实施方案中,联合疗法包含与至少一种其他药剂组合的优化的二核酸酶融合蛋白。药剂包括但不限于体外合成制备的化学组合物、抗体、抗原结合区及其组合和缀合物。在某些实施方案中,药剂可以用作激动剂、拮抗剂、变构调节剂或毒素。

[0215] 在某些实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含优化的二核酸酶融合蛋白以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0216] 在某些实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含优化的二核酸酶融合蛋白和治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0217] 在某些实施方案中,可接受的制剂材料优选在所用剂量和浓度下对接受者是非毒性的。在一些实施方案中,制剂材料用于s.c.和/或I.V.施用。在某些实施方案中,药物组合物可含有用于改变、维持或保持例如pH、重量摩尔渗透压浓度、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或组合物的渗透的制剂材料。在某些实施方案中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸)；抗菌剂；抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠)；缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸)；填充剂(如甘露醇或甘氨酸)；螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA))；络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精)；填料；单糖；双糖；和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精)；蛋白质(如明胶蛋白)；着色剂、调味剂和稀释剂；乳化剂；亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)；低分子量多肽；成盐抗衡离子(如钠)；防腐剂(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢)；溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇(如甘露醇或山梨糖醇)；悬浮剂；表面活性剂或润湿剂(如pluronics、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙星)；稳定性增强剂(如蔗糖或山梨糖醇)；张力增强剂(如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾,甘露醇山梨糖醇)；递送介质；稀释剂；赋形剂和/或药物佐剂。(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R.Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995))。在一些实施方案中,制剂包含PBS; 20mM NaOAC, pH 5.2, 50mM NaCl和/或10mM NaOAC, pH 5.2, 9%蔗糖。

[0218] 在某些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白和/或治疗分子与本领域已知的半衰期延长媒介连接。此类媒介包括但不限于聚乙二醇、糖原(例如,优化的二核酸酶融合蛋白的糖基化)和葡聚糖。此类媒介描述于例如,在美国专利申请序列No. 09/428,082,现美国

专利号6,660,843和公开的PCT申请No.WO 99/25044中。

[0219] 在某些实施方案中,本领域技术人员将根据例如预期的施用途径、递送形式和所需剂量确定最佳药物组合物。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。在某些实施方案中,此类组合物可影响本发明抗体的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0220] 在某些实施方案中,药物组合物中的主要媒介或载体性质上可以是水性或非水性的。例如,在某些实施方案中,合适的媒介或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人造脑脊髓液,可能补充有肠胃外施用的组合物中常见的其他材料。在一些实施方案中,盐水包含等渗磷酸盐缓冲盐水。在某些实施方案中,药物组合物包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液,或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,其可进一步包括山梨糖醇或其合适的替代物。在某些实施方案中,通过将具有所需纯度水平的所选组合物与冻干饼或水溶液形式的任选的制剂试剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,同上)相混合可制备包含优化的二核酸酶融合蛋白(有或没有至少一种另外的治疗剂)的组合物。此外,在某些实施方案中,可以使用合适的赋形剂例如蔗糖将包含优化的二核酸酶融合蛋白的组合物(有或没有至少一种另外的治疗剂)配制为冻干物。

[0221] 在某些实施方案中,药物组合物可以选择用于肠胃外递送。在某些实施方案中,组合物可以选择用于吸入或通过消化道递送,例如口服。这种药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的能力范围内。

[0222] 在某些实施方案中,制剂组分以对于施用部位可接受的浓度存在。在某些实施方案中,使用缓冲剂将组合物维持在生理pH或略低的pH,通常在约5至约8的pH范围内。

[0223] 在某些实施方案中,当考虑肠胃外施用时,治疗组合物可以是无热原的、肠胃外可接受的水溶液的形式,其在药学上可接受的媒介中包含所需的优化二核酸酶融合蛋白而有或没有另外的治疗剂。在某些实施方案中,用于肠胃外注射的媒介是无菌蒸馏水,其中将优化的二核酸酶融合蛋白(有或没有至少一种另外的治疗剂)配制为适当保存的无菌等渗溶液。在某些实施方案中,制剂可以包括用以提供产品的受控或持续释放的试剂配制所需分子,所述试剂例如可注射微球、生物可蚀颗粒、聚合化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或脂质体,然后产品可以通过积存注射递送。在某些实施方案中,也可以使用透明质酸,并且可以具有促进循环中的维持持续时间的作用。在某些实施方案中,可植入的药物递送装置可用于引入所需分子。

[0224] 在某些实施方案中,可配制药物组合物用于吸入。在某些实施方案中,可以将具有或不具有至少一种另外的治疗剂的优化的二核酸酶融合蛋白配制为用于吸入的干粉。在某些实施方案中,包含优化的二核酸酶融合蛋白的吸入溶液(有或没有至少一种另外的治疗剂)可以用推进剂配制用于气溶胶递送。在某些实施方案中,溶液可以雾化。肺部施用进一步描述于PCT申请no.PCT/US94/001875中,其描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0225] 在某些实施方案中,预期制剂可以口服施用。在某些实施方案中,以这种方式施用的优化的二核酸酶融合蛋白(具有或不具有至少一种另外的治疗剂)可以用或不用通常用于固体剂型如片剂和胶囊的配制的那些载体配制。在某些实施方案中,胶囊可以设计成当生物利用度最大化并且使系统前降解最小化时在胃肠道中的点释放制剂的活性部分。在某些实施方案中,可包括至少一种另外的试剂以促进优化的二核酸酶融合蛋白和/或任何另

外的治疗剂的吸收。在某些实施方案中,还可以使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0226] 在某些实施方案中,药物组合物可以包括在与适合制备片剂的无毒赋形剂的混合物中的有效量的优化的二核酸酶融合蛋白,其具有或不具有至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中,通过将片剂溶解在无菌水或另一种合适的媒介中,溶液可以以单位剂量型制备。在某些实施方案中,合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0227] 另外的药物组合物对于本领域技术人员而言是显而易见的,包括涉及在持续或控制递送制剂中的优化的二核酸酶融合蛋白(有或没有至少一种另外的治疗剂)的制剂。在某些实施方案中,用于配制各种其他持续或控制递送方式的技术,例如脂质体载体、生物可蚀微粒或多孔珠粒和积存注射,也是本领域技术人员已知的。参见例如PCT申请号PCT/US93/00829,其描述了用于递送药物组合物的多孔聚合物微粒的受控释放。在某些实施方案中,持续释放制剂可包括成形制品(例如,膜或微胶囊)形式的半渗透性聚合物基质。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚交酯(美国专利号3,773,919和EP 058,481)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman等,Biopolymers,22:547-556(1983))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等,J Biomed Mater Res,15:167-277(1981)和Langer,Chem Tech,12:98-105(1982))、乙烯醋酸乙烯酯(Langer等,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。在某些实施方案中,持续释放组合物还可包括脂质体,其可通过本领域已知的几种方法中的任一种制备。参见,例如,Eppstein等,PNAS,82:3688-3692(1985);EP 036,676;EP 088,046和EP 143,949。

[0228] 用于体内施用的药物组合物通常是无菌的。在某些实施方案中,这可以通过无菌过滤膜的过滤来完成。在某些实施方案中,其中组合物是冻干的情况下,使用该方法的灭菌可以在冻干和重构之前或之后进行。在某些实施方案中,用于肠胃外施用的组合物可以冻干形式或在溶液中储存。在某些实施方案中,肠胃外组合物通常置于具有无菌进入口的容器中,例如具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0229] 在某些实施方案中,一旦配制了药物组合物,其可以作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或作为脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。在某些实施方案中,此类制剂可以以即用形式或以在给药前重构的形式(例如,冻干的)储存。

[0230] 在某些实施方案中,提供了用于产生单剂量施用单位的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒可包含具有干燥蛋白质的第一容器和具有含水制剂的第二容器。在某些实施方案中,包括含有单室和多室预填充注射器(例如,液体注射器和冻干注射器(lyosyringe))的试剂盒。

[0231] 在某些实施方案中,治疗上使用的包含优化的二核酸酶融合蛋白(有或没有至少一种另外的治疗剂)的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域技术人员将理解,根据某些实施方案,用于治疗的合适剂量水平因此将部分地根据递送的分子、优化的二核酸酶融合蛋白(有或没有至少一个另外的治疗剂)正在使用的适应症、施用途径和患者的体形(体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)变化。在某些实施方案中,临床医生可以测定剂量并改变给药途径以获得最佳治疗效果。在某些实施方案中,取

决于上述因素,典型剂量范围可以为约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至最高约100 mg/kg 或更高。在某些实施方案中,剂量范围可以为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg ;或1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg ;或5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg 。

[0232] 在某些实施方案中,给药频率将考虑所用制剂中优化的二核酸酶融合蛋白和/或任何其他治疗剂的药代动力学参数。在某些实施方案中,临床医生将施用组合物直至达到实现所需效果的剂量。在某些实施方案中,组合物因此可以作为单剂量施用,或随时间作为两个或更多个剂量(其可以包含或不包含相同量的所需分子)施用,或作为通过植入装置或导管的连续输注施用。适宜剂量的进一步优化是本领域普通技术人员常规进行的,并且在他们常规执行的任务范围内。在某些实施方案中,可以通过使用适当的剂量-反应数据确定合适的剂量。

[0233] 在某些实施方案中,药物组合物的施用途径与已知方法一致,例如,口服、通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、皮下、眼内、动脉内、门脉内或病灶内途径的注射;通过持续释放系统或通过植入装置。在某些实施方案中,组合物可以通过浓注施用或通过输注或者通过植入装置连续施用。

[0234] 在某些实施方案中,组合物可以通过植入所需的分子已被吸收或包封在其上的膜、海绵或另一适当的材料局部施用。在其中使用植入装置的某些实施方案中,可以将装置植入任何合适的组织或器官中,并且可以通过扩散、定时释放推注或连续施用来递送所需分子。

[0235] 在某些实施方案中,可能需要以离体方式使用包含优化的二核酸酶融合蛋白(具有或不具有至少一种另外的治疗剂)的药物组合物。在这些情况下,将已从患者取出的细胞、组织和/或器官暴露于包含优化的二核酸酶融合蛋白(其具有或不具有至少一种另外的治疗剂)的药物组合物,之后细胞、组织和/或器官随后植入回到患者体内。

[0236] 在某些实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白和/或任何另外的治疗剂可以通过使用如本文所述的那些的方法植入已经遗传工程化的某些细胞以表达和分泌多肽来递送。在某些实施方案中,此类细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体的、异源的或异种的。在某些实施方案中,细胞可以是永生化的。在某些实施方案中,为了降低免疫应答的机会,可以将细胞包封以避免周围组织的渗透。在某些实施方案中,包封材料通常是生物相容的、半透性的聚合物外壳或膜,其允许蛋白质产物的释放但防止患者免疫系统或来自周围组织的其他有害因子破坏细胞。

[0237] 体外分析

[0238] 可以使用本领域已知的各种体外测定来评估本发明的优化的二核酸酶融合蛋白的功效。

[0239] 例如,在存在或不存在优化的二核酸酶融合蛋白的情况下,来自正常人的培养的人PBMC或狼疮患者PBMC被分离、培养和用各种刺激物(例如,TLR配体、共刺激抗体、免疫复合物和正常或自身免疫血清)处理。刺激的细胞的细胞因子产生可以使用市售试剂测量,例如来自Biologend (San Diego, CA) 的用于各种细胞因子(例如,IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、IFN- γ 和TNF- α)的抗体对试剂盒。在适合于测定的各个不同时间点(例如,24、48小时或更晚的时间点)收获培养物上清液以确定优化的二核酸酶融合蛋白对细胞因子产生的影响。使用例如抗-人IFN- α 抗体和可从PBL干扰素源(Piscataway, NJ)获得的标准曲线试剂测量

IFN- α 产生。使用人淋巴细胞亚群(分离的单核细胞、B细胞、pDC、T细胞等)进行类似的测定;使用例如购自Miltenyi Biotech(Auburn, CA)的市售的基于磁珠的分离试剂盒进行纯化。

[0240] 通过在使用常规的本领域公认的方法刺激后的各个时间点测量PBMC或分离的细胞亚群中淋巴细胞活化受体如CD5、CD23、CD69、CD80、CD86和CD25的表达,多色流式细胞术可用于评估优化的二核酸酶融合蛋白对免疫细胞活化的影响。

[0241] 优化的二核酸酶融合蛋白的功效还可以通过将SLE患者血清与正常人pDC一起孵育来激活IFN输出而测试,如例如Ahlin等,Lupus2012;21:586-95;Mathsson等,Clin Expt Immunol 2007;147:513-20和Chiang等,J Immunol 2011;186:1279-1288中所述的。不受理论束缚,SLE患者血清中含循环核酸的免疫复合物通过Fc受体介导的内吞作用促进核酸抗原进入pDC核内体中,然后该核酸结合并激活核内体TLR 7、8和9。为了评估优化的二核酸酶融合蛋白的影响,SLE患者血清或血浆用优化的二核酸酶融合蛋白预处理,然后添加到从健康志愿者分离的pDC细胞培养物中。然后在多个时间点确定产生的IFN- α 的水平。通过降解含核酸的免疫复合物,预期有效的优化二核酸酶融合蛋白减少产生的IFN- α 的量。

[0242] 优化的二核酸酶融合蛋白的有效性通过比较用本文公开的优化的二核酸酶融合蛋白处理的细胞的测定结果与用对照制剂处理的细胞的测定结果来证明。在处理后,相对于治疗前存在的标志物水平或相对于在对照组中测量的水平,上述各种标志物(例如,细胞因子、细胞表面受体、增殖)的水平在有效的优化二核酸酶融合蛋白处理组中通常得到改善。

[0243] 治疗方法

[0244] 本发明的优化的二核酸酶融合蛋白在治疗自身免疫疾病或异常免疫应答中特别有效。在这一点,应当理解,本公开的优化的二核酸酶融合蛋白可用于控制、抑制、调节、治疗或消除对外部和自身抗原两者的不需要的免疫应答。

[0245] 在另一方面,优化的二核酸酶融合蛋白适应于通过以治疗有效量或足够的量对需要的哺乳动物施用优化的二核酸酶融合蛋白来预防(预防性的)或治疗(治疗性的)哺乳动物中的疾病或病症,例如自身免疫疾病,其中疾病被预防或治疗。本发明考虑了适合于实现所需效果的任何施用途径(例如,静脉内、肌肉内、皮下)。疾病状况的治疗可导致与病症相关的症状减轻,这可能是长期或短期的,甚至是瞬时的有益效果。

[0246] 许多疾病状况适合于用本公开的优化的二核酸酶融合蛋白进行治疗。例如,在一些方面,疾病或病症是自身免疫疾病或癌症。在一些这样的方面,自身免疫疾病是胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、类风湿性关节炎、实验性自身免疫性关节炎、重症肌无力、甲状腺炎、葡萄膜炎的实验形式、桥本氏甲状腺炎、原发性粘液性水肿、甲状腺毒症、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、艾迪生病、过早绝经、男性不育、青少年糖尿病、Goodpasture综合征、寻常型天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、晶状体源性葡萄膜炎、自身免疫性溶血性贫血、特发性白细胞减少症、原发性胆汁性肝硬化、活动性慢性肝炎Hbs-ve,隐源性肝硬化、溃疡性结肠炎、干燥综合征、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、多发性肌炎、皮肌炎、盘状LE、SLE或结缔组织病。

[0247] 在一个具体实施方案中,优化的二核酸酶融合蛋白用于预防或治疗SLE或干燥综合征。通过比较用本文公开的优化的二核酸酶融合蛋白治疗的哺乳动物与用对照制剂治疗的哺乳动物中的IFN- α 水平、IFN- α 反应基因水平、自身抗体滴度、肾功能和病理学和/或循

环免疫复合物水平来证明优化的二核酸酶融合蛋白的效力。

[0248] 例如,选择或鉴别需要治疗的人类受试者(例如,满足American College of Rheumatology的SLE标准的患者,或满足American-European Consensus Sjogren's Classification Criteria的患者)。受试者可能需要例如减轻SLE或干燥综合征的病因或症状。受试者的鉴别可以在临床环境中或其他地方进行,例如,通过受试者自己使用自我测试试剂盒在受试者的家中进行。

[0249] 在时间零点,向受试者施用合适的第一剂量的优化的二核酸酶融合蛋白。优化的二核酸酶融合蛋白如本文所述配制。在第一剂量后的一段时间后,例如7天、14天和21天,评估受试者的状况,例如通过测量IFN- α 水平、IFN- α 反应基因水平、自身抗体滴度、肾功能和病理学和/或循环免疫复合物水平。还可以测定其他相关标准。剂量的数量和强度根据受试者的需要进行调整。治疗后,受试者的IFN- α 水平、IFN- α 反应基因水平、自身抗体滴度、肾功能和病理学和/或循环免疫复合物水平相对于治疗前治疗前存在的水平或者相对于在类似患病但未治疗的/对照的受试者中测量的水平降低和/或改善。

[0250] 在另一个实例中,选择或鉴别需要治疗的啮齿动物受试者(参见,例如,实施例7)。受试者的鉴别可以在实验室环境中或其他地方进行。在时间零点,向受试者施用合适的第一剂量的优化的二核酸酶融合蛋白。优化的二核酸酶融合蛋白如本文所述配制。在第一剂量后的一段时间后,例如7天、14天和21天,评估受试者的状况,例如通过测量IFN- α 水平、IFN- α 反应基因水平、自身抗体滴度、肾功能和病理学和/或循环免疫复合物水平。还可以测定其他相关标准。剂量的数量和强度根据受试者的需要进行调整。

[0251] 治疗后,受试者的IFN- α 水平、IFN- α 反应基因水平、自身抗体滴度、肾功能和病理学和/或循环免疫复合物水平相对于治疗前存在的水平或者相对于在类似患病但未治疗的/对照的受试者中测量的水平降低和/或改善。

[0252] 本发明的另一方面是使用基因治疗方法而用一种或多种优化的二核酸酶融合蛋白治疗或预防障碍、疾病和病症。基因治疗方法涉及将优化的二核酸酶融合蛋白核酸(DNA、RNA和反义DNA或RNA)序列引有需要的动物中以实现本公开的一种或多种多肽的表达。该方法可以包括引入一种或多种编码本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的多核苷酸,其可操作地与启动子和靶组织表达多肽所必需的任何其他遗传元件偶联。

[0253] 在基因治疗应用中,将优化的二核酸酶融合蛋白基因引入细胞中以实现治疗有效的遗传产物的体内合成。“基因疗法”包括其中通过单次治疗实现持久效果的常规基因疗法及基因治疗剂的施用(其涉及一次或重复施用治疗有效的DNA或mRNA)。可以修饰寡核苷酸以增强它们的摄取,例如通过用不带电的基团取代它们的带负电荷的磷酸二酯基团。

[0254] 实施例

[0255] 以下是用于实施本发明的具体实施方案的实施例。提供这些实施例仅用于说明目的,并不意图以任何方式限制本发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是当然应该允许一些实验误差和偏差。

[0256] 除非另有说明,本发明的实施将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。这些技术在文献中有充分说明。参见,例如T.E.Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H.Freeman and Company, 1993); A.L.Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current

addition); Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick和N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)。

[0257] 实施例1

[0258] 产生优化的二核酸酶融合蛋白的编码表达载体

[0259] 本公开的优化的二核酸酶融合蛋白的各种实施方案显示在图1中,其中每个的氨基酸序列呈现在序列表格中。作为示例性的优化的二核酸酶融合蛋白,构建了具有图1所示构型的二核酸酶融合蛋白。具体地,从优化的二核酸酶融合蛋白的氨基酸序列开始,使用Genescrypt (Genescrypt, Piscataway, N.J.) 的密码子优化直接合成编码优化的二核酸酶融合蛋白的多核苷酸以使得在哺乳动物细胞中最佳表达。优化的过程涉及,例如,在可能时避免GC含量非常高 (>80%) 或非常低 (<30%) 的区域,并避免顺式作用序列基序,如内部TATA盒、chi-位点和核糖体进入位点、富AT或富GC的序列延伸、RNA不稳定性基序、重复序列和RNA二级结构以及高等真核生物中的隐性剪接供体和受体位点。将编码优化的二核酸酶融合蛋白的DNA克隆到pcDNA3.1+哺乳动物表达载体中。产生具有以下构型的优化的二核酸酶融合蛋白。

[0260] 串联同型二聚体RSLV-145 (SEQ ID NO:1) 具有DNase-接头-RNase-Fc的构型,其中野生型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 在没有接头的情况下可操作地偶联至包含SCC铰链和CH2突变P238S, P331S的突变Fc区 (SEQ ID NO:55) 的N-末端,和突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 通过NLG接头 (SEQ ID NO:41) 可操作地偶联至RNase1结构域的N-末端。

[0261] 为了优先形成异二聚体,以下构建体中的每个Fc结构域包括互补的CH3突变: T350V、L351Y、F405A和Y407V; 及T350V、T366L、K392L和T394W (根据EU索引编号。)

[0262] 串联异二聚体RSLV-147具有DNase-Fc (SEQ ID NO:3) 和RNase-Fc (SEQ ID NO:4) 的构型,其中突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 可操作地偶联至包含SCC铰链、CH2突变P238S、P331S及CH3突变的第一突变Fc区的N-末端,并且其中野生型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 可操作地偶联至包含SCC铰链、CH2突变P238S、P331S及CH3突变的第二突变Fc区的N-末端。

[0263] 异二聚体RSLV-148具有构型DNase-第一Fc结构域-接头-RNase (SEQ ID NO:5) 和包含CH2突变P238S、P331S及CH3突变的突变体第二Fc结构域 (N-末端截短,包括CCC铰链中的第一半胱氨酸) (SEQ ID NO:6),其中突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 可操作地偶联至包含SCC铰链、CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第一突变Fc区的N-末端,并且其中野生型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 经由NLG接头可操作地偶联至第一Fc区的C-末端。

[0264] 异二聚体RSLV-149具有DNase-Fc (SEQ ID NO:7) 和Fc-接头-RNase (SEQ ID NO:8) 的构型,其中突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 可操作地偶联至包含SCC铰链、CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第一突变Fc区的N-末端,并且其中野生型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 通过NLG接头可操作地偶联至包含CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第二突变Fc区的C-末端 (SEQ ID NO:6)。

[0265] 异二聚体RSLV-152具有构型RNase-第一突变Fc-接头-DNase (SEQ ID NO:13) 和包

含CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第二突变Fc结构域 (SEQ ID NO:14) ,其中野生类型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 可操作地偶联至包含SCC铰链和CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第一突变Fc区的N-末端,并且其中突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 经由NLG接头可操作地偶联至第一突变Fc区的C-末端。

[0266] 异二聚体RSLV-153具有Fc-接头-DNase (SEQ ID NO:15) 和RNase-Fc (SEQ ID NO:16) 的构型,其中突变体人DNase1结构域 (SEQ ID NO:25) 通过NLG接头可操作地偶联至包含CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第一突变Fc区的C-末端,并且其中野生型人RNase1结构域 (SEQ ID NO:27) 可操作地偶联至包含SCC铰链、CH2突变P238S、P331S和CH3突变的第二突变Fc区的N-末端。

[0267] 构建体RLSV-327 (含有与人血清白蛋白连接的RNase 1和DNase1的二核酸酶; RNase-接头-HSA-接头-DNase E13R/N74K/A114F/T205K) 和RSLV-132 (RNase-Fc) (含有DNase和RNase部分) 用作对照。

[0268] 实施例2

[0269] 表达优化的二核酸酶融合蛋白的稳定的哺乳动物细胞系的瞬时表达

[0270] 对于瞬时表达,使用FreeStyleTM MAX Reagent将含有优化的二核酸酶融合蛋白插入物的来自实施例1的表达载体使用制造商推荐的转染方案瞬时转染到中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中,例如CHO-S细胞(例如,FreeStyleTM CHO-S细胞,Invitrogen)。将CHO-S细胞维持在含有2mM L-谷氨酰胺和青霉素-链霉素的FreeStyleTM CHO表达培养基中。

[0271] 使用本领域已知的常规方法产生表达优化的二核酸酶融合蛋白的稳定CHO-S细胞系。例如,CHO-S细胞可以用包含优化的二核酸酶融合蛋白的核酸序列以及编码标志物(例如,GFP、可通过磁珠选择的表面标志物) (其使用例如流式细胞术或磁珠分离(例如,MACSelectTM系统)选择) 的核酸序列的病毒(例如,逆转录病毒、慢病毒)感染。或者,CHO-S细胞使用本领域已知的任何转染方法(例如电穿孔(Lonza)或如上所述的FreeStyleTM MAX Reagent)及包含优化的二核酸酶融合蛋白的核酸序列和选择标记的载体转染,然后使用例如流式细胞术进行选择。选择标记可以加入与编码优化的二核酸酶融合蛋白相同的载体或单独的载体中。

[0272] 通过使用填充有蛋白-A琼脂糖珠的柱捕获分子,然后在柱洗涤缓冲液(例如,90mM Tris,150mM NaCl,0.05%叠氮化钠)中洗涤并使用合适的洗脱缓冲液(例如,0.1M柠檬酸盐缓冲液,pH 3.0)从柱释放分子,从培养物上清液纯化优化的二核酸酶融合蛋白。通过使用Centricon浓缩器在PBS中通过系列离心的缓冲液交换,然后通过0.2μm过滤装置过滤来进一步浓缩洗脱的材料。使用标准分光光度法(例如Bradford,BCA,Lowry,Biuret assay)测定优化的二核酸酶融合蛋白的浓度。

[0273] 实施例3

[0274] 纯化的优化二核酸酶融合蛋白的核酸酶活性

[0275] 分析了存在于小鼠血清中的优化的二核酸酶融合蛋白的RNase活性。蛋白质在pH 7.3的50mM Hepes和100mM NaCl中以12.5-100ng至2.5mg/ml的poly-IC (Sigma) 的剂量添加,并在37°C下孵育50分钟。加入TCA至5%的终浓度并置于冰上。过滤样品以除去沉淀物,并收集滤液用于OD₂₆₀读数。结果显示在图2中。RSLV-132和RSLV-145 (两者都含每摩尔当量构建体2个RNase部分) 都是有活性的,RSLV-145比RSLV-132更有活性。每摩尔仅含有一个

RNase部分的其他构建体(RSLV-147、RSLV-152、RSLV-153和RSLV-327)是相当的并且与RSLV-132一致。令人惊讶的是,RSLV-148和RSLV-149具有比RSLV-132和其他单一RNase构建体更高的活性。这些构建体各自含有连接在Fc结构域的C-末端的RNase部分。

[0276] 使用ODN-2006-G5(InvivoGen, t1rl-2006g5),一种TLR9的DNA寡核苷酸激动剂,测量含有DNase1结构域的优化的二核酸酶融合蛋白的DNase1活性。将剂量范围为0.24ng/ml至500ng/ml的蛋白质在37°C下在含有25mM Hepes和10% FBS的DMEM中与ODN-2006-G5一起孵育1小时。将反应混合物应用于hTLR9 HEKBlue细胞(其经工程化以响应于TLR9激动剂而分泌碱性磷酸酶(SEAP))在37°C下过夜。收获培养基并使用比色底物测定SEAP,和然后在OD₆₂₀下读数。使用GraphPad Prism[®]版本6.0e软件计算IC50值。结果如图3所示。所有6种构建体(RSLV-145、RSLV-147、RSLV-148、RSLV-149、RSLV-152和RSLV-153)具有强大的DNase活性,并且比重组huDNase1具有至少5000倍高的活性。RSLV-145似乎比其他异二聚构建体和RSLV-327的活性大约高2倍,可能是由于与其他构建体中的1个DNase结构域相比,RSLV-145中有2个DNase结构域。RSLV-152始终是构建体中最低活性的。

[0277] 实施例4

[0278] 优化的二核酸酶融合蛋白的体外效力

[0279] 优化的二核酸酶融合蛋白对细胞因子表达的作用

[0280] 从正常患者和狼疮患者分离人PBMC并进行培养。在具有或不具有实施例2的优化的二核酸酶融合蛋白的情况下,用各种刺激性TLR配体、共刺激抗体、免疫复合物和正常或自身免疫血清处理细胞。在各个不同时间点(例如,6小时、12小时、24小时、48小时等)收集培养上清液,且一组细胞因子(包括人IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、IFN- γ 、IFN- α 和TNF- α)的水平使用来自例如Thermo Fisher Scientific, Inc.的商购可得的ELISA试剂盒测量。有效的优化的二核酸酶融合蛋白预期相对于对照降低受刺激的PBMC产生的细胞因子水平。

[0281] 优化的二核酸酶融合蛋白对淋巴细胞激活受体表达的作用

[0282] 从正常患者和狼疮患者分离人PBMC并进行培养。在具有或不具有实施例2的优化的二核酸酶融合蛋白的情况下,用各种刺激性TLR配体、共刺激抗体、免疫复合物和正常或自身免疫血清处理细胞。然后对细胞进行多色流式细胞分析以使用常规的本领域公认的方法在刺激后的各个不同时间点(例如,6小时、12小时、24小时、48小时等)测量淋巴细胞激活受体CD5、CD23、CD69、CD80、CD86和CD25的表达。用于这些受体的合适抗体可从例如BD/PharMingen商购获得。预期有效的优化的二核酸酶融合蛋白相对于对照减少刺激的PBMC中淋巴细胞激活受体的表达。

[0283] 优化的二核酸酶融合蛋白对浆细胞样树突状细胞(pDC)干扰素输出的作用

[0284] 使用本领域公认的方法或市售试剂盒如EasySep[™] Human EpCAM Positive Selection Kit(StemCell Technologies, Inc.)分离来自健康志愿者的pDC。将分离的pDC在例如96孔平底板中,在0.1m的适当培养基(例如,含有10% FBS, 2mM谷氨酰胺, 55 μ M β -巯基乙醇, 1mM丙酮酸钠, 100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的完全RPMI培养基)中培养,密度范围为5 \times 10⁴至2.5 \times 10⁵/孔。通过添加用培养基以1:5比例稀释的来自个体SLE患者的血清或血浆来激活培养的pDC,并将0.1ml的这些样品加入到含细胞的孔中(最终患者血清浓度为10%)。将培养物在37°C下孵育40小时,之后收获条件培养基并使用市售ELISA试剂盒评估IFN α 含量。从健康志愿者获得的血清样品用作对照。为了评估优化的二核酸酶融合蛋白的

影响,用优化的二核酸酶融合蛋白(1-10 μ g/ml)预处理SLE患者血清或血浆30分钟并加入到pDC培养物中。预期有效的优化的二核酸酶融合蛋白减少由于含核酸IC的降解而产生的IFN α 的量。

[0285] *****

[0286] 虽然已经参考优选实施方案和各种替换实施方案具体示出和描述了本发明,但是相关领域的技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

[0287] 出于所有目的,在本说明书的主体中引用的所有参考文献、授权专利和专利申请均通过引用整体并入本文。

[0288] 序列表格

SEQ ID NO	说明	序列	
[0289]	1 RSLV-145 (DNase-NLG 接头 -RNase-Fc)氨基酸 序列 成熟人 DNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K(下划线) NLG 接头(黑体) 成熟人 RNase1(黑 体下划线) Fc 结构域	LKIAAFNIQTGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR <u>D</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>G</u> R K S Y K E <u>Y</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> A K P T H C A Y D R I V V A G M L R G A V V P D S A L P F <u>F</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>M</u> L K V D G A S P V N V S <u>S</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>D</u> I K E S R A K K F O R Q H M D S D S P S S S T Y C N Q M M R R <u>M</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>G</u> 2 RSLV-146 (Fc-接头 -RNase-NLG 接头 -DNase)氨基酸序列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u> K G G G S K E <u>R</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> F O R Q H M D S D S P S S S T Y C N Q M M R R <u>M</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>T</u> V D G A S P V N V S P S V Q D I L K I A F N I Q T G R <u>K</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> G R K S Y K E <u>R</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>A</u>

[0290]

		<u>DSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFI</u> <u>VRFFSRFTEVREFAI</u> <u>VPL</u> <u>HAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQE</u> <u>KWGLEDVMLMGDFN</u> <u>AGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTA</u> <u>KPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA</u> <u>YGLSDQLAQAI</u> <u>SDHYPVEVMLK</u>
3	RSLV-147 DNase 链(Dnase-FcA)氨基酸序列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYSKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFI</u> <u>VRFF</u> <u>SRFTEVREFAI</u> <u>VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQE</u> <u>KW</u> <u>GLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP</u> <u>DSADTTA</u> <u>KPTHCA</u> <u>YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQ</u> <u>AA</u> <u>YGLSDQLAQAI</u> <u>SDHYPVEVMLKEPKSSDKTHTCPPCP</u> <u>AP</u> <u>ELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNA</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSC</u> <u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
4	RSLV-147 RNase 链(RNase-FcB)氨基酸序列	<u>KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYC</u> <u>NQMMRRRNMTQG</u> <u>RCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTC</u> <u>NGQGNCYKSN</u> <u>SSM</u> <u>HITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII</u> <u>VACEGSPYVP</u> <u>VHFDASVEDSTE</u> <u>PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVE</u> <u>VHNA</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>C</u> <u>KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSRDELTKN</u> <u>QVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYLTWPPVLD</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u>
5	RSLV-148 (DNase-FcA-NLG 接头-RNase)氨基酸序列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DH</u> <u>LTAVGKLLD</u> <u>NQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYSKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT</u> <u>FNREPFI</u> <u>VRFFSRFTEVREFAI</u> <u>VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQE</u> <u>KWGL</u> <u>VMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP</u> <u>DSADTTA</u> <u>KPTHCA</u> <u>YDRIVV</u> <u>AGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA</u> <u>YGLSDQLAQAI</u> <u>SDHYPVEVMLKEPKSSDKTHT</u> <u>CPPCPAPEL</u> <u>LLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYV</u> <u>DGVEVHNA</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>ENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>SLSPGKVDGASSPVNVSSPSVQDI</u> <u>KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYC</u> <u>NQMM</u> <u>RRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTC</u> <u>NGQGNCYKSNSSMHTDC</u> <u>RLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII</u> <u>VACEGSPYVP</u> <u>HFDASVEDST</u>
6	RSLV-148 FcB 链氨基酸序列	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNA</u> <u>TKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIA</u>

		VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	RSLV-149 DNase 链(DNase-Fc)氨基 酸序列	<u>LKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDN</u> <u>LNQDAPDTYHYVSEPLGRSKYKERYLFVYRPDQSAVDSYYDDGCEPCGNNDT</u> <u>FNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLAHPGDAVAEIDALYDVYLDQEKWGLLED</u> <u>VMLMGDFNAGCSYVRPSQSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIVV</u> <u>AGMLLRGAVVPPDSALPFDQAAYGLSDQLAQAIQSDHYPVEVMLKEPKSSDKTHT</u> <u>CPPCPAPELLGGSSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGK</u>
8	RSLV-149 RNase 链 (Fc-NLG-接头 -RNase)氨基 酸序列	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVDGASSPV</u> <u>NVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDSDSSPSSSTYCNOM</u> <u>MRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCKN</u> <u>GQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII</u> <u>VACEGSPYVPVHFDASVEDST</u>
[0291]	9 RSLV-150 DNase 链(FcA-NLG 接头 -DNase)氨基 酸序列	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGKVDGASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNAT</u> <u>LVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRK</u> <u>SYKERYLFVYRPDQSAVDSYYDDGCEPCGNNDTFRNREPFIVRFFSRFTEVREF</u> <u>AIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS</u> <u>SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPPDSALPFDQ</u> <u>AAYGLSDQLAQAIQSDHYPVEVMLK</u>
10	RSLV-150 RNase 链 (FcB-NLG 接头 -RNase)氨基 酸序列	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVDG</u> <u>ASSPVNVSSPSVQDIKESRAKKFOROHMDSDSSPSSSTYCNOM</u> <u>VTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHII</u> <u>VACEGSPYVPVHFDASVEDST</u>
11	RSLV-151 DNase 链(Fc-NLG 接头 -DNase)氨基 酸序列	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVDGASSPVNVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGRTKMSNATLVSYI</u>

		<u>VQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYV/SEPLGRKSYKER YLFVYRPDQSAVDSDYYDDGCEPCGNDTFNREPFTVRRFSRTEVREFAI HAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLW TSPTFQWLIPDSADTTAKPTHACYDRIVVAGMLLRGAVVPSALPFNQAA SDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
12	RSLV-151 RNase 链 (Fc-NLG 接头 -RNase)氨基酸序列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPVYVLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGKVDGASSPV NVSSPSVQDIKESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYCNQM MRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKTCKN GQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAVRTSPKERHII VACEGSPYVPVHFDASVEDST
13	RSLV-152 (RNase-Fc-NLG 接 头-DNase)氨基酸序 列	<u>KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYCNQMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDV QNVCFQEKTCKNGQGNCYKSNSSMHITDCRLTNGSRYPNCAVRTSPKERHII ACEGSPYVPVHFDASVEDSTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPVYVYPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLT VDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGKVDGASSPVNVSSPSVQDI LKIAAFNIQTGRTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDN LNQDAPDTYHYV/SEPLGRKSYKERYLFVYRPDQSAVDSDYYDDGCEPCGNDT FNREPFTVRRFSRTEVREFAIPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKGLED VMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPFQWLIPDSADTTAKPTHACYDRIVV AGMLLRGAVVPSALPFNQAAGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
14	RSLV-152 Fc 结构 域链氨基酸序列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPVYVLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
15	RSLV-153 DNase 链(Fc-NLG 接头 -DNase)氨基酸序列	DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRW QQGVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGKVDGASSPV NVSSPSVQDIKIAAFNIQTGRTKMSNATLVSYIVQILSR YDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYV LGRKSYKERYLFVYRPDQSAVDSDYYDDGCEPCGNDT FNREPFTVRRFSRTEVREFAIPLHAAPGDAVAEIDALYD VYLDVQEKGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRL

[0292]

		WTSPTFWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIIVAGMLLRGAV VPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQQAISDHYPVEVMLK
16	RSLV-153 RNase 链 (RNase-Fc)氨基酸 序列	<u>KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYCNO</u> <u>MMRRRNMTQG</u> <u>RCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQE</u> <u>KVTCKNGQGNCYKSN</u> <u>SSMHITDCRLTNGSRYPNCA</u> <u>YRTSPKERHIIVACEGSPYVP</u> <u>VHFDASVEDSTE</u> <u>PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KC</u> <u>KVSNKALPASIEKTISKAKGQ</u> <u>QPREPQVYVLPPSRDELTKN</u> <u>QVSLLCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYLTWPPVLD</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u>
17	RSLV-154 (RNase-Fc-NLG 接 头-DNase)氨基酸序 列	<u>KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSTYCNO</u> <u>MMRRRNMTQG</u> <u>RCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQE</u> <u>KVTCKNGQGNCYKSN</u> <u>SSMHITDCRLTNGSRYPNCA</u> <u>YRTSPKERHIIVACEGSPYVP</u> <u>VHFDASVEDSTELLGGSSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVNLTCLVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG</u> <u>SFFLNSTLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u> <u>VDGASSPVN</u> <u>VSSPSVQDILKIAAFNIQTFGR</u> <u>TKMSNATLVSYIVQILSR</u> <u>DIALVQEVRD</u> <u>SHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVV</u> <u>SEPL</u> <u>GRKSYKERYLFVYRPDQVSA</u> <u>VDSDYYYDDGCEPCGNDTF</u> <u>NREPFI</u> <u>VRFFSRFTEVREFAI</u> <u>VPLHAAPGDAVAEIDALYDV</u> <u>YLDVQE</u> <u>KWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWT</u> <u>SPTFWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVP</u> <u>DSALPFNFQAAYGLSDQLAQQAISDHYPVEVMLK</u>
18	Fc-NLG-接头 -DNase (对照构建 体)	<u>DKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALPASIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWE</u> <u>ESNGQPENNYKTTPPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u> <u>VDGASSPV</u> <u>NVSSPSVQDILKIAAFNIQTFGET</u> <u>KMSNATLVSYIVQILSR</u> <u>YDIALVQEVRD</u> <u>SHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVV</u> <u>SEPL</u> <u>LGRNSYKERYLFVYRPDQVSA</u> <u>VDSDYYYDDGCEPCRNDTF</u> <u>NREPFI</u> <u>VRFFSRFTEVREFAI</u> <u>VPLHAAPGDAVAEIDALYDV</u> <u>YLDVQE</u> <u>KWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWT</u>

[0293]

[0294]

		<u>SPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVP</u> <u>DSALPFNFQAAYGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
19	DNase-Fc (对照构建体)	<u>LKIAAFNIQTFGRKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRKSYKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFF</u> <u>SRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKW</u> <u>GLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP</u> <u>DSADTTAKPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQ</u> <u>AAAYGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLKEPKSSDKHTCPPCP</u> <u>APELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREQ</u> <u>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
20	成熟野生型人 DNase1	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRF</u> <u>FSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEK</u> <u>WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWL</u> <u>IPDSADTTATPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNF</u> <u>QAAYGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
21	成熟人 DNase1 A114F	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRF</u> <u>FSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEK</u> <u>WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWL</u> <u>IPDSADTTATPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNF</u> <u>QAAYGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
22	成熟人 DNase1 G105R	<u>LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR</u> <u>DSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKER</u> <u>YLFVYRPDQVSAVDSYYDDGCEPCRNDTFNREPAIVRF</u> <u>FSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEK</u> <u>WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWL</u> <u>IPDSADTTATPTHCAYDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNF</u> <u>QAAYGLSDQLAQAIISDHYPVEVMLK</u>
23	前体人 DNase1	<u>MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMS</u> <u>NATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQ</u> <u>DAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYY</u>

		YDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAP GDAVAEIDALYDVYLDVQEKGLEDVMLMGDFNAGCS YVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRI VVAGMLLRGAVVVPDSALPFNFQAAYGGLSDQLAQASDH YPVEVMLK
24	成熟人 DNase1 N18S/N106S/A114F	LKIAAFNIQTFG E TKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR DSHL TAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGR N SYKER YLFVYRPDQVS A VDSYYDDGCEPCGSDTFNREP F IVRFF SRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKG GLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP DSADTTATPTHCAYDRIIVVAGMLLRGAVVVPDSALPFNFQ AAYGGLSDQLAQASDHYPVEVMLK
25	成熟人 DNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K	LKIAAFNIQTFG E RTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR DSHL TAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGR N SYKER YLFVYRPDQVS A VDSYYDDGCEPCGNDTFNREP F IVRFF FSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKG WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP IPDSADTTA K PTHCAYDRIIVVAGMLLRGAVVVPDSALPFNFQ FQAAYGGLSDQLAQASDHYPVEVMLK
[0295]	26 成熟人 DNase1 E13R/N74K/A114F/ T205K/N18S/N106S	LKIAAFNIQTFG E RTKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVR DSHL TAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGR N SYKER YLFVYRPDQVS A VDSYYDDGCEPCG S DTTFNREP F IVRFF SRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKG GLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP DSADTTA K PTHCAYDRIIVVAGMLLRGAVVVPDSALPFNFQ AAYGGLSDQLAQASDHYPVEVMLK
	27 成熟人 RNase1	KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQG RCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCNGQGNCYKSN SSMHITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVP VHFDASVEDST
28	成熟人 RNase1 N34S/N76S/N88S	KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRSMTQG RCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCNGQGNCYKSS SSMHITDCRLTSGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVP VHFDASVEDST
29	前体人 RNase1	MALEKSLVRLLLLVLILLVLGWVQPSLGKESRAKKFQRQ HMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHE PLVDVQNVCFQEKVTCNGQGNCYKSNSSMHITDCRLT NGSRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFDASVEDST

[0296]

30	(Gly ₄ Ser)3 接头	GGGGSGGGSGGGGS
31	Gaussia 荧光素酶信号肽	MGVKVLFALICIAVAEA
32	接头	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄
33	O-连接糖基化共有序列	CXXGG-T/S-C
34	O-连接糖基化共有序列	NST-E/D-A
35	O-连接糖基化共有序列	NITQS
36	O-连接糖基化共有序列	QSTQS
37	O-连接糖基化共有序列	D/EFT-R/K-V
38	O-连接糖基化共有序列	C-E/D-SN
39	O-连接糖基化共有序列	GGSC-K/R
40	VK3 轻链信号肽	METPAQLLFLLLWLPDTTG
41	NLG 接头	VDGASSPVNVSSPSVQDI
42	接头	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ ALE
43	接头	GGSG
44	接头	GSAT
45	人野生型 IgG1 Fc 结构域	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	成熟人 DNase1L3	MRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCIDIILVMEI KDSNNRICPILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKE QYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFWV FQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHR WKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLI GDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVDF QKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLR KKTKSKRS
47	人 Trex1	MGPGARRQGRIVQGRPEMCFCPPPLPPLRILTLGHTPT PCSSPGSAAGTYPTMGSQALPPGPMQTLIFFDMEATGLPF

		SQPKVTELCLLAHVRCALESPPTSQGPPPTVPPPRVVDKL SLCVAPGKACSPAASEITGLSTAVLAAHGRQCFDDNLAN LLAFLRRQPQPWCLVAHNGDRYDFPLLQAEALMLGLTS ALDGAFCVDSITALKALERASSPSEHGPRKSYSLSIYTRL YGQSPPDSHTAEGDVALLSICQWRPQALLRWVDAHARP FGTIRPMYGVVASARTKPRPSAVTTAHLATTRNTSPSLG ESRGTKDLPPVKDPGALSREGLLAPLGLLAITLAVATLY GLSLATPGE	
[0297]	48	人 DNase2 alpha (NP_001366.1)	MIPLLAALLCVPAGALTCYGDSGQPVDWFVYKLPALR GSGEAAQRGLQYKYLDDESGGWRDGRALINSPEGAVGRS LQPLYRSNTSQLAFLLYNDQPPQPSKAQDSSMRGHTKGV LLLDHDGGFWLVHSVPNFPASSAAYSWPHSACTYQQT LLCVSFPAQFSKMGKQLTYTYPWVYNYQLEGIFAQEFP DLENVVKGHHSQEPWNSSITLTSQAGAVFQSFAKFSKF GDDLYSGWLAAALGTNLQVQFWHKTVGILPSNCSDIWQ VLNVNQIAFPGPAGPSFNSTEDHSKWCVSPKGPWTCVGD MNRNQGEEQRGGTLCAQLPALWKAQPLVKNYQPCN GMARKPSRAYKI
	49	人 DNase2 beta	MKQKMMARLLRTSFALLFLGLFGVLGAATISCRNEEGKA VDWFTFYKLPKRQNKESETGLEYLYLDSTTRSWRKSEQ LMNDTKSVLGRTLQQLYEAYASKSNNTAYLIYNDGVPKP VNYSRKYGHKGLLLWNRVQGFWLHSIPQFPPPIEEGYD YPPTGRRNGQSGICITFKYNQYEAIIDSQLLVCNPNVYSCSI PATFHQUELIHMPQLCTRASSSEIPGRLLTLQSAQGQKFLH FAKSDSFLDDIFAAWMAQLKTHLLTETWQRKRQELPSN CSLPYHVYNIAKIAKLSRHSYFSSYQDHAKWCISQKGTKNR WTCIGDLNRSPHQAFRSGGFICTQNWQIYQAFQGLVLYY ESCK
	50	Fc 区 N83S	EPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREE QYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI KTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	51	具有 SCC 的 Fc 区	EPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD

[0298]

		DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	具有 SSS 的 Fc 区	EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	接头	LEA(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ ALE
54	VK3LP 前导序列	METPAQLLFL _{LLL} WLPDTTG
55	具有 SCC, P238S, P331S 突变的 Fc 区	EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGG _{SS} VFLFPPPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	具有 P238S, P331S 突变的 Fc 区	EPKCSDKTHTSPPSPAPELLGG _{SS} VFLFPPPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	RSLV-327 (RNase-接头-HSA- 接头-DNase E13R/N74K/A114F/ T205K)	METPAQLLFL _{LLL} WLPDTTGKESRAKKFQRQHMDSDSSP SSSTYCNQMMRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNV CFQEKTCKNGQGN _{CY} KSNS _{SM} HITDCRLTNGS _{RP} NC _A YRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFDASVEDSTGGGGSGGG GSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQ QCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFG DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDN PNLPLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIARRHPYF YAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDE GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSL AADFVESKDVCKNYAEAKDVF _{LG} MF _{LY} YEYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKV _F DEFKPLVE EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ _N ALLVRY _T KKVPQVSTPT LVEVSRNLGKVGSK _{CK} HPEAKRMP _{CA} EDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT

[0299]

		KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEGKKLVAA SQAALGLGGGGGGGGGGGGSLKIAAFNIQTFGRTKMS NATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQ DAPDTYHYVVSEPLGRKSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYY YDDGCEPCGNDFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAP GDAVAEIDALYDVYLDVQEKGLEDVMLMGDFNAGCS YVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAKYDRI VVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQASDH YPVEVMLK
--	--	--

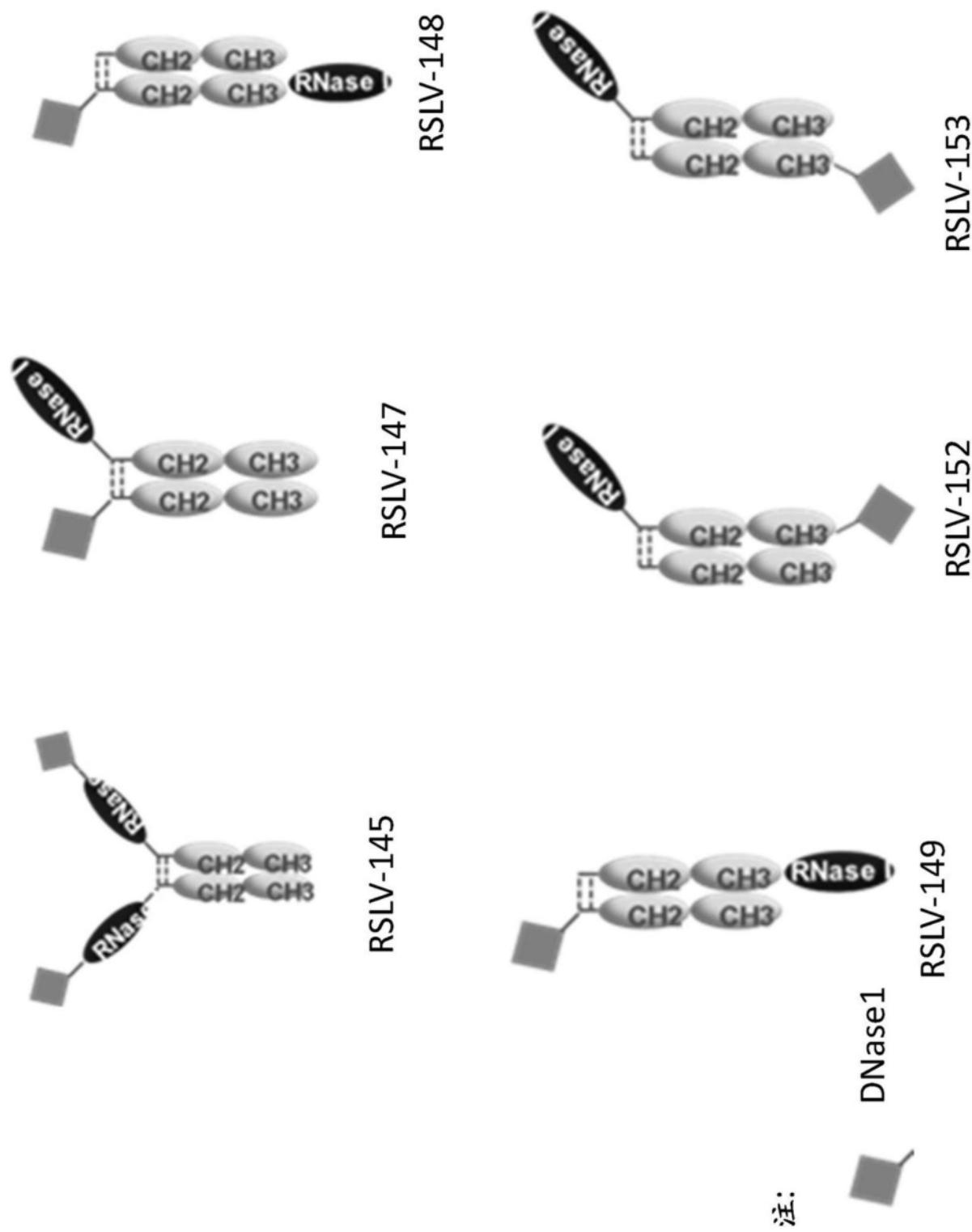
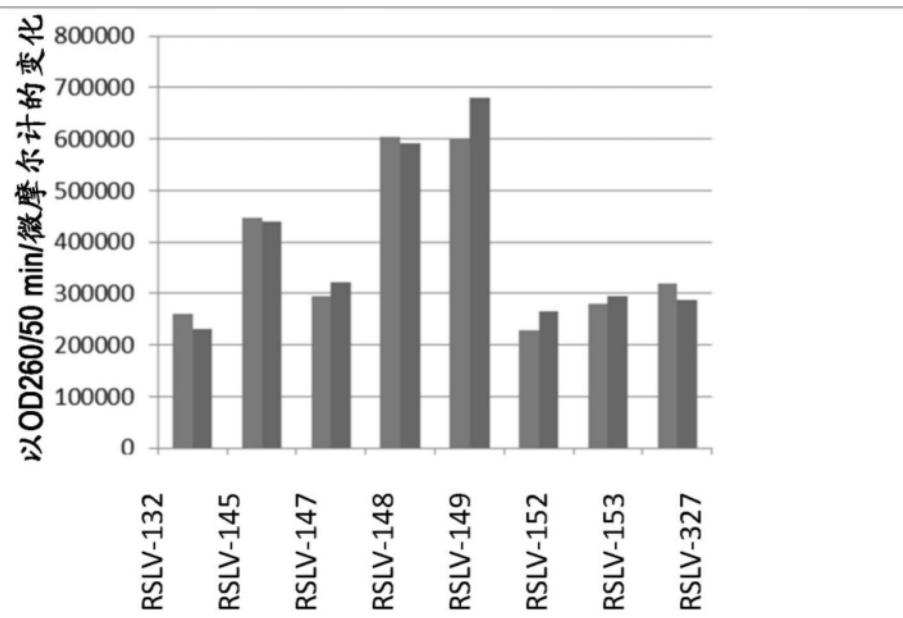


图1



*基于摩尔当量；聚(I:C)底物
显示了2个试验

图2

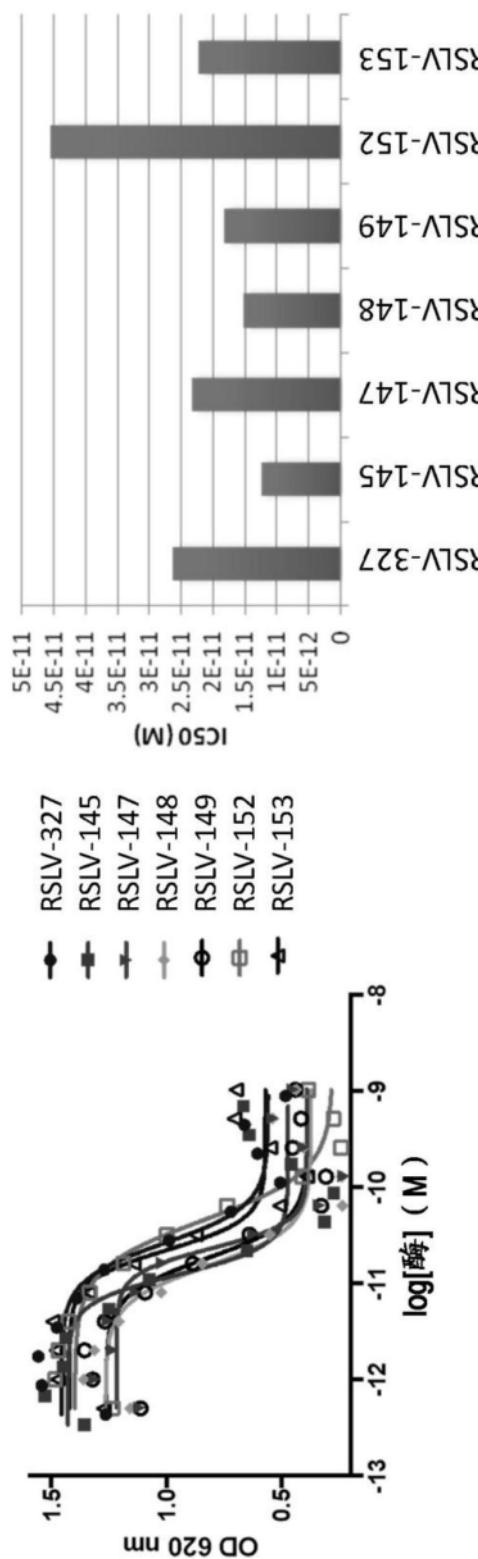


图3