

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102770458 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201080062928. 2

A61K 38/16(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 02

C12N 15/62(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/266095 2009. 12. 02 US

61/327582 2010. 04. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/058765 2010. 12. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02011/068993 EN 2011. 06. 09

(71) 申请人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 J. 西拉 J. 克诺普夫 R. 库马

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用于增加 Fc 融合蛋白的血清半寿期的组合
物和方法

(57) 摘要

本文提供了具有增加的血清半寿期的糖变体 Fc 融合蛋白。亦提供了通过引入一个或多个非内源糖基化位点来增加 Fc 融合蛋白的血清半寿期的方法。

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFY PYAPEPGSTC RLREYYDNTS
QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRG
SSDQVETQAC TREQNRICTC REGWYCALSK QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
RPGTETS DVV CKPCAPGTFE NTSSTDIR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGSPSP
AEGSTGDEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPKPKK DTLMISRTP
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YFLPPSREEM
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

1. 一种用于制备编码修饰 Fc 融合蛋白的修饰核酸的方法,所述修饰 Fc 融合蛋白相对于最初 Fc 融合蛋白具有延长的血清半寿期,其中修饰 Fc 融合蛋白和最初 Fc 融合蛋白各自包含 Fc 部分和异源部分,所述方法包括:修饰编码最初 Fc 融合蛋白的异源部分的核酸,以编码一个或多个附加的 N 联糖基化位点,其中 (a) 修饰的核酸编码以下修饰 Fc 融合蛋白,其在合适细胞培养物中表达时,具有比最初 Fc 融合蛋白的血清半寿期至少长 10% 的血清半寿期,如在药代动力学猴测定中所测定的;和 (b) 相对于未修饰 Fc 融合蛋白,修饰 Fc 融合蛋白具有基本上相同或更高的体内生物活性。

2. 权利要求 1 的方法,其中将一个或多个附加的 N 联糖基化位点引入表面暴露的异源部分的一个或多个氨基酸序列中。

3. 权利要求 2 的方法,其中将一个或多个附加的 N 联糖基化位点引入表面暴露且未掺入 β 折叠或 α 螺旋中的异源部分的一个或多个氨基酸序列中。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述异源部分包含配体结合域。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述配体结合域来源于跨膜受体的胞外域。

6. 权利要求 4 或 5 的方法,其中在异源部分的以下位置上引入一个或多个附加的 N 联糖基化位点,所述位置使得任何附加的糖部分基本上不会干扰配体结合域。

7. 权利要求 4-6 中任一项的方法,其中在以下位置引入一个或多个附加的 N 联糖基化位点,所述位置使得配体结合域的氨基酸序列不被修饰。

8. 权利要求 4-7 中任一项的方法,其中在以下位置引入一个或多个附加的 N 联糖基化位点,所述位置使得与附加的 N 联糖基化位点连接的任何糖部分被预测为基本上不会干扰配体结合界面。

9. 权利要求 4-8 中任一项的方法,其中修饰 Fc 融合蛋白与配体结合的半数最大抑制浓度 (IC_{50}) 不小于最初 Fc 融合蛋白的 1/2。

10. 权利要求 1-9 中任一项的方法,其中通过添加或缺失至少一个氨基酸残基以引入至少一个糖基化位点,来修饰最初 Fc 融合蛋白。

11. 权利要求 1-10 中任一项的方法,其中通过取代至少一个氨基酸残基以引入至少一个糖基化位点,来修饰最初 Fc 融合蛋白。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中最初 Fc 融合蛋白的异源部分包含通过表面暴露的松散多肽区连接的至少两个结构上不同的 α 螺旋和 / 或 β 折叠结构域。

13. 权利要求 12 的方法,其中将附加的 N 联糖基化位点置于松散的肽区之内。

14. 权利要求 1-13 中任一项的方法,其中最初 Fc 融合蛋白的异源部分的每 90 个氨基酸中包含少于一个 N 联糖基化位点。

15. 权利要求 1-14 中任一项的方法,其中最初 Fc 融合蛋白的异源部分的每 125 个氨基酸中包含少于一个 N 联糖基化位点。

16. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中修饰 Fc 融合蛋白的异源部分的每 90 个氨基酸中包含至少一个 N 联糖基化位点。

17. 权利要求 1-16 中任一项的方法,其中修饰 Fc 融合蛋白的异源部分的每 65 个氨基酸中包含至少一个 N 联糖基化位点。

18. 权利要求 1-17 中任一项的方法,其中通过至少 20 个氨基酸将与 N 联糖基化连接的修饰 Fc 融合蛋白异源部分的每个氨基酸与任何其他被 N 联糖基化修饰的氨基酸隔开。

19. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中最初 Fc 融合蛋白还包含不含 N 联糖基化位点的在 Fc 部分和异源部分之间的多肽接头。

20. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中修饰 Fc 融合蛋白包含置于接头之内的 N 联糖基化位点。

21. 权利要求 1-20 中任一项的方法,其中所述异源部分包含含有配体结合域的 TNFR2 受体的胞外域。

22. 权利要求 21 的方法,其中 TNFR2 受体的胞外域包含与 SEQ ID NO: 2 有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

23. 一种用于制备相对于最初 Fc 融合蛋白血清半寿期延长的修饰 Fc 融合蛋白的方法,所述方法包括:

(a) 在提供哺乳动物或哺乳动物样糖基化的细胞培养物中表达根据权利要求 1-22 中任一项的方法制备的修饰核酸;和

(b) 从细胞培养物中回收修饰的 Fc 融合蛋白。

24. 权利要求 23 的方法,其还包括纯化修饰的 Fc 融合蛋白的步骤。

25. 权利要求 24 的方法,其中纯化修饰的 Fc 融合蛋白的步骤包括:将修饰的 Fc 融合蛋白暴露给 A 蛋白并回收与 A 蛋白结合的修饰 Fc 融合蛋白。

26. 权利要求 23-25 中任一项的方法,其还包括将修饰 Fc 融合蛋白配制用于给予患者。

27. 权利要求 23 的方法,其中通过哺乳动物细胞系表达修饰核酸。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述哺乳动物细胞系选自:CHO 细胞系、NS0 细胞系、COS 细胞系和 HEK236 细胞系。

29. 权利要求 23、27 或 28 中任一项的方法,其中在产生包含唾液酸的 N 联糖部分的细胞系中表达修饰核酸。

30. 权利要求 23 或 29 的方法,其中通过已工程改造为提供哺乳动物或哺乳动物样糖基化的非哺乳动物细胞来表达修饰核酸。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述细胞系来源于真菌细胞、昆虫细胞或植物细胞。

32. 一种细胞系,其包含根据权利要求 1-22 中任一项的方法制备的修饰核酸。

33. 一种修饰 Fc 融合蛋白,其根据权利要求 23-32 中任一项的方法制备。

34. 一种包含免疫球蛋白 Fc 结构域和至少一个异源多肽结构域的融合蛋白,其中在免疫球蛋白 Fc 结构域之外修饰所述融合蛋白,以引入至少一个非内源 N 联糖基化位点,以及其中如在药代动力学测定中所测定,相对于缺乏引入的糖基化位点的融合蛋白的血清半寿期,在一个或多个引入的糖基化位点的糖基化使修饰融合蛋白的血清半寿期增加至少 10%。

35. 权利要求 34 的融合蛋白,其中所述异源多肽结构域包含受体的胞外域的至少一部分,所述部分包含配体结合域。

36. 权利要求 35 的融合蛋白,其中在配体结合袋之外的胞外域引入糖基化位点。

37. 权利要求 35 或 36 的融合蛋白,其中在一个或多个引入的糖基化位点的糖基化对受体的配体结合活性的影响不超过 3 倍。

38. 权利要求 34-37 中任一项的融合蛋白,其中通过添加或缺失至少一个氨基酸残基以引入至少一个糖基化位点,来修饰融合蛋白。

39. 权利要求 34-38 中任一项的融合蛋白,其中通过取代至少一个氨基酸残基以引入至少一个糖基化位点,来修饰融合蛋白。

40. 权利要求 34-39 中任一项的融合蛋白,其中异源多肽结构域的分子量至少为 25 kDa。

41. 权利要求 34-40 中任一项的融合蛋白,其中相对于缺乏引入的糖基化位点的融合蛋白的血清半寿期,在一个或多个引入的糖基化位点的糖基化使融合蛋白的血清半寿期增加至少 20%。

42. 权利要求 34-41 中任一项的融合蛋白,其中未修饰异源多肽结构域的每 90 个氨基酸中包含少于一个 N 联糖基化位点。

43. 权利要求 34-41 中任一项的融合蛋白,其中未修饰异源多肽结构域的每 125 个氨基酸中包含少于一个 N 联糖基化位点。

44. 权利要求 34-41 中任一项的融合蛋白,其中修饰异源多肽的每 90 个氨基酸中包含至少一个 N 联糖基化位点。

45. 权利要求 34-41 中任一项的融合蛋白,其中修饰异源多肽的每 65 个氨基酸中包含至少一个 N 联糖基化位点。

46. 权利要求 34-45 中任一项的融合蛋白,其中通过至少 20 个氨基酸将 N 联糖基化修饰的各个氨基酸与任何其他被 N 联糖基化修饰的氨基酸隔开。

47. 权利要求 34-46 中任一项的融合蛋白,其中所述融合蛋白还包含在 Fc 结构域和异源多肽结构域之间的多肽接头。

48. 权利要求 47 的融合蛋白,其中至少一个引入的糖基化位点位于接头中。

49. 权利要求 34-48 中任一项的融合蛋白,其中 Fc 融合蛋白的异源部分包含通过表面暴露的松散多肽区连接的至少两个结构上不同的 α 螺旋和 / 或 β 折叠结构域。

50. 权利要求 49 的融合蛋白,其中将引入的糖基化位点置于松散的肽区之内。

51. 权利要求 35-50 的融合蛋白,其中所述受体为神经生长因子 / 肿瘤坏死因子受体家族的成员。

52. 权利要求 51 的融合蛋白,其中所述受体为 TNFR2 受体。

53. 权利要求 52 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域包含在选自 SEQ ID NO: 2 的 Q26、D25、A28、E133 或 G231 的一个或多个氨基酸残基上的氨基酸取代。

54. 权利要求 53 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域在 SEQ ID NO: 2 的 26 位氨基酸上包含 Q \rightarrow N 取代,和在 SEQ ID NO: 2 的 28 位氨基酸上包含 A \rightarrow S 取代。

55. 权利要求 53 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域在 SEQ ID NO: 2 的 25 位氨基酸上包含 D \rightarrow N 取代,和在 SEQ ID NO: 2 的 133 位氨基酸上包含 E \rightarrow N 取代。

56. 权利要求 53 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域在 SEQ ID NO: 2 的 25 位氨基酸上包含 D \rightarrow N 取代,和在 SEQ ID NO: 2 的 231 位氨基酸上包含 G \rightarrow N 取代。

57. 权利要求 53-56 中任一项的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有至少 90% 同一性。

58. 权利要求 57 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有至少 95% 同一性。

59. 权利要求 58 的融合蛋白,其中 TNFR2 受体的胞外域与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列

有至少 99% 同一性。

60. 权利要求 53 的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含选自以下的异源结构域:

- a) 包含 SEQ ID NO: 5 的 13-257 位氨基酸的多肽;
- b) 包含 SEQ ID NO: 6 的 13-257 位氨基酸的多肽;
- c) 包含 SEQ ID NO: 7 的 13-257 位氨基酸的多肽;和
- d) 包含 SEQ ID NO: 8 的 13-257 位氨基酸的多肽。

61. 权利要求 60 的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含具有 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的接头和 Fc 部分。

62. 一种药物制剂,其包含权利要求 34-61 中任一项的融合蛋白和药学上可接受的载体,其中所述制剂基本上无致热物质,以便适于给予哺乳动物。

用于增加 Fc 融合蛋白的血清半寿期的组合物和方法

[0001] 相关申请

本申请要求保护 2009 年 12 月 2 日提交的美国临时申请号 61/266,095 和 2010 年 4 月 23 日提交的美国临时申请号 61/327,582 的权益。上述申请的全部教导通过引用结合到本文中。

[0002] 发明背景

以其天然态或当重组产生时的治疗用蛋白质或多肽通常为不稳定的分子,表现出短时间的稳定性或短的血清半寿期。此外,这些分子在配制时,特别是当在水溶液中配制用于诊断和治疗目的时,常常极不稳定。存在少数实用的解决方案来延长或提高蛋白质治疗分子的体内或体外稳定性。许多治疗药,特别是肽药物受累于不适当的体内血清半寿期。这使在高频和 / 或更高剂量给予所述治疗药,或者使用持续释放制剂以维持疗效所需的血清水平成为必需。频繁的全身给药与大量的消极副作用相关。例如,频繁(例如每日)全身注射表现出受试者的相当不舒适,造成高风险的给药相关的感染,以及特别是当静脉内给予治疗药时,可能需要住院治疗或频繁去医院就诊。此外,长期治疗中的每日静脉内注射亦可导致大量的组织瘢痕形成和由反复穿刺血管引起的血管病理。对于治疗剂的所有频繁的全身给药,例如给予糖尿病患者胰岛素,或者在患有多发性硬化的患者中给予干扰素药物,均已知类似问题。所有这些因素导致患者遵从性减小和用于卫生系统的费用增加。

[0003] 改变药剂的血清半寿期的一个可能的解决方案是与可增加半寿期的试剂分子共价连接。先前已显示,聚合物例如聚乙二醇或“PEG”与多肽连接可增加它们的血清半寿期。然而,聚合物的连接可导致药物活性减少。不完全连接或不一致连接导致产生具有不同性质的化合物的混合群体。此外,由这类修饰引起的半寿期改变为不可预知的。例如,不同的聚乙二醇与 IL-8、G-CSF 和 IL-1ra 缀合产生具有各种活性和半寿期的分子 (Gaertner 和 Offord, (1996), Bioconjugate Chem. 7:38-44)。IL-8 与 PEG₂₀ 缀合不引起其半寿期的改变,而 PEG₂₀ 与 IL-1ra 缀合引起在半寿期上几乎增加至 7 倍。此外,IL-8/PEG₂₀ 缀合物的效力为天然蛋白质的 1/10 至 1/20。

[0004] 因此,能够增加生物活性分子的血清半寿期,而不会严重减少分子的生物学功能的方法将是极其需要的。

[0005] 发明概述

在某种程度上,本公开内容提供用于延长融合蛋白的血清半寿期的方法,所述融合蛋白包含免疫球蛋白 Fc 结构域和至少一个异源多肽结构域。在某些实施方案中,所述方法包括通过修饰编码最初 Fc 融合蛋白的异源部分的核酸以编码一个或多个附加的 N 联糖基化位点,来制备编码修饰 Fc 融合蛋白的修饰核酸,所述修饰 Fc 融合蛋白相对于最初 Fc 融合蛋白具有延长的血清半寿期。在一些实施方案中,本发明的修饰核酸将编码以下修饰 Fc 融合蛋白,当在合适细胞培养物中表达时,其血清半寿期比最初 Fc 融合蛋白的血清半寿期至少长 10%。在一些实施方案中,本发明的修饰 Fc 融合蛋白相对于未修饰 Fc 融合蛋白具有基本上相同或更大的体内生物活性。在某些实施方案中,相对于缺乏附加糖基化位点的融合多肽的血清半寿期,在一个或多个附加(即引入的)糖基化位点的糖基化使修饰 Fc 融合

蛋白的半寿期（例如，体外半寿期、体内半寿期、血清半寿期）增加至少 10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225% 或 250% 或更多。在某些实施方案中，在相同的动物模型或物种中测定修饰 Fc 融合蛋白和缺乏附加糖基化位点的融合多肽的血清半寿期以进行比较。在示例性实施方案中，如本文所述在药代动力学大鼠测定或药代动力学猴测定中测定血清半寿期。

[0006] 在一些实施方案中，本公开内容提供制备相对于最初 Fc 融合蛋白具有延长的半寿期的修饰 Fc 融合蛋白的方法，所示方法通过：a) 在提供哺乳动物或哺乳动物样糖基化的细胞培养物中表达已被修饰为引入至少一个附加 N 联糖基化位点的核酸，和 b) 从细胞培养物中回收修饰 Fc 融合蛋白来进行。可利用任何适于从细胞培养物中获取蛋白质的技术，将 Fc 融合蛋白作为未加工部分、部分纯化部分或高度纯化部分回收。在某些方面，在产生包含唾液酸的 N 联糖部分的细胞系中表达修饰核酸。在某些方面，通过哺乳动物细胞系（包括但不限于 CHO 细胞系、NSO 细胞系、COS 细胞系或 HEK236 细胞系），来表达修饰核酸。在其他方面，通过已工程改造为提供哺乳动物或哺乳动物样糖基化的非哺乳动物细胞（包括但不限于基因工程真菌细胞、昆虫细胞或植物细胞），来表达修饰核酸。在某些方面，纯化可包括以下步骤：将修饰 Fc 融合蛋白暴露给 A 蛋白并回收与 A 蛋白结合的修饰 Fc 融合蛋白。在优选的实施方案中，将通过本公开内容的方法产生的 Fc 融合蛋白配制用于给予患者。

[0007] 在一些实施方案中，本公开内容提供包含按照本文所述任何方法制备的修饰核酸的细胞系。本发明的细胞系可包括哺乳动物细胞系（例如 CHO 细胞系、NSO 细胞系、COS 细胞系或 HEK236 细胞系）或已遗传修饰成提供哺乳动物或哺乳动物样糖基化的非哺乳动物细胞系（例如真菌细胞、昆虫细胞或植物细胞）。

[0008] 在某些实施方案中，本公开内容提供以稳定性和 / 或血清半寿期增加为特征的糖变体 (glycovariant) Fc 融合蛋白以及用于产生半寿期增加的融合蛋白的方法。本发明的 Fc 融合蛋白包括但不限于包含免疫球蛋白 Fc 结构域和至少一个异源多肽结构域的多肽。在免疫球蛋白 Fc 结构域之外修饰 Fc 融合蛋白，以引入至少一个非内源 N 联糖基化位点，其相对于缺乏引入的糖基化位点的融合蛋白的半寿期（例如，体外半寿期、体内半寿期或血清半寿期），增加修饰融合蛋白的血清半寿期。在某些实施方案中，本发明的融合蛋白包含至少一个非内源或引入的 N 联糖基化位点，其相对于缺乏引入的糖基化位点的融合蛋白的血清半寿期，使所述融合物的血清半寿期增加至少 10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225% 或 250% 或更多。在某些实施方案中，在相同的动物模型或物种中测定修饰 Fc 融合蛋白和缺乏附加糖基化位点的融合多肽的血清半寿期以进行比较。在示例性实施方案中，如本文所述在药代动力学大鼠测定或药代动力学猴测定中测定血清半寿期。

[0009] 可通过添加、缺失或取代一个或多个氨基酸残基以引入一个 N 联糖基化位点来修饰本发明的 Fc 融合蛋白。在某些实施方案中，最初 Fc 融合蛋白的异源部分的每 50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、130、140 或 150 个氨基酸中包含至少一个 N 联糖基化位点。在某些实施方案中，最初 Fc 融合蛋白的异源部分的每 60、70、80、90、100、110、120 或 125 个氨基酸中包含少于一个 N 联糖基化位点。在某些实施方案中，通过至少 15、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 个氨基酸将与 N 联糖基化连接的修饰 Fc 融合蛋白的异源部分的各个氨基酸与任何其他被 N 联糖基化修饰的氨基酸隔开。在某些实施方案中，

在修饰 Fc 融合蛋白的 N 端、C 端或者 N 端和 C 端二者的 10、20、30、40 或 50 个氨基酸之内不会出现附加的 N 联糖基化位点。

[0010] 在优选的实施方案中,本发明的 Fc 融合蛋白包含至少两个结构上不同的结构域,其通过表面暴露的(即可溶性环结构域)且未掺入 α 螺旋或 β 折叠中的氨基酸序列连接。在优选的实施方案中,将附加的 N 联糖基化位点置于表面暴露的氨基酸序列之内。在优选的实施方案中,不将附加的 N 联糖基化位点掺入具有二级结构元件例如 α 螺旋或 β 折叠的蛋白质区中。用于本发明的异源部分可包括蛋白质的功能结构域(例如酶促或催化结构域或者配体结合域)。在一些实施方案中,本公开内容的 Fc 融合蛋白还包含接头结构域。在一些实施方案中,至少一个引入的糖基化位点位于接头结构域中。优选本发明的融合多肽的异源结构域具有较高分子量,为至少 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105 或 110 kDa。

[0011] 在具体实施方案中,异源部分包括细胞受体(例如跨膜受体)的胞外(即可溶性)域及其任何变体(包括突变型、片段和肽模拟形式)。在优选的实施方案中,异源部分包括跨膜受体的配体结合域。本公开内容的方法可用于在异源部分的以下位置引入一个或多个 N 联糖基化位点,所述位置使得连接的任何附加的糖部分基本上不会干扰配体结合域,例如相对于与缺乏引入糖基化位点的 Fc 融合蛋白结合的配体,在结合活性上减小至不小于 1/2、1/3、1/5、1/10 或 1/15。因此,在一些方面,在使得配体结合域的氨基酸序列未被修饰的位置和/或在预测其基本上不会干扰配体界面的位置引入一个或多个引入的 N 联糖基化位点。在某些实施方案中,Fc 融合蛋白的 IC_{50} (即半数最大抑制浓度)不小于最初 Fc 融合蛋白的 IC_{50} 的 1/2、1/3、1/5 或 1/10。

[0012] 在某些实施方案中,Fc 融合蛋白包含选自神经生长因子/肿瘤坏死因子受体家族成员的异源部分。在具体实施方案中,胞外受体结构域包含 2 型肿瘤坏死因子受体(即 TNFR2)的部分。在优选的实施方案中,本公开内容提供与 TNF- α 结合的 K_D 小于 1 微摩尔或者小于 100、10 或 1 纳摩尔的 TNFR2 融合蛋白。在一些实施方案中,本发明的 TNFR2 融合蛋白包含具有位于人 TNFR2 前体蛋白(即 SEQ ID NO: 1)的 D47、Q48、A50、E155 或 G253 位的一个或多个修饰氨基酸的 TNFR2 胞外域。这些残基分别对应于 TNFR2 的胞外加工结构域(即 SEQ ID NO: 2)的 D25、Q26、A28、E133 和 G231 位。优选的修饰包括氨基酸的添加、取代和/或缺失,其导致在 TNFR2 多肽中引入一个或多个 N 联糖基化位点,包括例如相对于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的 Q26N、A28S、D25N、E133N、D25N、G231N 氨基酸取代。在一些实施方案中,对 TNFR2 融合蛋白进行多于一种修饰(例如添加、缺失和/或取代)以引入一个或多个 N 联糖基化位点,包括例如包含相对于 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的 Q26N/A28S;D25N/E133N;D25N/G231N;Q26N/A28S/E133N;Q26N/A28S/G231N 或 E133N/G231N 取代的 TNFR2 变体。本发明的 TNFR2-Fc 融合蛋白可为本文所公开的任何融合蛋白,例如包含下列多肽的融合蛋白,所述多肽具有选自 SEQ ID NO: 1、2、5、6、7 或 8 的氨基酸序列,或者包含与选自 SEQ ID NO: 1、2、5、6、7 或 8 的氨基酸序列有至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 同一性的氨基酸序列。可将 TNFR2-Fc 融合蛋白配制成包含 TNFR2-Fc 融合蛋白和药学上可接受的载体的药物制剂,其中所述制剂基本上无致热物质以便适于给予哺乳动物。通过大小排阻层析法评价,所述组合物相对于其他多肽组分纯度至少可为 95%,以及任选所述组合物纯度至少为 98%。

[0013] 附图简述

本专利或申请文件包含至少一幅彩色制作的附图。带有彩图的本专利或专利申请出版物的副本可在请求并支付必要费用后由专利局提供。

[0014] 图 1 显示了 TNFR2-h(1)Fc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5)。描述可溶性 TNFR2 融合蛋白,其具有在无接头情况下与免疫球蛋白 Fc 结构域(命名为 h(1)Fc 变体)融合的人 TNFR2 的胞外域。免疫球蛋白 Fc 区用单下划线表示,天然存在的 N 联糖基化位点用双下划线表示。

[0015] 图 2 显示了 Q48N/A50S 变体 TNFR2-h(1)Fc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6)。描述可溶性 TNFR2 融合蛋白,其具有在无接头情况下与 h(1)Fc 免疫球蛋白 Fc 结构域融合的人 TNFR2 的胞外域。在 48 位和 50 位上修饰天然存在的 TNFR2-Fc 胞外域以引入 N 联糖基化位点。免疫球蛋白 Fc 区用单下划线表示,取代的氨基酸用双下划线表示。

[0016] 图 3 显示了变体 (D47N/E155N) TNFR2-h(1)Fc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7)。描述可溶性 TNFR2 融合蛋白,其具有在无接头情况下与 h(1)Fc 免疫球蛋白 Fc 结构域融合的人 TNFR2 的胞外域。在 47 位和 155 位上修饰天然存在的 TNFR2-Fc 胞外域以引入 N 联糖基化位点。免疫球蛋白 Fc 区用单下划线表示,取代的氨基酸用双下划线表示。

[0017] 图 4 显示了变体 (D47N/G253N) TNFR2-h(1)Fc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)。描述可溶性 TNFR2 融合蛋白,其具有在无接头情况下与 h(1)Fc 免疫球蛋白 Fc 结构域融合的人 TNFR2 的胞外域。在 47 位和 253 位上修饰天然存在的 TNFR2-Fc 胞外域以引入 N 联糖基化位点。免疫球蛋白 Fc 区用单下划线表示,取代的氨基酸用双下划线表示。

[0018] 图 5 显示了具有天然前导序列的编码 TNFR2-h(1)Fc 多肽(即 SEQ ID NO: 5)的核酸序列 (SEQ ID NO: 9)。

[0019] 图 6 为描述 TNF 和 TNFR2 受体的胞外域之间的结合界面的带状图 (ribbon diagram)。TNF 为左边的绿色带状结构,而 TNFR2 受体为右边的蓝色带状结构。环中显示了引入 N 联糖基化位点的工程改造位点。蓝色环代表单突变,绿色环代表双重突变。显著降低配体结合活性的突变位于 TNF 结合部位近端并且描述为红色环。

[0020] 图 7 显示了 TNFR2 的胞外域的序列,将用于引入非内源糖基化位点的示例性氨基酸修饰突出显示。对各个突出显示区指出了可引入非内源糖基化位点的修饰的具体实例。信号肽用单下划线指示,内源糖基化位点用双下划线指示。

[0021] 图 8 显示了 β 链(箭头)在 TNFR2 结构中的预测位置。编号基于天然 TNFR2 前体序列 (SEQ ID NO: 1)。通过与 TNFR1 (PDB ID: 1EXT)、细胞因子应答修饰物 E (CrmE; PDB ID: 2UWI) 和 CD134 (OX40; PDB ID: 2HEY) 的序列比对和结构同源性来推测二级结构。

[0022] 图 9 显示了具有天然前导序列的变体 TNFR2-h(2)Fc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16)。描述可溶性 TNFR2 融合蛋白,其具有通过 4 氨基酸接头与示例性人 Fc 结构域 (SEQ ID NO: 14) 融合的天然人 TNFR2 的胞外域。Fc 结构域用单下划线指示,前导序列和接头序列用双下划线表示。

[0023] 图 10 显示了编码 TNFR2-h(2)Fc 多肽(即 SEQ ID NO: 16)的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 17)。编码 Fc 结构域的序列用单下划线指示,编码前导序列和接头的序列用双下划线表示。

[0024] 图 11 显示了糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 在大鼠胶原诱导关节炎模型中对作

为炎症标志物的脚爪体积的影响。在第 0 天和第 7 天给予胶原,而使用试验物品的治疗在第 6 天开始。显示的数据为平均值 \pm SEM。如同 TNFR2-h(1)Fc,使用 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 的治疗在下半部分研究中预防了在溶媒治疗的大鼠中观察到的脚爪肿胀。

[0025] 图 12 显示了糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 在大鼠胶原诱导关节炎模型中对骨品质的影响。通过在研究完成后第 21 天的显微计算机断层扫描术(显微 CT)离体获得跗骨图像。如同 TNFR2-h(1)Fc,使用 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 的治疗预防了在溶媒治疗的大鼠中观察到的骨侵蚀。

[0026] 发明详述

1. 综述

在某些方面,本公开内容涉及出人意料的发现:可通过在适当靶蛋白的适当位置上引入至少一个非内源 N 联糖基化位点来延长 Fc 融合蛋白的血清半寿期。因此,本公开内容提供通过增加多肽上 N 联糖基化位点的数目来增加 Fc 融合蛋白(特别是治疗用多肽)的血清半寿期的方法。如本文所示,已将本公开内容的方法用于增加包含以下受体胞外域的一部分的 Fc 融合蛋白的血清半寿期,所述部分包含配体结合域。在具体实例中,本公开内容提供以相对于未修饰形式的各个融合蛋白半寿期增加为特征的修饰 TNFR2-Fc 融合蛋白。虽然不使公开内容限制于任何具体的作用机制,但提出在其在患者体内的停留时间期间,将 Fc 融合蛋白的非 Fc 部分(“异源部分”)暴露给各种胞内和胞外环境。这些不同的条件可引起部分的异源部分作为蛋白酶底物或者使蛋白质修饰或降解过程开始的其他酶或分子的底物而变得易受攻击。因此,本公开内容提供以下新提议:起降解异源部分作用的物质显著影响 Fc 融合蛋白的血清半寿期,以及趋向于保护异源部分免受这类物质作用的修饰将导致更长的血清半寿期。如本文所述,添加一个或多个 N 联糖基化位点提供用于屏蔽异源结构域的易受攻击部分免受不需要的降解或改变以及在一些情形中使这类分子的所需结构构象稳定的单步生物相容性系统。

[0027] 可能难以先验地预测最初 Fc 融合蛋白的异源结构域中哪些位置最易接受附加的 N 联糖基化位点,以及在缺乏任何约束或指导方针时,在理论上可用一个或多个附加 N 联糖基化位点的几乎无限组合来修饰任一个异源结构域。通过使用不同的最初 Fc 融合蛋白,申请人发现了允许以合理数目的位点修饰最初 Fc 融合蛋白以获得以下修饰 Fc 融合蛋白的多种指导方针,所述修饰 Fc 融合蛋白相对于最初 Fc 融合蛋白表现出延长的血清半寿期,同时保留修饰分子的生物活性(特别是体内生物活性)。虽然不希望限制总体公开内容的范围,但是申请人发现利用一种或多种以下原理提供产生有活性、半寿期延长的 Fc 融合蛋白的可行方法:(1) 可将 N 联糖基化位点有利地置于 Fc 融合蛋白异源部分的表面暴露位置(不论是通过蛋白质结构分析确定还是通过经验方法确定),和特别地置于未包含在限定的蛋白质结构元件(例如 α 螺旋或 β 折叠)之内的位置;(2) 可将 N 联糖基化位点有利地置于 Fc 融合蛋白异源部分的以下位置:如果所述位置经受修饰或降解会引起蛋白质结构或功能的实质性扰动(例如,许多蛋白质在 N 端具有松散区,如果切割该松散区,会引起总体蛋白及其活性的很少扰动或不引起扰动,因此,置于这类位置的 N 联糖基化位点可对血清半寿期有适度影响,而相比之下,位于结构元件之间的表面暴露区如果经受不合乎需要的降解,会对蛋白质表现出高度暴露和显著后果的组合,因此结构元件之间的表面暴露氨基酸代表对引入 N 联糖基化位点而言合乎需要的位置);(3) 可将 N 联糖基化位点置于不会干扰最初 Fc 融

合蛋白的关键功能部位（例如，配体结合表面或催化部位）的位置，这可通过选择功能部位本身之外的位置和 / 或选择任何新 N 联糖部分不会伸入功能部位的位置来完成；(4) 待通过添加 N 联糖基化位点达到的作用程度可与已存在于最初 Fc 融合蛋白中的 N 联糖密度成反比，因此，使用具有相对低水平糖基化（例如，异源部分的每 60、70、80、90、100、110、125 个或更多个氨基酸中有少于 1 个 N 联位点）的异源部分的最初 Fc 融合蛋白的方法可为最有效的；(5) 在重度糖基化和轻度糖基化异源部分二者中，待达到的作用程度可与 N 联糖基化位点之间的间距成比例，这意味着可将一个或多个附加的 N 联糖基化位点以离已存在 N 联糖基化或其他附加的 N 联糖基化位点相对规律和相对远的间距（例如，在 N 联糖基化位点的 N 残基之间有多于 10、15、20、25、30、35 或 40 个氨基酸）有利地放置——甚至在重度糖基化蛋白质中，如果糖紧密聚簇，则添加良好间隔的 N 联位点可促进血清半寿期的显著增加。虽然使用一个或多个以上原理可允许设计相对于最初 Fc 融合蛋白表现出延长的血清半寿期的单一修饰 Fc 融合蛋白，但是常常有益的是，基于单一最初 Fc 融合蛋白产生多种修饰 Fc 融合蛋白，测试这些经改变的形式并随后测试表现出增加的半寿期和保留生物活性的最好组合的那些修饰形式的组合。

[0028] 在某些方面，本公开内容涉及通过增加多肽上 N 联糖基化位点的数目来增加 Fc 融合蛋白特别是治疗用多肽的血清半寿期的方法。如本文所示，已将本公开内容的方法用于增加包含受体胞外域的一部分的 Fc 融合蛋白的血清半寿期，所述部分包含配体结合域。在具体实例中，本公开内容提供以相对于未修饰形式的各个融合蛋白半寿期增加为特征的修饰 TNFR2-Fc 融合蛋白。不论机制，从本文所示数据显而易见的是，引入附加的糖基化位点是延长高分子量生物药品特别是 Fc 融合蛋白的半寿期的有效方法。

[0029] 在具体实施方案中，本公开内容提供以血清半寿期增加为特征的修饰 TNFR2-Fc 糖变体融合蛋白。肿瘤坏死因子 (TNF) 为涉及正常炎症和免疫应答的天然存在的细胞因子。肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和肿瘤坏死因子 β (TNF β) 为同源的多功能细胞因子。在这些多肽的结构和功能特征方面的巨大相似性使得它们统称为肿瘤坏死因子或“TNF”。通常归因于 TNF 的活性包括：释放包括 IL-1、IL-6、GM-CSF 和 IL-10 的其他细胞因子、诱导趋化因子、增加粘附分子、增长血管、释放组织破坏性酶和激活 T 细胞。参见例如 Feldmann 等，1997, *Adv. Immunol.*, 64:283-350, Nawroth 等，1986, *J. Exp. Med.*, 163:1363-1375; Moser 等，1989, *J. Clin. Invest.*, 83:444-455; Shingu 等，1993, *Clin. Exp. Immunol.* 94:145-149; MacNaul 等，1992, *Matrix Suppl.*, 1:198-199; 和 Ahmadzadeh 等，1990, *Clin. Exp. Rheumatol.* 8:387-391。所有这些活性都可起增强炎症反应的作用。

[0030] TNF 引起导致组织损伤的促炎作用，例如诱导对血管内皮细胞的促凝活性 (Pober 等，*J. Immunol.* 136:1680 (1986))、增加中性白细胞和淋巴细胞的粘附 (Pober 等，*J. Immunol.* 138:3319 (1987)) 以及刺激自巨噬细胞、中性白细胞和血管内皮细胞中释放血小板活化因子 (Camussi 等，*J. Exp. Med.* 166:1390 (1987))。TNF 亦与感染 (Cerami 等，*Immunol. Today* 9:28 (1988))、免疫病症、肿瘤病理 (Oliff 等，*Cell* 50:555 (1987))、自身免疫病理和移植物抗宿主病理 (Piguet 等，*J. Exp. Med.* 166:1280 (1987)) 相关。这类 TNF 相关的病症包括充血性心力衰竭、炎性肠病（包括克罗恩氏病）、关节炎和哮喘。

[0031] 具体而言，TNF 在革兰氏阴性脓毒症和内毒素性休克中起主要作用 (Michie 等，

Br. J. Surg. 76:670-671 (1989); Debets 等, 第二届维也纳休克论坛 (Second Vienna Shock Forum), 第 463-466 页 (1989); Simpson 等, Crit. Care Clin. 5:27-47 (1989); Waage 等, Lancet 1:355-357 (1987); Hammerle 等, 第二届维也纳休克论坛, 第 715-718 页 (1989); Debets 等, Crit. Care Med. 17:489-497 (1989); Calandra 等, J. Infect. Dis. 161:982-987 (1990); Revhaug 等, Arch. Surg. 123:162-170 (1988)), 包括发烧、不适、厌食和恶病质。

[0032] TNF 通过其与 TNF 应答细胞上的特异性细胞表面受体的相互作用来启动其生物效应。有两种不同形式的细胞表面肿瘤坏死因子受体 (TNFR), 命名为 p75 (或 2 型) 和 p55 (或 1 型) (Smith 等, 1990, Science 248:1019-1023; Loetscher 等, 1990, Cell 61:351-359)。1 型 TNFR 和 2 型 TNFR 各自与 TNF α 和 TNF β 二者结合。TNF 的生物活性取决于与任一细胞表面 TNFR 的结合。1 型受体 (也称为 TNF-R55、TNF-RI 或 TNFR- β) 为 55 kD 的糖蛋白, 显示其转导引起 TNF- α 的细胞毒活性、抗病毒活性和增殖活性的信号。p75 受体 (也称为 TNF-R75、TNFR2 或 TNFR- α) 为 75 kDa 的糖蛋白, 亦显示其转导细胞毒信号和增殖信号以及导致 GM-CSF 分泌的信号。

[0033] 已证实 TNF 拮抗剂 (例如可溶性 TNFR 和抗 TNF 抗体) 阻断 TNF 活性, 引起对 TNF 响应的 IL-1、GM-CSF、IL-6、IL-8、粘附分子和组织破坏的减少 (Feldmann 等, 1997)。在 DBA/1 小鼠的 II 型胶原关节炎模型中测试了利用仓鼠抗小鼠 TNF 抗体的 TNF 拮抗作用的效应 (Williams 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9784-9788)。在疾病发作后开始的治疗导致在足垫肿胀、临床评分和关节破坏的组织病理方面的改进。使用抗体 (Thorbecke 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7375-7379) 或 TNFR 构建体 (Husby 等, 1988, J. Autoimmun. 1:363-71; Tetta 等, 1990, Ann. Rheum. Dis. 49:665-667; Wooley 等, 1993, J. Immunol. 151:6602-6607; Piguet 等, 1992, Immunology 77:510-514) 的其他研究获得了类似结果。

[0034] 三种特异性 TNF 拮抗剂现已被 FDA 批准: 依那西普 (Enbrel[®])、英利昔单抗 (Remicade[®]) 和阿达木单抗 (Humira[®])。这些药物的一种或多种获准用于治疗类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎和炎性肠病 (克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)。

[0035] 连接至人 IgG1 的 Fc 部分的可溶性人 TNFR (p75) 的重组形式 (sTNFR(p75):Fc, Enbrel[®], Immunex) 的临床试验已显示, 给予所述药物导致 RA 疾病活性的显著和迅速减小 (Moreland 等, 1997, N. Eng. J. Med., 337:141-147)。此外, 来自对 Enbrel[®] 的儿童临床试验的安全性数据指出, 患有青少年类风湿性关节炎 (JRA) 的患者通常良好耐受此药物 (Garrison 等, 1998, 美国风湿病学学会会议 (Am. College of Rheumatology meeting), 1998 年 11 月 9 日, 摘要 584)。

[0036] 如上所述, Enbrel[®] 为由连接到人 IgG1 的 Fc 部分的人 75 千道尔顿 (p75) TNFR 的胞外配体结合部分组成的二聚体融合蛋白。Enbrel[®] 的 Fc 组分含有 CH2 结构域、CH3 结构域和铰链区, 但不含 IgG1 的 CH1 结构域。Enbrel[®] 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 哺乳动物细胞表达系统中产生。其由 934 个氨基酸组成且表观分子量约为 150 千道尔顿 (Smith 等, 1990, Science 248:1019-1023; Mohler 等, 1993, J. Immunol. 151:1548-1561; 美国专利号 5,395,760 (Immunex Corporation, Seattle, Wash.); 美国专利号 5,605,690 (Immunex

Corporation, Seattle, Wash.)。

[0037] 目前表明 Enbrel[®] 用于在对一种或多种疾病缓解抗风湿药 (DMARD) 应答不足的患者中减少中度至重度活性的类风湿性关节炎的体征和症状。可在对单独的甲氨蝶呤不充分应答的患者中与甲氨蝶呤组合使用 Enbrel[®]。亦表明 Enbrel[®] 用于在对一种或多种 DMARD 应答不充分的患者中减少中度至重度活性的多关节病程青少年类风湿性关节炎 (polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis) 的体征和症状 (1999 年 5 月 28 日)。将 Enbrel[®] 作为皮下注射剂每周两次以 25 mg 给予 RA 患者。

[0038] 目前, 使用 ENBREL 制剂的治疗为每周两次皮下给药, 这对于患者而言昂贵、不愉快且不便。因此, 本公开内容提供包含 TNF 结合受体 (例如 Enbrel[®]) 的可溶性 (例如胞外的) 部分的 TNF 拮抗剂, 所述可溶性部分已被修饰为引入至少一个非内源 N 联糖基化位点, 以相对于缺乏引入糖基化位点的可溶性 TNF 受体的血清半寿期, 增加修饰多肽的血清半寿期。

[0039] 在本发明的上下文以及在使用各个术语的具体上下文中, 用于本说明书的术语一般具有其在本领域的一般含义。下文或本说明书其它部分论述某些术语, 以在描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用所述组合物和方法方面, 对从业人员提供额外的指导。术语任何用法的范围或含义从使用术语的具体上下文来看将是显而易见的。

[0040] “约”和“大约”总的来讲应意指给定测量的性质或精度, 对所测定的量的可接受的误差度。示例性误差度通常在给定值或值的范围的 20%、优选 10%、更优选 5% 内。

[0041] 或者, 特别是在生物系统中, 术语“约”和“大约”可意指在给定值的数量级以内、优选 5 倍以内、更优选 2 倍以内的值。

[0042] 本发明的方法可包括将序列彼此进行比较的步骤, 包括野生型序列与一个或多个突变型 (序列变体) 比较。这类比较通常包括多聚体序列的比对, 例如应用本领域熟知的序列比对程序和 / 或算法 (例如 BLAST、FASTA 和 MEGALIGN 等)。技术人员可容易理解的是, 在其中突变含有残基插入或缺失的这类比对中, 序列比对可在不含插入残基或缺失残基的多聚体序列中引入“空位” (通常用破折号或“A”表示)。

[0043] 在所有其语法形式和拼法变化中的“同源的”, 是指具有“共同进化起源”的两种蛋白质之间的关系, 包括来源于同一生物物种超家族的蛋白质以及来源于不同生物物种的同源蛋白质。这类蛋白质 (及其编码核酸) 具有序列同源性, 正如其序列相似性所反映的一样, 不论就百分比同一性而言, 或者就特定残基或基序和保守位置的存在情况而论。

[0044] 在所有其语法形式中的术语“序列相似性”是指可能有或没有共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间的同一性或一致性程度。

[0045] 然而, 在普通用法以及在本申请中, 术语“同源的”当用副词 (例如“高度地”) 修饰时, 可以是指序列相似性, 并且可与共同进化起源有关或无关。

[0046] 术语“药代动力学性质”是指生物活性剂 (例如, 小分子、多肽药物等) 的吸收、分布、代谢和排泄。

[0047] 2. 糖变体 Fc 融合蛋白

本文提供了具有与异源多肽连接的来自免疫球蛋白分子的 Fc 结构域的糖变体融合蛋白。所述糖变体融合蛋白包含至少一个在融合蛋白 Fc 结构域之外的非内源 N 联糖基化位点。Fc 结构域可直接地或通过多肽接头间接地与异源多肽连接。可将非内源糖基化位点引

入异源多肽、接头或二者中。

[0048] “非内源的”、“引入的”或“新的”糖基化位点是指未修饰形式的多肽中不存在的糖基化位点。因此，本文所述糖变体融合蛋白与存在于未修饰形式的融合蛋白中的糖基化位点数目相比，具有至少一个附加的N联糖基化位点。例如，如果未修饰形式的融合蛋白具有两个Fc结构域之外的糖基化位点并将一个N联糖基化位点引入异源多肽，则糖变体融合蛋白将具有包括两个天然糖基化位点和一个引入的糖基化位点在内的三个N联糖基化位点。应当理解的是，修饰融合蛋白以增加糖基化位点的数目不限于特定的“野生型”氨基酸序列，因为天然存在的变体或人造变体亦可根据本发明的方法进行修饰以增加糖基化位点的数目。

[0049] 众所周知的是，一些蛋白质可支持大量糖侧链。O联糖基化位点之间的距离可小至每隔一个氨基酸（参见例如Kolset & Tveit (2008) *Cell. Mol. Life Sci* 65: 1073-1085和Kiani等，(2002) *Cell Research* 12(1): 19-32）。对于N联糖基化位点，位点之间的距离可小至3、4、5或6个氨基酸（参见例如Lundin等，(2007) *FEBS Letters* 581:5601-5604 (2007)；Apweiler等，(1991) *Biochimica et Biophysica Acta* 1473:4-8，其每个的全部内容通过引用结合到本文中）。因此，在某些实施方案中，可将至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个或更多个N联糖基化位点加入本文所述融合蛋白中。在某些实施方案中，本公开内容的糖变体融合蛋白的每10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150或200个氨基酸中包含至少一个糖基化氨基酸。在某些实施方案中，通过至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个或更多个氨基酸将各个N联糖基化氨基酸与任何其他N联、O联或者N联和O联糖基化氨基酸隔开。

[0050] 本文所用的“糖基化位点”可意指糖连接共有序列（即充当用于使糖（单糖、寡糖或多糖）与氨基酸序列连接的共有序列的一系列氨基酸）或者其可意指糖部分与之共价连接的实际氨基酸残基。糖部分可为单糖（单糖分子）、寡糖或多糖。

[0051] 可通过修饰蛋白质的氨基酸序列或通过化学修饰融合蛋白中的氨基酸残基以加入糖部分来将N联糖基化位点引入融合蛋白。在优选的实施方案中，修饰本文所述融合蛋白以引入（例如通过插入、缺失或取代指定氨基酸）至少一个具有共有序列NXT/S（天冬酰胺-X-丝氨酸/苏氨酸）的N联糖基化位点，其中X为除脯氨酸之外的任何氨基酸。在蛋白质上增加糖部分数目的另一种方法为通过将糖苷与多肽化学偶联或酶促偶联。例如，根据所采用的偶联方式，可将糖部分连接至：(a) 精氨酸和组氨酸；(b) 游离羧基；(c) 游离巯基，例如半胱氨酸的巯基；(d) 游离羟基，例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基；(e) 芳族残基，例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基；或(f) 谷氨酰胺的酰胺基。参见例如WO 87/05330以及Aplin和Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*，第259-306页，通过引用结合到本文中。在示例性实施方案中，将糖部分与精氨酸残基偶联以产生N联聚糖。

[0052] 在示例性实施方案中，利用细胞机器通过在宿主细胞中表达融合蛋白来将糖部分加入至引入的糖基化位点中。一般地，可在提供适当的糖基化的哺乳动物细胞系中表达融合蛋白，例如HEK293或CHO细胞系，或其他哺乳动物表达细胞系。

[0053] 在某些实施方案中，可使用已工程改造为产生哺乳动物样糖基化的非哺乳动物宿主细胞（例如酵母、细菌或昆虫细胞）来将糖部分加入至引入的糖基化位点中。已开发具

有遗传修饰的糖基化途径的细胞系,其执行模拟在人中加工糖蛋白的一系列酶反应。在这些工程改造细胞中表达的重组蛋白产生与它们的人对应物类似(如果不是基本相同的话)的糖蛋白(例如,哺乳动物样糖基化)。

[0054] 用于遗传修饰宿主细胞以改变表达的肽的糖基化概况的技术为众所周知的。参见例如 Altmann 等, (1999, *Glycoconjugate J.* 16: 109-123), Ailor 等, (2000, *Glycobiology* 10(8): 837-847), Jarvis 等, (In vitrogen Conference, 1999 年 3 月, 摘要), Hollister 和 Jarvis, (2001, *Glycobiology* 11(1): 1-9), 以及 Palacpac 等, (1999, *PNAS USA* 96: 4697), Jarvis 等, (1998. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:528-533), Gemgross (美国专利公布号 20020137134), 上述所有均公开了通过用糖基转移酶基因转染昆虫或植物细胞来“人源化”昆虫或植物细胞表达系统的技术。

[0055] 亦存在从遗传上改变在原核系统中表达的肽的糖基化概况的技术。已使用来自细菌脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 和固氮根瘤菌属 (*Azorhizobium*) 的多种糖基转移酶工程改造大肠杆菌 (*E. coli*) 以在体内产生寡糖 (Bettler 等, 1999, *Glycoconj. J.* 16:205-212)。已基因工程改造为过表达脑膜炎奈瑟氏球菌 β 1,3 N 乙酰氨基葡萄糖基转移酶 *Igta* 基因的大肠杆菌将有效地使外源乳糖糖基化 (Priem 等, 2002, *Glycobiology* 12:235-240)。

[0056] 亦已将真菌细胞遗传修饰为产生外源糖基转移酶 (Yoshida 等, 1999, *Glycobiology*, 9(1):53-58; Kalsner 等, 1995, *Glycoconj. J.* 12:360-370; Schwientek 和 Ernst, 1994, *Gene* 145(2):299-303; Chiba 等, 1995, *Biochem J.* 308:405-409)。

[0057] 在某些实施方案中,表达本公开内容的 Fc 融合蛋白的宿主细胞可为表达一种或多种外源糖基转移酶和 / 或一种或多种外源糖苷酶的真核或原核细胞,其中在宿主细胞中表达重组糖肽导致具有“人”聚糖结构的重组糖肽的产生。

[0058] 在一些实施方案中,用于细胞的异源糖基转移酶可选自例如在 Taniguchi 等 (2002, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, Springer, N. Y.) 中可得糖基转移酶家族列表中所包含的任何已知的糖基转移酶。

[0059] 在一些实施方案中,宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞,其中已灭活一种或多种内源糖基转移酶和 / 或一种或多种内源糖苷酶,使得在宿主细胞中表达重组糖肽导致具有“人”聚糖结构的重组糖肽的产生。

[0060] 在一些实施方案中,宿主细胞可表达异源糖基转移酶和 / 或糖苷酶,而同时一种或多种内源糖基转移酶和 / 或糖苷酶为灭活的。可利用本领域技术人员已知的任何技术灭活内源糖基转移酶和 / 或糖苷酶,所述技术包括但不限于反义技术和包括将核酸插入宿主细胞基因组的技术。

[0061] 在示例性实施方案中,本文所述糖变体融合蛋白相对于未修饰形式的融合蛋白具有增加的稳定性和 / 或增加的血清半寿期。在示例性实施方案中,相对于未修饰形式的融合蛋白,糖变体融合蛋白的血清半寿期增加至少 10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、200%、250% 或 300% 或更多。在某些实施方案中,在相同的动物模型或物种中测定修饰 Fc 融合蛋白和缺乏附加糖基化位点的融合多肽的血清半寿期以进行比较。在示例性实施方案中,如本文所述在药代动力学大鼠测定或药

代动力学猴测定中测定血清半寿期（参见例如实施例 4 和 5）。

[0062] 在示例性实施方案中，引入一个或多个非内源糖基化位点不会显著影响融合蛋白异源多肽部分的一种或多种生物活性。例如，融合蛋白的异源多肽部分的一种或多种生物活性可受少于 10 倍、5 倍、3 倍、2.5 倍、2 倍、1.5 倍、1 倍、0.5 倍或更小倍的影响。本文进一步描述了异源多肽部分的生物活性的实例，包括例如蛋白质-蛋白质相互作用、配体结合、生理活性等。

[0063] 在示例性实施方案中，将一个或多个非内源糖基化位点引入 Fc 融合蛋白的异源部分。Fc 融合蛋白的异源部分可包括催化结构域或配体结合域。本文所用的“配体结合域”是指蛋白质上与另一分子（例如配体）相互作用的区。例如，配体结合域可指蛋白质上被抗体结合的区、抗体上与抗原结合的区、受体上与配体结合的区、配体上与受体结合的区、第一多肽上与第二多肽结合的区、多肽上与小分子结合的区等。在示例性实施方案中，配体结合域为跨膜受体蛋白的胞外域中与配体结合的区。本文所用的“催化结构域”是指具有功能活性的区。催化结构域的实例包括例如激酶结构域、磷酸酶结构域、蛋白酶结构域等。

[0064] 在示例性实施方案中，将一个或多个非内源糖基化位点引入柔性或松散的表面暴露区，例如连接 α 螺旋和 / 或 β 折叠的环区。一般而言，蛋白质为具有二级和三级结构的多肽链。多肽的二级结构包括将多肽链折叠成称为 α 螺旋和 β 折叠的两种常见结构域。蛋白质的三级结构由通过各种长度和不规则形状的环区连接的二级结构（ α 螺旋和 β 折叠）的组合组成。一般地，二级结构元件的组合形成稳定的疏水核，而环区存在于蛋白质表面。由于环区为溶剂暴露的，因此与内部的结构稳定的二级结构域（例如 α 螺旋和 β 折叠结构域）相比，其一般更易受到各种活性分子和蛋白质酶（例如蛋白酶）的亲核攻击 / 肽键切割。

[0065] 在某些实施方案中，可能需要除去融合蛋白异源多肽部分中的一个或多个天然存在的糖基化位点（例如未修饰形式蛋白质中的糖基化位点）。例如，为了改变 N 联糖基化位点的间距，可能需要除去天然存在的糖基化位点并随后在所需位置引入两个非内源糖基化位点。此外，可能需要除去存在于融合蛋白中的一个或多个天然存在的 O 联糖基化位点。

[0066] 可通过剔除共有氨基酸序列或者通过从氨基酸残基化学切割或酶促切割糖部分来除去 N 联和 O 联糖基化位点。例如，可如下除去 N 联糖基化位点：通过在 N 联糖基化识别位点（即 NXT/S）的第一个或第三个氨基酸位置之一或二者上取代或缺失氨基酸，和 / 或在三肽序列的第二位上缺失氨基酸。可通过添加、缺失或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基和 / 或如下所述破坏 O 联共有序列来除去 O 联糖基化位点。或者，可用化学法和 / 或酶法实现存在于多肽上的一个或多个天然存在的糖部分的除去。化学去糖基化可包括例如将糖基化多肽暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等同化合物中。这种处理导致除连接糖（N-乙酰氨基葡萄糖或 N-乙酰半乳糖胺）以外的大部分或所有糖被切割，同时保持氨基酸序列完整。化学去糖基化另由 Hakimuddin 等（1987）Arch. Biochem. Biophys. 259:52 和由 Edge 等（1981）Anal. Biochem. 118:131 描述。糖基化多肽上糖部分的酶促切割可通过使用各种内切糖苷酶和外切糖苷酶完成，如 Thotakura 等（1987）Meth. Enzymol. 138:350 所述。

[0067] 在某些实施方案中，可能需要引入除一个或多个非内源 N 联糖基化位点之外的一个或多个 O 联糖基化位点。可通过将 O 联糖基化共有序列引入多肽来向蛋白质中加入 O 联糖基化位点。示例性 O 联共有序列包括例如 CXXGGT/S- C、NSTE/DA、NITQS、QS1QS、O/

E-FI1RZK-V、C-E/D-SN 和 GGSC- K/R。或者,可通过化学修饰多肽中的氨基酸来引入 O 联糖部分。参见例如 WO 87/05330 和 Aplin 和 Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 第 259-306 页,通过引用结合到本文中。

[0068] 在某些实施方案中,本文所述糖变体多肽可包含另外的结构域,例如前导序列、接头和 / 或纯化 / 鉴定标签。

[0069] 在一些实施方案中,融合蛋白可包含信号序列,例如蜜蜂蜂毒肽前导序列 (honey bee mellitin leader, HBML):MKFLVNVALLVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 10);组织纤溶酶原激活物 (TPA) 前导序列:MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 11);或 (iii) 天然前导序列。

[0070] 本公开内容的融合蛋白可任选包含接头结构域。在某些实施方案中,融合蛋白包含位于 Fc 结构域和异源多肽结构域之间相对松散的接头。该松散接头可为 1、2、3、4 或 5 个氨基酸或者长度介于 5 和 10、15、20、30、50 个或更多个氨基酸之间相对缺乏二级结构的人工序列。接头可富含甘氨酸和脯氨酸残基,并可含有例如苏氨酸 / 丝氨酸和甘氨酸的单一序列或者苏氨酸 / 丝氨酸和甘氨酸的重复序列 (例如 TG₃ (SEQ ID NO: 12) 或 SG₃ (SEQ ID NO: 13) 单一序列或重复序列)。在某些实施方案中,一个或多个引入的糖基化位点可位于接头结构域中。

[0071] 本公开内容的融合蛋白可包含促进融合蛋白的分离和 / 或检测的结构域。这类结构域的众所周知的实例包括但不限于聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)、硫氧还蛋白、A 蛋白、G 蛋白、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 或人血清白蛋白。可选择融合结构域以提供所需性质。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和层析法分离融合蛋白。为了亲和纯化的目的,使用用于亲和层析法的相关基质,例如谷胱甘肽缀合树脂、淀粉酶缀合树脂和镍缀合树脂或钴缀合树脂。这类基质的许多种可以“试剂盒”形式获得,例如 Pharmacia GST 纯化系统和可与 (His)₆ 融合配偶体一起使用的 QIAexpress™ 系统 (Qiagen)。作为另一个实例,可选择融合结构域以促进多肽的检测。这类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白 (例如 GFP) 以及“表位标签”,其通常是短肽序列,可获得其特异性抗体。易获得其特异性单克隆抗体的众所周知的表位标签包括 FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 和 c-myc 标签。在一些情况下,融合结构域具有蛋白酶切割位点,例如允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白,从而从中释放重组蛋白的因子 Xa 或凝血酶。然后,可通过随后的层析分离,从融合结构域分离出释放的蛋白质。

[0072] 要理解的是,融合蛋白的不同成分可以与所需功能性一致的任何方式排列。例如,可将 Fc 结构域置于异源多肽结构域的 C 端,或者,可将异源多肽结构域置于 Fc 结构域的 C 端。Fc 结构域和异源结构域在融合蛋白中不必邻接,在任一结构域的 C 端或 N 端或者在结构域之间可包括另外的结构域或氨基酸序列。

[0073] 在某些实施方案中,糖变体融合蛋白可包含选自下列的一个或多个另外的修饰氨基酸残基:聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。由于这类翻译后修饰,本文所述融合蛋白可含有非氨基酸成分,例如聚乙二醇、脂质和磷酸酯。对于这类翻译后活性,不同细胞 (例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293) 具有特定的细胞机器和特有机制,可选择不同细胞以确保本发明多肽的正确修饰和加工。

[0074] 本公开内容的融合蛋白通常为较高分子量的,大小为至少 30、40、50、60、70、80、90、100 或 110 kDa 或更大。

[0075] 在示例性实施方案中,本公开内容提供具有 Fc 结构域之外的至少一个非内源 N 糖基化位点的 TNFR2-Fc 糖变体融合蛋白。在某些实施方案中,本发明的糖变体融合蛋白可包含与选自 SEQ ID NO: 18、21、22、23 或 24 的氨基酸序列有至少 75% 同一性的氨基酸序列。在某些情况下,糖变体融合蛋白具有与选自 SEQ ID NO: 18、21、22、23 或 24 的氨基酸序列有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

[0076] 在某些实施方案中,本文所述糖变体 Fc 融合蛋白不含 ActRIIb 受体的胞外域和/或抗体的可变区。

[0077] *Fc 结构域*

本文所述糖变体融合蛋白包含与异源多肽融合的免疫球蛋白重链 Fc 结构域。已知具有免疫球蛋白 Fc 部分的融合物赋予多种蛋白质所需的药代动力学性质。本文所用的术语“Fc 区”或“Fc 结构域”是指免疫球蛋白重链的 C 端区,包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可能变化,但是通常将人 IgG 重链 Fc 区定义为从 Cys226 位或从 Pro230 位的氨基酸残基延伸至免疫球蛋白羧基端。例如如果重组工程改造编码抗体重链的核酸,则可除去 Fc 区的 C 端赖氨酸(根据 EU 编号系统为残基 447)。除非另有指示,否则本文免疫球蛋白重链的残基编号为 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中的 EU 索引的编号,所述文献通过引用明确地结合到本文中。“Kabat 中的 EU 索引”是指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

[0078] “天然序列 Fc 区”包含与自然中发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1 Fc 区(非 A 异型和 A 异型);天然序列人 IgG2 Fc 区;天然序列人 IgG3 Fc 区;和天然序列人 IgG4 Fc 区及其天然存在的变体。

[0079] “变体 Fc 区”包含由于至少一个氨基酸修饰(优选一个或多个氨基酸取代)而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选与天然序列 Fc 区或与亲代多肽的 Fc 区相比,变体 Fc 区具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列 Fc 区或在亲代多肽的 Fc 区有约 1- 约 10 个氨基酸取代,和优选约 1- 约 5 个氨基酸取代。优选本文的变体 Fc 区与天然序列 Fc 区和/或亲代多肽的 Fc 区具有至少约 80% 同源性,最优选至少约 90% 同源性,更优选至少约 95% 同源性。

[0080] 在优选的实施方案中,本文所述 Fc 融合蛋白具有与免疫球蛋白 Fc 结构域 C 端部分的 N 端融合的异源部分。优选将以恰好位于木瓜蛋白酶切割位点(例如,使重链恒定区的第一个残基为 114)或其他免疫球蛋白的类似位点上游的铰链区开始的序列用于融合。在一个实施方案中,将异源结构域与 IgG1、IgG2 或 IgG3 重链的铰链区、CH2 和 CH3 或 CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域融合。在一些实施方案中,进行融合的确切位点不重要,可通过常规试验确定最佳位点。

[0081] 对于人 Fc 结构域,优选使用人 IgG1 和 IgG3 免疫球蛋白序列。使用 IgG1 的主要优势为,可在固定化 A 蛋白上有效纯化 IgG1 融合蛋白。相比之下,IgG3 融合蛋白的纯化需要 G 蛋白,一种通用性显著更少的介质。然而,如果选择用于特定构造的 Ig 融合配偶体,则应考虑免疫球蛋白的其他结构性质和功能性质。例如, IgG3 铰链更长且更可变,所以其可

容纳较大的异源部分,该异源部分与 IgG1 融合时不可折叠或不可正确发挥作用。另一个考虑可为化学价;IgG 免疫粘附素为二价同二聚体,而如 IgA 和 IgM 的 Ig 亚型分别可产生基础 Ig 同二聚体单元的二聚或五聚结构。

[0082] 对设计用于体内施用的 Fc 融合蛋白而言,由 Fc 区规定的药代动力学性质和效应子功能也是重要的。虽然 IgG1、IgG2 和 IgG4 的体内半寿期均为 21 天,但是其激活补体系统的相对功效不同。IgG4 不激活补体,IgG2 在补体激活方面显著弱于 IgG1。此外,与 IgG1 不同,IgG2 不与单核细胞或中性白细胞上的 Fc 受体结合。虽然 IgG3 最适于补体激活,但是其体内半寿期大约为其他 IgG 同种型的 1/3。

[0083] 对于设计以用作人治疗药的 Fc 融合蛋白的另一个重要考虑为特定同种型的异型变体数目。一般而言,优选具有较少血清学限定的异型的 IgG 同种型。例如,IgG1 仅具有四个血清学限定的异型位点,其中两个位点 (G1m 和 2) 位于 Fc 区;并且这些位点之一的 G1m1 为非免疫原性的。相比之下,IgG3 中有 12 个血清学限定的异型,全部都在 Fc 区中;这些位点中仅三个位点 (G3m5、11 和 21) 具有一个非免疫原性异型。因此,IgG3 融合蛋白的潜在免疫原性大于 IgG1 融合蛋白的潜在免疫原性。

[0084] 在某些实施方案中,与野生型 Fc 结构域相比,用于 Fc 融合蛋白的 Fc 结构域可包含一个或多个改变。然而这些 Fc 结构域基本上保留与其野生型对应物相同的治疗效用所需的特征。例如,认为可在 Fc 区进行某些改变,其将引起 C1q 结合和 / 或补体依赖的细胞毒性 (CDC) 改变 (即改善或减小),例如,如 W099/51642 所述。亦参见关于 Fc 区变体的其他实例的 Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821 和 W094/29351。W000/42072 (Presta) 和 W0 2004/056312 (Lowman) 描述了与 FcR 的结合改善或降低的抗体变体。这些专利出版物的内容通过引用具体地结合到本文中。亦参见 Shields 等 *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。US2005/0014934A1 (Hinton 等) 描述了半寿期增加且与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 结合改善的抗体,所述受体负责将母体 IgG 转移给胎儿 (Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和 Kim 等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。这些抗体包含其中具有改善 Fc 区与 FcRn 的结合的一个或多个取代的 Fc 区。美国专利号 6,194,551 和国际公布号 W099/51642 描述了具有改变的 Fc 区氨基酸序列和 C1q 结合能力增加或减少的多肽变体。亦参见 Idusogie 等 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。这些参考的内容通过引用具体地结合到本文中。

[0085] 以下显示了示例性 Fc 结构域。

[0086] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAKGQPR

EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK* (例如 SEQ ID NO: 14)

以下显示了组合的有利接头 (TG₃) 与 Fc 结构域的实例:

TGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

任选 Fc 结构域在例如 Asp-265、赖氨酸 322 和 Asn-434 残基上具有一个或多个突变。

在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有一个或多个这些突变(例如Asp-265突变)的突变型Fc结构域与Fc γ 受体的结合能力减小。在其他情况下,相对于野生型Fc结构域,具有一个或多个这些突变(例如Asn-434突变)的突变型Fc结构域与I类MHC相关Fc受体(FcRN)的结合能力增加。

[0087] 异源多肽

本文所述糖变体融合蛋白亦包含与Fc结构域直接或间接融合的异源多肽部分。异源多肽部分可以是任何多肽。在示例性实施方案中,异源多肽部分的分子量至少为10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90或100 kDa或更大。

[0088] 异源多肽部分可为治疗用蛋白质或其片段,例如生长因子、酶、血清酶、内分泌因子例如GLP1、骨形态发生蛋白和可溶性受体片段。示例性异源多肽包括生长因子,例如肝细胞生长因子(HGF)、神经生长因子(NGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(例如TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3)、血管内皮生长因子(VEGF;例如VEGF-2)、干扰素(例如INF- α 、INF- β)和胰岛素。其他示例性异源多肽包括酶,例如 α 半乳糖苷酶(例如Fabrazyme™)。其他示例性异源多肽包括骨形态发生蛋白(BMP)、红细胞生成素(EPO)、肌肉生长抑制素和肿瘤坏死因子(例如TNF- α)。其他示例性异源多肽包括跨膜受体的胞外域,包括细胞受体的任何天然存在的胞外域及其任何变体(包括突变型、片段和肽模拟形式)。

[0089] 在示例性实施方案中,异源多肽部分为来自TNF/NGF受体家族的受体的胞外域。可溶性受体多肽的实例包括例如本公开内容的SEQ ID NO: 2、5、6、7或8。在优选的实施方案中,具有至少一个非内源N联糖基化位点的糖变体融合蛋白包含的胞外受体结构域保留结合天然存在受体的配体的能力。在某些实施方案中,在胞外受体结构域的配体结合袋之外引入非内源N联糖基化位点。优选引入的糖基化位点的糖基化不会显著影响受体蛋白与可溶性配体的结合。在示例性实施方案中,引入的糖基化位点的糖基化不会使胞外受体结构域与其配体的结合减少超过10倍、5倍、3倍、2.5倍、2倍、1.5倍、1倍、0.5倍或更小倍。优选包含至少一个非内源N联糖基化位点的可溶性受体结构域将以少于1 μ M或者少于100、10或1 nM的解离常数与指定配体结合。

[0090] 在一个实施方案中,本文所述糖变体融合蛋白包含以下异源多肽部分,所述异源多肽部分包含来自神经生长因子(NGF)/肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的受体的胞外域。参见例如M. Lotz等, J. Leukocyte Biology, 60: 1-7 (1990)。NGF/TNF受体家族包括例如神经生长因子受体(NGFR)、TNFR1(或TNFR55)、TNFR2(或TNFR75)、TNF受体相关蛋白(TNFRrp)、CD40、Hodgkin抗原CD30、T细胞抗原CD27、Fas/APO-1、OX-40和4-1BB/ILA。在示例性实施方案中,本文所述融合蛋白包含具有至少一个非内源N联糖基化位点的TNFR2的胞外域。

[0091] 本文所用的术语“TNFR2”是指来自任何物种的2型肿瘤坏死因子受体(TNFR2)蛋白家族以及通过诱变或其他修饰衍生于这类TNFR2蛋白的变体。TNFR2家族成员一般为跨膜蛋白,由具有富含半胱氨酸区的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的胞内信号转导活性的胞质结构域组成。

[0092] 术语“TNFR2多肽”包括包含TNFR2家族成员的任何天然存在的多肽及其保留有用活性的任何变体(包括突变型、片段、融合物和肽模拟形式)的多肽。例如, TNFR2多肽包

括来源于任何已知 TNFR2 序列、具有以下序列的多肽,所述序列与 TNFR2 多肽序列有至少约 80% 同一性、优选至少 85%、90%、95%、97%、99% 或更大同一性。例如,本发明的 TNFR2 多肽可与 TNF α 或 TNF β 结合并抑制 TNFR2 蛋白和 / 或 TNF α 或 TNF β 的功能。TNFR2 多肽的实例包括人 TNFR2 前体多肽 (SEQ ID NO: 1) 和可溶性人 TNFR2 多肽 (例如 SEQ ID NO: 2、5、6、7 或 8)。

[0093] 人 TNFR2 前体蛋白序列如下:

```

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA
QMCCKSKSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSK QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
RPGTETSDVV CKPCAPGTFS NTTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTOPT PEPSTAPSTS FLLPMGSPSP
AEGSTGDEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK*(SEQ ID NO: 1)

```

信号肽用单下划线表示;胞外域用黑体表示;可能的 N 联糖基化位点用双下划线表示。

[0094] 人 TNFR2 可溶性 (胞外的) 经加工的多肽序列如下:

```

LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPPQH AKVFCTKTS
TVCDSCEDST YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP
GWYCALSKQE GCRLCAPLRK CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSMT
TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTRSMA PG AVHLPQPVST
RSQHTOPTPE PSTAPSTSFL LPMGSPPPAE GSTGD (SEQ ID NO: 2)

```

天然存在的 N 联糖基化位点用下划线表示。如本文所报道,可剔除氨基端亮氨酸,在氨基端留下脯氨酸残基。

[0095] 编码人 TRFR2 前体蛋白的核酸序列如下 (Genbank 登录号 NM_001066.2):

```

ATGGCGCCCG TCGCCGTCTG GGCCGCGCTG GCCGTGGAC TGGAGCTCTG GGCTGGGGCG
CAAGCCTTGC CCGCCAGGT GGCATTACA CCTACGCC CGGAGCCCG GAGCACATGC
CGGCTCAGAG AATACTATGA CCAGACAGCT CAGATGTGCT GCAGCAAATG CTCGCCGGG
CAACATGCAA AAGTCTTCTG TACCAAGACC TCGGACACCG TGTGTGACTC CTGTGAGGAC
AGCACATACA CCCAGCTCTG GAACTGGGTT CCCGAGTGCT TGAGCTGTGG CTCCCGCTGT
AGCTCTGACC AGGTGGAAAC TCAAGCCTGC ACTCGGGAAC AGAACCOCAT CTGCACCTGC
AGGCCCGGCT GGTACTGCGC GCTGAGCAAG CAGGAGGGGT GCCGGCTGTG CGCGCCGCTG
CGCAAGTGCC GCCCGGGCTT CGGCGTGGCC AGACCAGGAA CTGAAACATC AGACGTGGTG
TGCAAGCCCT GTGCCCCGGG GACGTTCTCC AACACGACTT CATCCACGGA TATTTGCAGG
CCCCACCAGA TCTGTAACGT GGTGGCCATC CCTGGGAATG CAAGCATGGA TGCAGTCTGC
ACGTCCACGT CCCCCACCG GAGTATGGCC CCAGGGGCG TACACTTACC CCAGCCAGTG
TCCACACGAT CCAACACAC GCAGCCAACT CCAGAACCCA GCACTGCTCC AAGCACCTCC
TTCTGCTCC CAATGGGCC CAGCCCCCA GCTGAAGGGA GCACTGGCGA CTTCGCTCTT
CCAGTTGGAC TGATTGTGGG TGTGACAGCC TTGGGTCTAC TAATAATAGG AGTGGTGAAC
TGTGTCATCA TGACCCAGGT GAAAAAGAAG CCCTTGTGCC TGCAGAGAGA AGCCAAGGTG
CCTCACCTGC CTGCCGATAA GGCCCGGGGT ACACAGGGCC CCGAGCAGCA GCACCTGCTG
ATCACAGCGC CGAGCTCCAG CAGCAGCTCC CTGGAGAGCT CGGCCAGTGC GTTGGACAGA
AGGGCGCCCA CTCGGAACCA GCCACAGGCA CCAGGCGTGG AGGCCAGTGG AGGCCGGGAG
GCCCGGGCCA GCACCGGGAG CTCAGATTCT TCCCCTGGTG GCCATGGGAC CCAGGTCAAT
GTCACCTGCA TCGTGAACGT CTGTAGCAGC TCTGACCACA GCTCACAGTG CTCCTCCAA

```

```
GCCAGCTCCA CAATGGGAGA CACAGATTCC AGCCCCTCGG AGTCCCCGAA GGACGAGCAG
GTCCCCCTCT CCAAGGAGGA ATGTGCCTTT CGGTACACAGC TGGAGACGCC AGAGACCCTG
CTGGGGAGCA CCGAAGAGAA GCCCCTGCC CTTGGAGTGC CTGATGCTGG GATGAAGCCC
AGTTAA (SEQ ID NO: 3).
```

编码人 TNFR2 可溶性（胞外的）多肽的核酸序列如下：

```
TTGC CCGCCCAGGT GGCATTTACA CCCTACGCC CGGAGCCCGG GAGCACATGC CCGCTCAGAG
AATACTATGA CCAGACAGCT CAGATGTGCT GCAGCAAATG CTCGCCGGGC CAACATGCAA
AAGTCTTCTG TACCAAGACC TCGGACACCG TGTGTGACTC CTGTGAGGAC AGCACATACA
CCAGCTCTG GAACTGGGTT CCCGAGTGTG TGAGCTGTGG CTCCCGCTGT AGCTCTGACC
AGGTGGAAAC TCAAGCCTGC ACTCGGGAAC AGAACC GCAT CTGCACCTGC AGGCCCGGCT
GGTACTGCGC GCTGAGCAAG CAGGAGGGGT GCCGGCTGTG CCGCCCGCTG CGCAAGTGCC
GCCCGGGCTT CGGCGTGGCC AGACCAGGAA CTGAAACATC AGACGTGGTG TGCAAGCCCT
GTGCCCCGGG GACGTTCTCC AACACGACTT CATCCACGGA TATTTGCAGG CCCCACCAGA
TCTGTAACGT GGTGGCCATC CCTGGGAATG CAAGCATGGA TGCAGTCTGC ACGTCCACGT
CCCCACCCG GAGTATGGCC CCAGGGGCAG TACACTTACC CCAGCCAGTG TCCACACGAT
CCCAACACAC GCAGCCAACT CCAGAACCCA GCACTGCTCC AAGCACCTCC TTCCTGCTCC
CAATGGGCC CAGCCCCCA GCTGAAGGGA GCACTGGCGA C (SEQ ID NO: 4).
```

本公开内容证实，添加一个或多个 N 联糖基化位点 (NXS/T) 相对于未修饰 TNFR2-Fc 蛋白增加 TNFR2-Fc 融合蛋白的血清半寿期。N 联糖基化位点可以最小努力通过在针对预先存在的 S 或 T 的正确位置处引入 N 来引入，或者通过在针对预先存在的 N 的正确位置处引入 S 或 T 来引入。用于在 TNFR2 中引入非内源 NXS/T 序列的特别适合的位点包括例如与 SEQ ID NO: 2 有关的 25-27 位 (DQT)、26-28 位 (QIA)、133-135 位 (ETS) 和 231-233 位 (GST) 氨基酸。例如，将引入 N 联糖基化位点的所需改变为：D25N、Q26N、A28S、E133N 和 G231N。在一些情况中，可修饰数个氨基酸以引入非内源 NXS/T 序列。例如，Q26N/A28S 的双重取代提供在 SEQ ID NO: 2 的残基 26-28 引入新 N 联糖基化位点所需的 N 和 S 残基二者。此外，可修饰 TNFR2-Fc 多肽上的不止一个区以引入包含的多个 N 联糖基化位点。例如，D25N/E133N 的双重取代在 SEQ ID NO: 2 的残基 25-27 和残基 133-135 引入两个 N 联糖基化位点，D25N/G231N 的双重取代在 SEQ ID NO: 2 的残基 25-27 和残基 231-233 引入两个 N 联糖基化位点。其他示例性 TNFR2 变体包括例如 E133N/G231N、Q26N/A28S/E133N 和 Q26N/A28S/G231N。因为糖基化给予的保护，预测被糖基化的任何 S 可改变成 T，而不产生免疫原性位点。同样，预测被糖基化的任何 T 可改变成 S。

[0096] 3. 编码糖变体融合蛋白的核酸

在某些方面，本发明提供编码任何本发明的糖变体融合蛋白的分离核酸和 / 或重组核酸，包括本文公开的片段和功能变体。主题核酸可呈单链或双链。这类核酸可以是 DNA 或 RNA 分子。可将这些核酸用于例如制备本发明糖变体融合蛋白的方法或作为直接治疗剂（例如在基因疗法中）。

[0097] 在示例性实施方案中，本发明的核酸编码 TNFR2-Fc 糖变体融合蛋白。例如，SEQ ID NO: 3 编码天然存在的人 TNFR2 前体多肽，SEQ ID NO: 4 编码经加工的 TNFR2 胞外域。

[0098] 在某些实施方案中，编码本发明糖变体融合蛋白的主题核酸还理解为包括是 SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 的变体的核酸。变体核苷酸序列包括因一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同的序列，例如等位基因变体。在示例性实施方案中，变体核酸包含导致在编码的蛋白质中引入一个或多个非内源 N 联糖基化位点的核酸序列修饰。

[0099] 在某些实施方案中，本发明提供以下分离核酸序列或重组核酸序列，其与 SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 同一性，并含有导致在编码

的蛋白质中引入非内源 N 联糖基化位点的一个或多个序列修饰。本领域普通技术人员将理解的是,与 SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 互补的核酸序列,以及在编码的蛋白质中引入一个或多个非内源 N 联糖基化位点的 SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 的变体,也在本发明的范围内。在另外的实施方案中,本发明的核酸序列可被分离、重组和 / 或与异源核苷酸序列融合,或者存在于 DNA 文库中。

[0100] 在其它实施方案中,本发明的核酸还包括以下核苷酸序列,其在高严格条件下与 SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 所指定的核苷酸序列、SEQ ID NO: 3、4、9 或 17 的互补序列或者其片段杂交。这类核苷酸序列编码具有一个或多个非内源 N 联糖基化位点的糖变体蛋白融合物。本领域的普通技术人员应容易地理解的是,可以改变促进 DNA 杂交的适当严格性条件。本领域的普通技术人员应容易地理解的是,可以改变促进 DNA 杂交的适当严格性条件。例如,可在 6.0 x 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 下于约 45°C 进行杂交,接着 2.0 x SSC 于 50°C 洗涤。例如,可从约 2.0 x SSC 于 50°C 的低严格性到约 0.2 x SSC 于 50°C 的高严格性选择洗涤步骤的盐浓度。另外,洗涤步骤的温度可从室温 (约 22°C) 下的低严格性条件提高到约 65°C 下的高严格性条件。温度和盐二者均可改变,或者可保持温度或盐浓度恒定,而改变另一个变量。在一个实施方案中,本发明提供在 6 x SSC 于室温的低严格性条件下杂交接着 2 x SSC 于室温洗涤的核酸。

[0101] 因遗传密码简并而不同于 SEQ ID NO: 3、4 或 9 所示核酸并且在编码的蛋白质中引入一个或多个非内源 N 联糖基化位点的分离核酸变体也在本发明的范围内。例如,用不止一个三联体标示多个氨基酸。限定同一氨基酸的密码子或同义密码子 (例如 CAU 和 CAC 是组氨酸的同义密码子),可导致不影响蛋白质的氨基酸序列的“沉默”突变。然而,预期在哺乳动物细胞中可存在确实引起主题蛋白质氨基酸序列改变的 DNA 序列多态性。本领域技术人员应理解的是,由于天然等位基因变化所致,在给定物种的个体之间,这些变化可存在于编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸 (多至约 3-5% 的核苷酸) 中。任何和所有这类核苷酸变化和所得氨基酸多态性也在本发明的范围内。

[0102] 在某些实施方案中,在表达构建体中,本发明的重组核酸可与一个或多个调节核苷酸序列可操作连接。调节核苷酸序列一般可适于用于表达的宿主细胞。本领域已知用于各种宿主细胞的许多类型的合适表达载体和合适调节序列。所述一个或多个调节核苷酸序列通常可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列及增强子或激活物序列。本发明考虑本领域已知的组成型启动子或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或将不止一种启动子的元件组合的杂合启动子。表达构建体可存在于细胞的附加体例如质粒上,或者表达构建体可插入染色体中。在优选的实施方案中,表达载体含有选择标记基因以供转化宿主细胞的选择。选择标记基因是本领域众所周知的并且可随所采用的宿主细胞而改变。

[0103] 在某些实施方案中,在包含编码本发明糖变体融合蛋白并与至少一个调节序列可操作连接的核苷酸序列的表达载体中提供主题核酸。调节序列是本领域公认的,并被选择以指导本发明多肽的表达。因此,术语调节序列包括启动子、增强子和其它表达调控元件。示例性的调节序列参见 Goeddel ;Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。例如,控制 DNA 序列表达的各种表达调控序列的任一种当与 DNA 序列可操作连接时,可用于这些载体以表达编码糖变体融合蛋白的

DNA 序列。这类有用的表达调控序列包括例如 SV40 的早期启动子和晚期启动子、tet 启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV 启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、其表达受 T7 RNA 聚合酶指导的 T7 启动子、噬菌体 λ 的主要操纵基因和启动子区、fd 外壳蛋白的调控区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶启动子（例如 Pho5）、酵母 α -交配因子启动子、杆状病毒系统的多角体 (polyhedron) 启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其它序列及其各种组合。应当理解的是，表达载体的设计可取决于以下因素，例如：待转化的宿主细胞的选择和 / 或欲表达的蛋白质类型。此外，还应考虑载体拷贝数、控制该拷贝数的能力和由该载体编码的任何其它蛋白质的表达，例如抗生素标记。

[0104] 本发明的重组核酸可通过将克隆的基因或其部分连接到适于在原核细胞、真核细胞（酵母、禽、昆虫或哺乳动物）或两者中表达的载体中来产生。用于产生重组的本发明糖变体融合蛋白的表达载体包括质粒和其它载体。例如，合适的载体包括用于在原核细胞（例如大肠杆菌）中表达的以下类型的质粒：pBR322 衍生质粒、pEMBL 衍生质粒、pEX 衍生质粒、pBTac 衍生质粒和 pUC 衍生质粒。

[0105] 一些哺乳动物表达载体既含有利于载体在细菌中繁殖的原核序列，又含有在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单元。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 衍生载体是适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些用来自细菌质粒（例如 pBR322）的序列修饰，以利于在原核细胞和真核细胞两者中复制和进行药物抗性选择。或者，可使用诸如牛乳头瘤病毒 (BPV-1) 或埃巴病毒 (pHEBo、pREP 衍生物和 p205) 等病毒衍生物在真核细胞中瞬时表达蛋白质。其它病毒（包括反转录病毒）表达系统的实例可见下面基因疗法递送系统的描述。用于质粒制备和宿主生物转化中的各种方法是本领域众所周知的。对于原核和真核细胞两者的其它合适的表达系统以及通用重组方法，参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第3版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编辑 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。在某些情况下，可能需要通过利用杆状病毒表达系统来表达重组糖变体融合蛋白。这类杆状病毒表达系统的实例包括 pVL 衍生载体（例如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941）、pAcUW 衍生载体（例如 pAcUW1）和 pBlueBac 衍生载体（例如含 β -gal 的 pBlueBac III）。

[0106] 在一个优选的实施方式中，可设计在 CHO 细胞中产生本发明主题糖变体融合蛋白的载体，例如 Pcmv-Script 载体 (Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4 载体 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 和 pCI-neo 载体 (Promega, Madison, Wisc.)。显然，可使用主题基因构建体在培养基中繁殖的细胞中使主题糖变体融合蛋白表达（例如产生蛋白质，包括融合蛋白或变体蛋白）以便纯化。

[0107] 本公开内容还涉及用重组基因转染的宿主细胞，所述重组基因包括一种或多种本发明主题糖变体蛋白融合物的编码序列。宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如，可在细菌细胞（例如大肠杆菌）、昆虫细胞（例如利用杆状病毒表达系统）、酵母或哺乳动物细胞中表达本发明的糖变体融合蛋白。其它合适的宿主细胞为本领域技术人员所知。优选宿主细胞为哺乳动物宿主细胞，例如 CHO 或 BHK 细胞系，其将在表达的蛋白质上产生哺乳动物糖基化模式。

[0108] 因此,本发明还涉及产生本发明主题糖变体融合蛋白的方法。例如,可将用编码Fc融合蛋白的表达载体转染的宿主细胞培养在合适的条件下以允许表达Fc融合蛋白。可使Fc融合蛋白分泌并从细胞和含有Fc融合蛋白的培养基的混合物中分离出来。或者,可将Fc融合蛋白保持在胞质或在膜部分中,然后收获、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产品。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。可采用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术,包括离子交换层析法、凝胶过滤层析法、超滤法、电泳、使用对Fc融合蛋白的特定表位有特异性的抗体进行免疫亲和纯化以及用结合至与Fc融合蛋白融合的结构域的物质进行亲和纯化(例如A蛋白柱可用来纯化Fc融合蛋白),将主题Fc融合蛋白从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离出来。在一个优选的实施方案中,Fc融合蛋白包含利于其纯化的附加结构域。在一个优选的实施方案中,通过一系列的柱层析步骤达到纯化,包括例如任何顺序的下列三种或更多种方法:A蛋白层析法、Q琼脂糖凝胶层析法、苯基琼脂糖凝胶(phenylsepharose)层析法、大小排阻层析法和阳离子交换层析法。纯化可用病毒过滤和缓冲液更换来完成。可将本发明的糖变体融合蛋白纯化至通过大小排阻层析法测定的>98%的纯度和通过SDS PAGE测定的>95%的纯度。

[0109] 在另一个实施方案中,编码纯化前导序列(例如本发明重组糖变体Fc融合蛋白的所需部分N端的聚-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因,可允许使用Ni²⁺金属树脂通过亲和层析法来纯化表达的融合蛋白。纯化前导序列随后可通过肠激酶处理除去,得到纯化的本发明糖变体融合蛋白(例如参见Hochuli等(1987) J. Chromatography 411:177;以及Janknecht等,PNAS USA 88:8972)。

[0110] 制备融合基因的技术是众所周知的。基本上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接按照常规技术进行,采用用于连接的平端或交错端,限制性内切酶消化以提供合适末端,适当时补平黏性末端,碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接,并进行酶促连接。在另一个实施方案中,融合基因可通过常规技术合成,包括自动化DNA合成仪。或者,可使用在两个连续基因片段之间产生互补突出端的锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述基因片段随后可退火产生嵌合基因序列(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等编辑,John Wiley & Sons:1992)。

[0111] 4. 增加血清半寿期的方法

在具体实施方案中,本发明涉及通过修饰融合蛋白以在Fc结构域之外引入一个或多个非内源N联糖基化位点,来增加Fc融合蛋白的稳定性和/或半寿期(例如体外半寿期、体内半寿期或血清半寿期)的方法。例如,这类方法可包括修饰Fc融合蛋白的序列以引入一个或多个非内源N联糖基化位点并在合适细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或人细胞)中表达编码所述修饰多肽的核酸,以产生糖变体Fc融合蛋白。这类方法可包括:a)在适于表达所述修饰多肽的条件下培养细胞,其中用修饰多肽的表达构建体转化所述细胞;和b)回收如此表达的修饰蛋白。纯化可通过一系列的纯化步骤实现,包括例如任何顺序的以下1、2或3种或更多种方法:A蛋白层析法、阴离子交换层析法(例如Q琼脂糖凝胶)、疏水相互作用层析法(例如苯基琼脂糖凝胶)、大小排阻层析法和阳离子交换层析法。本公开内容的这类多肽可进一步配制成液体或固体(例如冻干形式)。可使用所述方法产生本文所述任一种糖变体融合蛋白。

[0112] 在优选的实施方案中,相对于缺乏引入的糖基化位点的融合蛋白的血清半寿期,

在一个或多个引入的糖基化位点的糖基化使修饰融合蛋白的半寿期（例如，体外半寿期、体内半寿期、血清半寿期）增加至少 10%、25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225% 或 250% 或更多。在某些实施方案中，本公开内容的方法可用来在本公开内容的融合蛋白的每 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或 200 个氨基酸中引入至少一个糖基化氨基酸。在某些实施方案中，本公开内容的方法可用来引入糖基化位点以维持各个被 N 联糖基化、O 联糖基化或两者修饰的氨基酸之间被至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 个或更多个氨基酸隔开。

[0113] 在某些实施方案中，本公开内容提供用于延长融合蛋白的半寿期的方法，所述融合蛋白包含至少一个异源多肽结构域和免疫球蛋白 Fc 结构域。例如，这类方法可包括：a) 在免疫球蛋白 Fc 结构域之外修饰 Fc 融合蛋白以引入一个或多个非内源 N 联糖基化位点和 b) 表达 Fc 融合蛋白使得引入的糖基化位点之一为糖基化的。例如，本文所公开的方法可用来延长包含受体胞外域的一部分（例如，可溶性部分）的 Fc 融合蛋白的半寿期，所述部分包含配体结合域。在某些实施方案中，将所述方法用于在 Fc 融合蛋白的配体结合域之外引入糖基化位点。在优选的实施方案中，用于引入糖基化位点的方法不会显著影响融合蛋白的受体部分与可溶性配体的结合，例如，相对于缺乏引入的糖基化位点的 Fc 融合蛋白的配体结合，配体结合所受影响小于 2、3、5、10 或 15 倍。在一些实施方案中，本公开内容的方法用来在包含接头结构域的融合蛋白上引入一个或多个糖基化位点。在某些实施方案中，本公开内容的方法可用于在接头结构域之内引入至少一个糖基化位点。一般地，将本文所公开的方法用于增加具有异源结构域的融合蛋白的半寿期，所述异源结构域具有较高分子量例如至少 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105 或 110 kDa 的较高分子量蛋白。

[0114] 5. 筛选测定法

在某些方面，本发明提供用于鉴定维持至少一种生物活性且稳定性增加和 / 或血清半寿期增加的糖变体 Fc 融合蛋白的筛选测定法。可对糖变体融合蛋白进行测试以评价其调节生物活性的能力、评价其稳定性和 / 或评价其体内或体外血清半寿期。例如可在动物模型中对糖变体融合蛋白进行测试。

[0115] 有许多筛选本发明糖变体融合蛋白的生物活性的方法，例如，当测定糖变体受体 -Fc 融合蛋白时，可测定修饰受体与配体结合的能力，或者亦可测定糖变体融合蛋白干扰配体 - 受体信号转导的能力。在某些实施方案中，可对糖变体融合蛋白进行高通量筛选，以鉴定保留未修饰蛋白的至少一种生物活性的糖变体，例如扰乱对所选细胞系的配体介导作用或受体介导作用的受体变体。

[0116] 各种测定形式便可满足需要，然而根据本公开内容，本领域的普通技术人员仍应了解未在本文明确描述的测定形式。如本文所述，可通过筛选由编码所述融合蛋白的核酸的相应片段重组产生的多肽，来获得本发明的糖变体融合蛋白。另外，可采用本领域已知技术，例如常规 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化学法来化学合成片段。

[0117] 可通过对由编码所述融合蛋白的相应的诱变核酸重组产生的修饰融合蛋白文库进行筛选，来获得本发明的功能活性糖变体融合蛋白。可产生糖变体，并测试以鉴定保留未修饰融合蛋白的至少一种生物活性的糖变体，所述生物活性为例如糖变体受体融合物充当各种细胞受体蛋白（例如 TNFR2 受体蛋白）和 / 或由配体 - 受体结合介导的胞内信号转导

的拮抗剂（抑制剂）的能力。

[0118] 可通过修饰本发明融合蛋白的氨基酸序列以增加稳定性和 / 或血清半寿期, 来产生功能糖变体。如果选择保留生物活性（例如配体结合）, 则这类修饰的糖变体蛋白被视为未修饰融合蛋白的功能等同物。还可通过例如氨基酸取代、缺失或添加以引入一个或多个 N 联糖基化位点和 / 或其他序列修饰（例如保守取代）, 来产生修饰的糖变体融合蛋白。例如, 有理由预期, 亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸单独置换、天冬氨酸被谷氨酸单独置换、苏氨酸被丝氨酸单独置换, 或者氨基酸被结构上相关的氨基酸进行类似置换（例如保守突变）将不会对所得分子的生物活性产生重大影响。保守置换是发生在其侧链上是相关的氨基酸家族内的置换。可通过评价变体融合蛋白以类似于未修饰融合蛋白的方式表现出生物活性的能力, 来容易地确定本发明的融合蛋白的氨基酸序列的改变是否产生功能同源物。例如, 可针对与特异性配体（例如 TNF α 或 TNF β ）结合的能力, 对变体受体 Fc 融合蛋白（例如 TNFR2-Fc 融合蛋白）进行筛选, 以防止配体与受体多肽结合, 或干扰由配体与受体的结合引起的信号转导。

[0119] 可通过编码融合蛋白文库的基因的简并文库产生糖变体融合蛋白的组合文库, 所述融合蛋白文库的融合蛋白各自包含可能的多肽序列的至少一部分。例如, 可以酶法将合成寡核苷酸的混合物与基因序列连接, 使得可能的多肽核苷酸序列的简并组可作为个别多肽表达, 或者作为一组较大的融合蛋白表达（例如用于噬菌体展示）。

[0120] 存在许多可从简并寡核苷酸序列产生潜在糖变体的文库的方法。可在自动 DNA 合成仪中进行简并基因序列的化学合成, 然后将合成基因与用于表达的合适载体连接。简并寡核苷酸的合成是本领域众所周知的（参见例如 Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura 等 (1981) *Recombinant DNA, Proc.* 第 3 版, Cleveland Sympos. *Macromolecules*, 主编 AG Walton, Amsterdam: Elsevier, 第 273-289 页; Itakura 等 (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura 等 (1984) *Science* 198:1056; Ike 等 (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。这类技术已应用于其他蛋白质的定向进化中（参见例如 Scott 等 (1990) *Science* 249:386-390; Roberts 等 (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin 等 (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla 等 (1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 以及美国专利号 5, 223, 409、5, 198, 346 和 5, 096, 815）。

[0121] 本领域已知以下各种技术, 其用于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物, 和在这方面筛选具有某些性质的基因产物的 cDNA 文库。这类技术一般可适用于快速筛选由本发明糖变体融合蛋白的组合诱变所产生的基因文库。最广泛采用的筛选大型基因文库的技术通常包括将基因文库克隆至可复制的表达载体中, 用所得载体文库转化合适的细胞, 并在这样的条件下表达组合基因, 即其中所需活性的检测有利于相对容易地分离编码其产物被检测的基因的载体。

[0122] 优选的测定法包括受体 - 配体结合测定法和配体介导的细胞信号转导测定法。可通过各种技术来检测本发明的糖变体受体 - Fc 融合蛋白和配体之间的复合体形成。例如, 可使用例如可检测标记的蛋白质, 例如放射性标记（例如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H ）、荧光标记（例如 FITC）或酶标记的受体多肽或配体, 通过免疫测定或通过层析检测, 定量测定复合体形成的调节。

[0123] 在某些实施方案中, 本发明考虑在直接或间接测定糖变体受体 - Fc 融合蛋白与

其结合配体间的相互作用的程度中,采用荧光偏振测定法和荧光共振能量转移 (FRET) 测定法。另外,其它检测方式,例如基于光波导 (PCT 公布号 WO 96/26432 和美国专利号 5,677,196)、表面等离子共振 (SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的检测方式都适于本发明的许多实施方案。

[0124] 此外,本发明考虑采用相互作用陷阱测定法 (interaction trap assay),亦称“双杂合测定法 (two hybrid assay)”,鉴定干扰或增强糖变体 Fc 融合蛋白与其结合配偶体之间相互作用的物质。参见例如美国专利号 5,283,317 ;Zervos 等 (1993) Cell 72:223-232 ; Madura 等 (1993) J Biol Chem 268:12046-12054 ;Bartel 等 (1993) Biotechniques 14:920-924 ;以及 Iwabuchi 等 (1993) Oncogene 8:1693-1696)。或者,可采用体外生化方法在蛋白质水平上鉴定这类蛋白质-蛋白质相互作用,包括光致交联、放射性标记配体结合和亲和层析法 (Jakoby WB 等,1974, Methods in Enzymology 46 :1)。在某些情况下,可在基于机制的测定法中筛选糖变体融合蛋白,例如检测与配体或受体多肽结合的糖变体融合蛋白的测定法。这可包括固相或液相结合事件。或者,可将编码配体或受体多肽的基因与报道系统 (例如 β -半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白) 一起转染至细胞中,任选通过高通量筛选或用糖变体文库的各个成员针对糖变体文库进行筛选。可采用其它基于机制的结合测定法,例如检测自由能变化的结合测定法。结合测定法可用固定于孔、珠粒或芯片或被固定化抗体俘获或被毛细管电泳分离的靶标进行。通常可采用比色法或荧光法或表面等离子共振检测结合的蛋白质。

[0125] 6. 示例性治疗应用

在各个实施方案中,用本发明糖变体融合蛋白治疗的患者,或者用本发明糖变体融合蛋白治疗的候选患者,可为哺乳动物,例如啮齿类和灵长类以及特别是人类患者。在某些实施方案中,本公开内容提供以半寿期增加为特征的修饰可溶性受体-Fc 融合物。先前已描述将受体-Fc 融合物用于治疗多种病症和病况,其在本文中概述。

[0126] 本文所用的“预防”病症或病况的治疗药是指以下治疗药,其在统计样本中,相对于未治疗对照样品,减少治疗样品中的病症或病况的发生,或者相对于未治疗对照样品,延缓病症或病况的一种或多种症状发作或者降低病症或病况的一种或多种症状的严重程度。本文所用的术语“治疗”包括指定病况的预防或者病况一旦确立便改善或根除病况。在任一种情况下,可在医师或其他医疗保健提供者给出的诊断和给予治疗剂的预期结果中分辨预防或治疗。

[0127] 在一些实施方案中,本公开内容提供包含 TNFR2 受体的胞外域、血清半寿期增加的糖变体融合蛋白。这类 TNFR2-Fc 糖变体融合物可用来预防或治疗各种 TNF α 介导的病症或病况,包括例如急性和慢性免疫病理和自身免疫病理 (例如系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、青少年慢性关节炎、甲状腺炎 (thyroidosis)、移植物抗宿主病、硬皮病、糖尿病、格雷夫斯氏病)、脊椎关节病、与感染有关的病症 (例如由急性或慢性细菌感染、急性和慢性寄生虫病和 / 或感染性疾病、细菌、病毒或真菌引发的脓毒症综合征、恶病质、循环衰竭和休克)、慢性炎性病理 (例如硬皮病、结节病、慢性炎性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病理)、血管炎性病理 (例如弥散性血管内凝血、动脉粥样硬化和川崎氏病理 (Kawasaki's pathology)) 和神经变性疾病 (例如多发性硬化、急性横贯性脊髓炎、锥体外束病、亨廷顿舞蹈病和老年性舞蹈病 ;帕金森病、进行性核上性麻痹、脊髓性共济失调、弗里德赖希共济

失调、Mencel 病、Dejerine-Thomas 病、Shi-Drager 病、MachadoJoseph 病、雷夫叙姆病、无 β 脂蛋白血症 (abetalipoproteinemia)、毛细血管扩张、线粒体多系统障碍、肌萎缩侧索硬化、婴儿脊髓性肌萎缩、青少年脊髓性肌萎缩、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、弥漫性 Lewy 体疾病、韦 - 科综合征、克 - 雅病、亚急性硬化性全脑炎、哈 - 斯病 (Hallerrorden-Spatz disease) 和拳击员痴呆)。

[0128] 7. 药物组合物

在某些实施方案中,将本文所述糖变体融合蛋白与药学上可接受的载体一起配制。例如,本公开内容的融合蛋白可单独给予或作为药物制剂(治疗组合物)的组分给予。可以任何对用于人或兽药适宜的方式配制主题化合物用于给药。适当的剂量方案可由主治医师确定,并且可根据用于未修饰形式的治疗蛋白的标准剂量方案得知。

[0129] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法包括全身给予或者以植入物或装置局部给予组合物。当给药时,用于本发明的治疗组合物当然是无致热原的生理学上可接受的形式。除本文所述融合蛋白以外还可任选包含在上述组合物中的治疗上有用的物质,可与本发明方法的主题融合蛋白同时或序贯给予。

[0130] 通常可胃肠外给予本文所述融合蛋白。适于胃肠外给予的药物组合物可包含一种或多种本公开内容的融合蛋白以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散体、混悬液或乳液或者无菌粉剂(所述粉剂可在临用前用无菌注射用溶液或分散体复溶),其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。可用于本发明药物组合物的合适水性载体和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和注射用有机酯(例如油酸乙酯)。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂),在分散体的情况下通过保持所需要的粒径,以及通过使用表面活性剂,来保持适当的流动性。

[0131] 另外,组合物可以用于递送至靶组织部位(例如骨、肌肉、循环系统等)的形式装入胶囊或注射。在某些实施方案中,本发明的组合物可包含基质,其能够将一种或多种治疗化合物(例如糖变体融合蛋白)递送到靶组织部位(例如骨、肌肉、循环系统),为发育组织提供结构,并且最好能够被再吸收进体内。例如,基质可使本公开内容的融合蛋白缓释。这类基质可由目前用于其它植入医学应用的材料形成。

[0132] 基质材料的选择取决于生物相容性、生物降解能力、机械性能、美容外观和界面性质。主题组合物的具体应用将界定适当的制剂。用于组合物的可能的基质可以是生物可降解的和化学上确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚酞。其它可能的材料是生物可降解的和生物学上明确限定的,例如骨或真皮胶原。另外的基质由纯的蛋白质或胞外基质组分组成。其它可能的基质是非生物可降解的和化学上确定的,例如烧结羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由任何上述类型的材料的组合组成,例如聚乳酸和羟磷灰石或胶原和磷酸三钙。生物陶瓷可在组成方面改变,例如呈钙 - 铝酸盐 - 磷酸盐,并进行加工以改变孔径、粒径、颗粒形状和生物降解能力。

[0133] 在某些实施方案中,可将融合蛋白配制成以例如下列形式口服给予:胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基料,通常为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)、散剂、颗粒剂,或者作为水性液体或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或作为水包油或油包水液体乳剂、或作为酞剂或糖浆剂、或作为软锭剂(使用惰性基料,例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)

和 / 或作为漱口剂等,各自含有预定量的物质作为活性成分。药剂还可作为大丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0134] 在口服给药的固体剂型(例如胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸和散剂、颗粒剂)中,可将一种或多种本发明融合蛋白与一种或多种药学上可接受的载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或以下的任一种:(1) 填充剂或增充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸;(2) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯胶;(3) 湿润剂,例如甘油;(4) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂,例如石蜡;(6) 吸收促进剂,例如季铵化合物;(7) 润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10) 着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。在使用诸如乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软充填和硬充填明胶胶囊剂中,相似类型的固体组合物也可用作填充剂。

[0135] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除活性成分以外,液体剂型可含有常用于本领域的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体而言为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可包含辅料,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0136] 除融合蛋白以外,混悬剂还可含有助悬剂,例如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨糖醇和失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶及其混合物。

[0137] 本发明的组合物还可含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过加入各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等,来确保防止微生物的作用。组合物中还可能需要包含等渗剂(例如糖、氯化钠等)。另外,可通过加入延迟吸收的物质(例如单硬脂酸铝和明胶),使注射用药物形式的吸收延长。

实施例

[0138] 现对本发明进行了大致描述,通过参照下列实施例可更容易地理解本发明,包括该实施例仅用于说明本发明的某些实施方案和实施方案的目的,并无意限制本发明。

[0139] 实施例 1:糖变体 TNFR2-Fc 融合蛋白的表达

申请人构建了用于表达各种 TNFR2-Fc 融合蛋白的载体,每个 TNFR2-Fc 融合蛋白均含有附加的 N 联糖基化位点。对照 TNFR2-Fc 融合蛋白(即基础的或“最初”未修饰形式的 TNFR2-Fc)具有在没有插入接头的情况下与人 IgG1 Fc 结构域融合的人 TNFR2 胞外域。在图 1 中显示最初 TNFR2-Fc 融合蛋白的序列(SEQ ID NO:5),在图 5 中显示编码核酸(包括前导序列)(SEQ ID NO:8)。图 1 所示融合蛋白为更完全标示的 TNFR2-h(1)Fc。如图 9 所示,命名为 TNFR2-h(2)Fc 的变体具有备选接头 / 边界序列(SEQ ID NO:16),且由图 10 所示核苷酸序列(SEQ ID NO: 17)编码。将蛋白构建体克隆至 pAID4 载体,以在哺乳动物细胞

中表达 (Pearsall 等 PNAS 105(2008): 7082-7087)。

[0140] 对于最初的试验,将 TNFR2-Fc 的糖变体在 HEK293 细胞中瞬时表达。简而言之,在 500ml 旋转器 (spinner) 中,将 HEK293T 细胞以 6×10^5 个细胞 /ml 接种在体积为 250ml 的 Freestyle (Invitrogen) 培养基中,并培养过夜。第二天,使用最终 DNA 浓度为 0.5 ug/ml 的 DNA:PEI (1:1) 复合物处理这些细胞。4 小时后,加入 250 ml 培养基并培养细胞 7 天。通过离心细胞收获条件培养基并浓缩。

[0141] 采用各种技术纯化变体,包括例如 A 蛋白柱 (Mab Select™, GE Healthcare LifeSciences, USA) 并用低 pH (3.0) 甘氨酸缓冲液洗脱,接着进行大小排阻层析法。将蛋白质对磷酸盐缓冲液或 Tris 缓冲液透析。

[0142] 虽然图 5 中提供的蛋白质序列指出 N 端序列“LPA……”,但是显著部分的各个蛋白质显示,已除去 N 端亮氨酸,产生 N 端序列“PAQ……”。因此,本文所公开的 TNFR2-Fc 分子的任一个可具有一个或两个自 N 端除去的氨基酸。

[0143] 考虑使用三个不同的前导序列:

- (i) 蜜蜂蜂毒肽 (HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 10),
- (ii) 组织纤溶酶原激活物 (TPA):MDAMKRGLLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 11),和
- (iii) 天然 TNFR:MAPVAVWAALAVGLELWAAHA (SEQ ID NO: 15)。

[0144] 可通过一系列柱层析步骤来实现另外的纯化,包括例如任何顺序的下列三种或更多种方法:Q 琼脂糖凝胶层析法、苯基琼脂糖凝胶层析法、羟磷灰石层析法和阳离子交换层析法。纯化可用病毒过滤和缓冲液更换来完成。

[0145] 实施例 2:糖变体 TNFR2-Fc 融合蛋白的设计

通过检验 TNFR2 胞外域与其配体 TNF 的共结晶结构 (晶体坐标公开可得),和通过应用本文所述原理,选择引入附加 N 联糖基化位点的位置。选择在以下位置的改变并在图 7 中显示,预测所述位置的改变保留蛋白质的 TNF 拮抗剂活性,同时赋予延长的半寿期。注意的是,氨基酸编号基于天然未加工 TNFR2 氨基酸序列,如图 7 所示。将改变的 TNFR2-Fc 融合蛋白设计成在以下位置之一具有附加的 N 联糖部分:47、48、62、114、155、202、203、222 和 253 位。注意的是,天然 TNFR2-Fc 在 171 位和 193 位具有 N 联糖部分,这意味着最初 TNFR2-Fc 融合蛋白的异源结构域中 N 联糖部分与氨基酸之比为 1:117.5。将附加糖部分的预测位置映射到 TNFR2-TNF 共结晶结构,其在图 6 中显示。图 8 指出 TNFR2 胞外域中 β 链二级结构的预测位置,其通过与相关蛋白质的序列比较和结构同源性进行推测。将各个新的 N 联位点置于结构元件之内。例如,在 47 位和 48 位引入的位点在第一个 β 折叠结构元件之内。在产生和测试具有单个附加的 N 联糖基化位点的蛋白质之后,产生组合突变型并进行测试。

[0146] 实施例 3:测试 TNFR2-Fc 糖变体蛋白

用一系列测定法测试 TNFR2-h(1)Fc 的糖变体,以评价修饰分子的功能性以及修饰对分子的药代动力学性质的影响。

[0147] 为了用无细胞生化测定法评价配体结合,使用 Biacore® 3000 生物传感器。简而言之,将 TNFR2-h(1)Fc 变体加入流动池中,然后暴露给 TNF。通过评估动力学参数 (k_a 和 k_d) 来计算解离常数 (K_D)。

[0148] 为了评价配体抑制,基本上如 Khabar 等 Immunol. Lett. 46 (1995): 107-110 所述使用了用于 TNF 信号转导的基于细胞的测定法。简而言之,在 TNF- α (R&D Systems,

Minneapolis, Minn.) 和放线菌素 D 存在下培养 WEHI 细胞 (ATCC)。TNF- α 引起这些细胞的凋亡,以及在 A_{490nm} 检测裂解速率。TNF- α 拮抗剂的存在引起信号减少,这允许检测 IC50。[0149] 为了评价分子的药代动力学性质,采用标准技术在 Sprague-Dawley 大鼠中进行研究。简而言之,在顺应期后,给予动物 TNFR2-h(1)Fc 分子,并在最初给药后第 6、10、24、32、48、72、96、144、216 和 312 小时通过尾部切口采血。通过用于人 Fc 部分的 ELISA 检测 TNFR2-Fc 分子的存在情况。

[0150] 将数据针对获自天然 TNFR2-h(1)Fc 分子的数据进行标准化,以使各个试验之间的可变性最小化。标准化的值见下。表现出所需特性的蛋白质用灰色和下划线显示。

蛋白构建体	K_D (TNF- α)	IC50 (WEHI 测定法)	$T_{1/2}$ (大鼠)
TNFR-h(1)Fc wt (标准化的值)	1.0	1.0	1.0
D47N	1.6	1.9	Nd*
Q48N A50S	<u>1.7</u>	<u>1.6</u>	<u>1.5</u>
H62N K64T	无亲和力	Nd**	Nd**
Q114N R116S	无亲和力	Nd**	Nd**
E155N	<u>1.6</u>	<u>1.3</u>	<u>1.6</u>
S202N	<u>0.36</u>	<u>0.78</u>	<u>1.3</u>
T203N P205S	0.33	0.29	0.44
T222N	0.78	0.25	0.45
G253N	<u>0.41</u>	<u>1.1</u>	<u>1.3</u>
D47N E155N	2.6	1.6	1.1
D47N S202N	4.4	1.1	1.1
D47N G253N	55	3.0	1.4
E155N G253N	3.6	0.57	0.72
S202N G253N	1.05	0.23	0.65
E155N S202N G253N	1.0	0.25	0.89

*未以允许体内测试的足够的量表达 D47N 蛋白。

**将 N 联糖置于 62 位或 114 位的突变引起配体结合的完全破坏,未评价其他性质。

[0151] 上述数据指出,几乎一半含有单个附加的 N 联位点的变体 (4/9) 基本上表现出改善的血清半寿期,同时保留与野生型分子类似的配体结合和拮抗作用。由于异速生长比例换算 (allometric scaling) 对血清半寿期的影响,大鼠血清半寿期 20-30% 的变化应在用于人患者的给药方案中提供有意义的改进。有趣的是,组合突变通常似乎减少血清半寿期或蛋白质活性,表明在此分子中,糖基化密度的进一步增加不再有帮助。

[0152] 这些数据证实,利用本文提供的教导,可有效地产生血清半寿期延长的 Fc 融合分子。

[0153] 实施例 4:药代动力学大鼠测定

可采用标准技术在 Sprague-Dawley 大鼠中测定糖变体分子的药代动力学性质。简而

言之,在顺应期后,皮下 (SC) 给予八 (8) 只动物糖变体分子,并在最初给药后第 6、10、24、32、48、72、96、144、216 和 312 小时通过尾部切口采血。可利用任何适于靶蛋白的方法检测糖变体分子的存在情况。例如,可使用用于人 Fc 部分的 ELISA 来检测糖变体 Fc 融合蛋白。计算每只独立动物的血清消除半寿期 ($T_{1/2}$)。计算糖变体分子的平均 $T_{1/2}$ 和标准差。如果还未测定,则可进行类似研究来测定以相同剂量给予的合适对照分子 (例如不含引入的 N 联糖基化位点的 Fc 融合蛋白) 的平均 $T_{1/2}$ 和标准差。使用合适的统计检验 (例如斯氏 (Student's) t 检验) 分析平均 $T_{1/2}$ 。可将糖变体分子的平均 $T_{1/2}$ 与合适对照分子的平均 $T_{1/2}$ 进行比较。

[0154] 根据前述方法进行的研究,以比较 TNFR2-h(1)Fc、Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 和 Q48N/A50S TNFR2-h(2)Fc 在大鼠中的药代动力学性质。本研究测定了皮下给予单一剂量的 5 mg/kg 后直至 28 天的蛋白质浓度 (n= 3 只大鼠 / 构建体)。

蛋白质构建体	$T_{1/2}$
TNFR2-h(1)Fc (标准化的值)	1.0
Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc	1.5
Q48N/A50S TNFR2-h(2)Fc	1.8

[0155] 与 TNFR2-h(1)Fc 相比,发现糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 和 Q48N/A50S TNFR2-h(2)Fc 的血清半寿期分别长 50% 和 80%。值得注意的是, Q48N/A50S TNFR2-h(2)Fc 的最大血清浓度 (C_{max}) 几乎为 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 的最大血清浓度的 5 倍 (20.8 μ g/ml 对比 4.4 μ g/ml, $p < 0.05$)。这些结果证实, TNFR2-Fc 糖变体的接头 / 边界区 (SEQ ID NO: 16 与 SEQ ID NO: 5 相比) 的修饰可赋予所述变体 (本实施例中为 Q48N/A50S TNFR2-h(2)Fc) 改善的药代动力学性质。因此, SEQ ID NO: 18 提供的接头 -hFc 序列与本文所公开的任何糖变体组合时可尤其有用。

[0156] 实施例 5 :药代动力学猴测定

可采用标准技术在食蟹猴 (*cynomolgus monkey*) 模型中测定糖变体分子的药代动力学性质。简而言之,选择 4 只雄性和 4 只雌性食蟹猴。所述动物在程序开始时在实验上为首次用于实验的,大约 2-6 岁,重量至少为 2.5 kg。在整个治疗过程中,根据标准程序给动物饲喂标准饮食,并圈养。通过皮下 (SC) 或静脉内 (IV) 给药将糖变体分子给予动物。在给药后的以下时间点于 22 天内,通过股静脉穿刺收集血样:5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、12 小时、24 小时、34 小时、48 小时、58 小时、72 小时、120 小时、168 小时、240 小时、336 小时、408 小时和 504 小时。亦收集给药前血样。采血后,冰上存放样品并通过离心分离血清。可使用任何适于靶蛋白的方法检测血清样品中糖变体分子的存在情况。例如,可使用用于人 Fc 部分的 ELISA 检测糖变体 Fc 融合蛋白。计算每只独立动物的血清消除半寿期 ($T_{1/2}$)。计算糖变体分子的平均 $T_{1/2}$ 和标准差。如果还未测定,则可进行类似研究来测定以相同剂量给予的合适对照分子 (例如不含引入的 N 联糖基化位点的 Fc 融合蛋白) 的平均 $T_{1/2}$ 和标准差。使用合适的统计检验 (例如斯氏 t 检验) 分析平均 $T_{1/2}$ 。可将糖变体分子的平均 $T_{1/2}$ 与合适对照分子的平均 $T_{1/2}$ 进行比较。

[0157] 实施例 6 :Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 在大鼠胶原诱导关节炎模型中的作用

评价了糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 在大鼠中对胶原诱导关节炎的功效。将 II 型牛胶原（弹性蛋白产品，目录号 CN276）溶于 0.01 M 醋酸和弗氏不完全佐剂（Difco，目录号 263910）至浓度为 1 mg/ml，并在研究的第 0 天和第 7 天，通过在尾基部皮内注射（2 mg/kg）将其给予雌性 Lewis 大鼠（150-200 g）。从第 6 天开始，用 3 mg/kg Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc、3 mg/kg TNFR2-h(1)Fc 或溶媒每周皮下给药三次来治疗大鼠。通过在整个研究过程的基线和多个时间点进行器官充满度测量法来确定脚爪体积，而在研究结束时通过显微计算机断层扫描术（显微 CT）来评价骨品质（离体）。

[0158] 脚爪肿胀被用作胶原诱导炎症的标志。如预期的，溶媒治疗大鼠的脚爪体积在研究中途增加并保持升高直至研究结束。该脚爪肿胀在用糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 治疗的大鼠中与用阳性对照 TNFR2-h(1)Fc 治疗的大鼠中一样有效地被抑制（图 11）。此外，与溶媒治疗对照相比，通过显微 CT 评价的骨品质在这两个治疗组中均类似地改善（图 12），得出另外的抗炎功效证据。这些数据证实，糖变体 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc 的体内抗炎功效与其未取代对应物 TNFR2-h(1)Fc 的体内抗炎功效相当。

[0159] 总之，前述结果表明，TNFR2-h(1)Fc 的某些糖变体（例如 Q48N/A50S TNFR2-h(1)Fc）具有与 TNFR2-h(1)Fc 本身相比增加的血清半寿期和未减小的抗炎功效。

[0160] 通过引用结合

本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体结合到本文中，就像每个独立出版物或专利具体而单独指明通过引用结合一样。

[0161] 虽然论述了主题的具体实施方案，但上述说明书是说明性的而非限制性的。当回顾本说明书和随附权利要求书时，许多变动对本领域技术人员而言将变得显而易见。应参照权利要求书及其等同内容的整个范围和说明书及这类变化来确定本发明的整个范围。

LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS
TVCDSCEDST YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTCRP
GWYCALSKE GCRLCAPLRK CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSMT
TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTRSMAPG AVHLPQPVST
RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC DKTHTCPPCP
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPV
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 5)

图 1

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDNTS
QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSR
SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
RPGTETS DVV CKPCAPGTFS NTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP
AEGSTGDEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)

图 2

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYNQTA
QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSR
SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
RPGTNTSDVV CKPCAPGTFS NTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP
AEGSTGDEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)

图 3

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYNQTA
 QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
 SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
 RPTGTTSDVV CKPCAPGTFS NTTSSDTCR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
 TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPPSP
AENSTGDEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 8)

图 4

ATGGCGCCC GTCGCCGTC TGGGCCGCG CTGGCCGTC GGA CTGGAG CTCTGGGCT
 GCGGCGCAC GCCTTGCCC GCCCAGGTG GCATTTACA CCCTACGCC CCGGAGCCC
 GGGAGCACA TGCCGGCTC AGAGAATAC TATGACCAG ACAGCTCAG ATGTGCTGC
 AGCAAATGC TCGCCGGGC CAACATGCA AAAGTCTTC TGTACCAAG ACCTCGGAC
 ACCGTGTGT GACTCCTGT GAGGACAGC ACATACACC CAGCTCTGG AACTGGGTT
 CCCGAGTGC TTGAGCTGT GGCTCCCGC TGTAGCTCT GACCAGGTG GAAACTCAA
 GCCTGCACT CGGGAACAG AACCGCATC TGCACCTGC AGGCCCGGC TGGTACTGC
 GCGCTGAGC AAGCAGGAG GGGTGCCGG CTGTGCGCG CCGCTGCGC AAGTGCCGC
 CCGGGCTTC GGCCTGGCC AGACCAGGA ACTGAAACA TCAGACGTG GTGTGCAAG
 CCCTGTGCC CCGGGGACG TTCTCCAAC ACGACTTCA TCCACGGAT ATTTGCAGG
 CCCACACAG ATCTGTAAC GTGGTGGCC ATCCCTGGG AATGCAAGC ATGGATGCA
 GTCTGCACG TCCACGTCC CCCACCCGG AGTATGGCC CCAGGGGCA GTACACTTA
 CCCAGCCA GTGTCCACA CGATCCCAA CACACGCAG CCAACTCCA GAACCCAGC
 ACTGCTCCA AGCACCTCC TTCCTGCTC CCAATGGGC CCCAGCCCC CCAGCTGAA
 GGGAGCACT GGCACGAG CCCAAATCT TGTGACAAA ACTCACACA TGCCCACCG
 TGCCCAGCA CCTGAACTC CTGGGGGGA CCGTCAGTC TTCCTCTTC CCCCCAAA
 CCCAAGGAC ACCCTCATG ATCTCCCGG ACCCCTGAG GTCACATGC GTGGTGGTG
 GACGTGAGC CACGAAGAC CCTGAGGTC AAGTTCAAC TGGTACGTG GACGGCGTG
 GAGGTGCAT AATGCCAAG ACAAAGCCG CGGGAGGAG CAGTACAAC AGCACGTAC
 CGTGTGGTC AGCGTCCTC ACCGTCTTG CACCAGGAC TGGCTGAAT GGCAAGGAG
 TACAAGTGC AAGGTCTCC AACAAAGCC CTCCCAGCC CCCATCGAG AAAACCATC
 TCCAAAGCC AAAGGGCAG CCCCAGAGAA CCACAGGTG TACACCCTG CCCCATCC
 CGGGAGGAG ATGACCAAG AACCAGGTC AGCCTGACC TGCCTGGTC AAAGGCTTC
 TATCCCAGC GACATCGCC GTGGAGTGG GAGAGCAAT GGGCAGCCG GAGAACAAC
 TACAAGACC ACGCCTCCC GTGCTGGAC TCCGACGGC TCCTTCTTC CTCTATAGC
 AAGCTCACC GTGGACAAG AGCAGGTGG CAGCAGGGG AACGTCTTC TCATGCTCC
 GTGATGCAT GAGGCTCTG CACAACCAC TACACGCAG AAGAGCCTC TCCCTGTCC
 CCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 9)

图 5



图 6

D1

MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA
 D2
 QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
 D3
 SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
 D4
 RPGTETSDVV CKPCAPGTFS NTTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
 D5 D6
 TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGSPSP
 D7
 AEGSTGD

D1 区

野生型 YYDQTAQM
 突变型 YYDNTSQM (Q48N/A50S)
 突变型 YYNQTAQM (D47N)

D2 区

野生型 GQHAKVF
 突变型 GQNATVF (H62N/K64T)

D3 区

野生型 REQNRIC
 突变型 RENNSIC (Q114N/R116S)

D4 区

野生型 GTETSDV
 突变型 GTNTSDV (E155N)

D5 区

野生型 CTSTSPTR
 突变型 CTNTSPTR (S202N)
 突变型 CTSNSSSTR (T203N/P205S)

D6 区

野生型 VSTRSQH
 突变型 VSNRSQH (T222N)

D7 区

野生型 AEGSTGD
 突变型 AENSTGD (G253N)

图 7

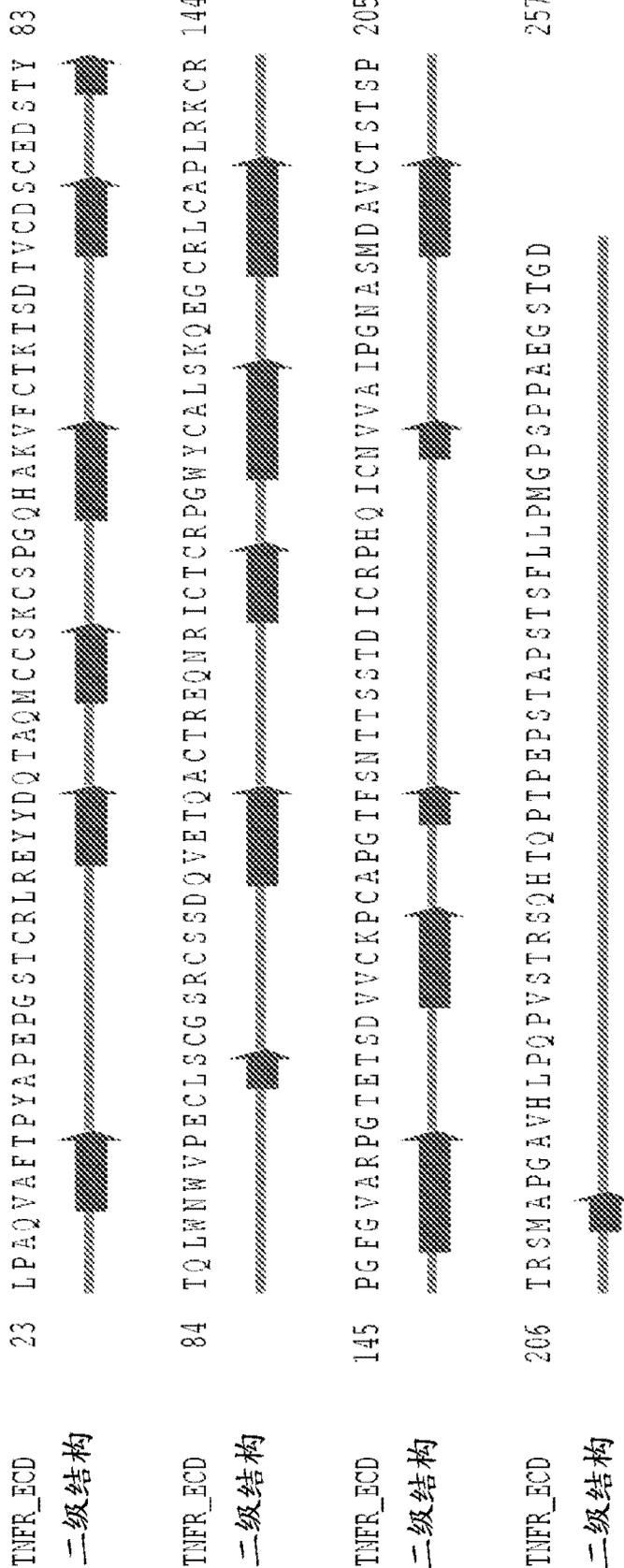


图 8

1 MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA
51 QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
101 SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RRCRPGFGVA
151 RRGTEETSDVV CKPCAPGTFS NTTSSDTCR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
201 TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP
251 AEGSTGDTGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
301 VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
351 DWLNKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
401 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGOPENNY KTTPLVLDSD GSFFLYSKLT
451 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 16)

图 9

1 ATGGCGCCCG TCGCCGTCTG GGCCGCGCTG GCCGTCGGAC TGGAGCTCTG GGCTGCGGCG
61 CACGCCTTGC CCGCCCAGGT GGCATTTACA CCCTACGCCC CGGAGCCCGG GAGCACATGC
121 CGGCTCAGAG AATACTATGA CCAGACAGCT CAGATGTGCT GCAGCAAATG CTCGCCGGGC
181 CAACATGCAA AAGTCTTCTG TACCAAGACC TCGGACACCG TGTGTGACTC CTGTGAGGAC
241 AGCACATACA CCCAGCTCTG GAACTGGGTT CCCGAGTGCT TGAGCTGTGG CTCCCCTGT
301 AGCTCTGACC AGGTGGAAAC TCAAGCCTGC ACTCGGGAAC AGAACC GCAT CTGCACCTGC
361 AGGCCCGGCT GGTACTGCGC GCTGAGCAAG CAGGAGGGGT GCCGGCTGTG CGCGCCGCTG
421 CGCAAGTGCC GCCCGGGCTT CGGCGTGGCC AGACCAGGAA CTGAAACATC AGACGTGGTG
481 TGCAAGCCCT GTGCCCGGG GACGTTCTCC AACACGACTT CATCCACGGA TATTTGCAGG
541 CCCCACCAGA TCTGTAACGT GGTGGCCATC CCTGGGAATG CAAGCATGGA TGCAGTCTGC
601 ACGTCCACGT CCCCCACCCG GAGTATGGCC CCAGGGGCAG TACTTACC CCAGCCAGTG
661 TCCACACGAT CCCAACACAC GCAGCCAACT CCAGAACCCA GCACTGCTCC AAGCACCTCC
721 TTCCTGCTCC CAATGGGCCC CAGCCCCCA GCTGAAGGGA GCACTGGCGA CACCGGTGGT
781 GGAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
841 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCTGA GGTCACATGC
901 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
961 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCCT
1021 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
1081 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCA AGCCAAAGGG
1141 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC
1201 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1261 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACTAC AAGACCACGC CTCCCCTGCT GGACTCCGAC
1321 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1381 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1441 TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A (SEQ ID NO: 17)

图 10

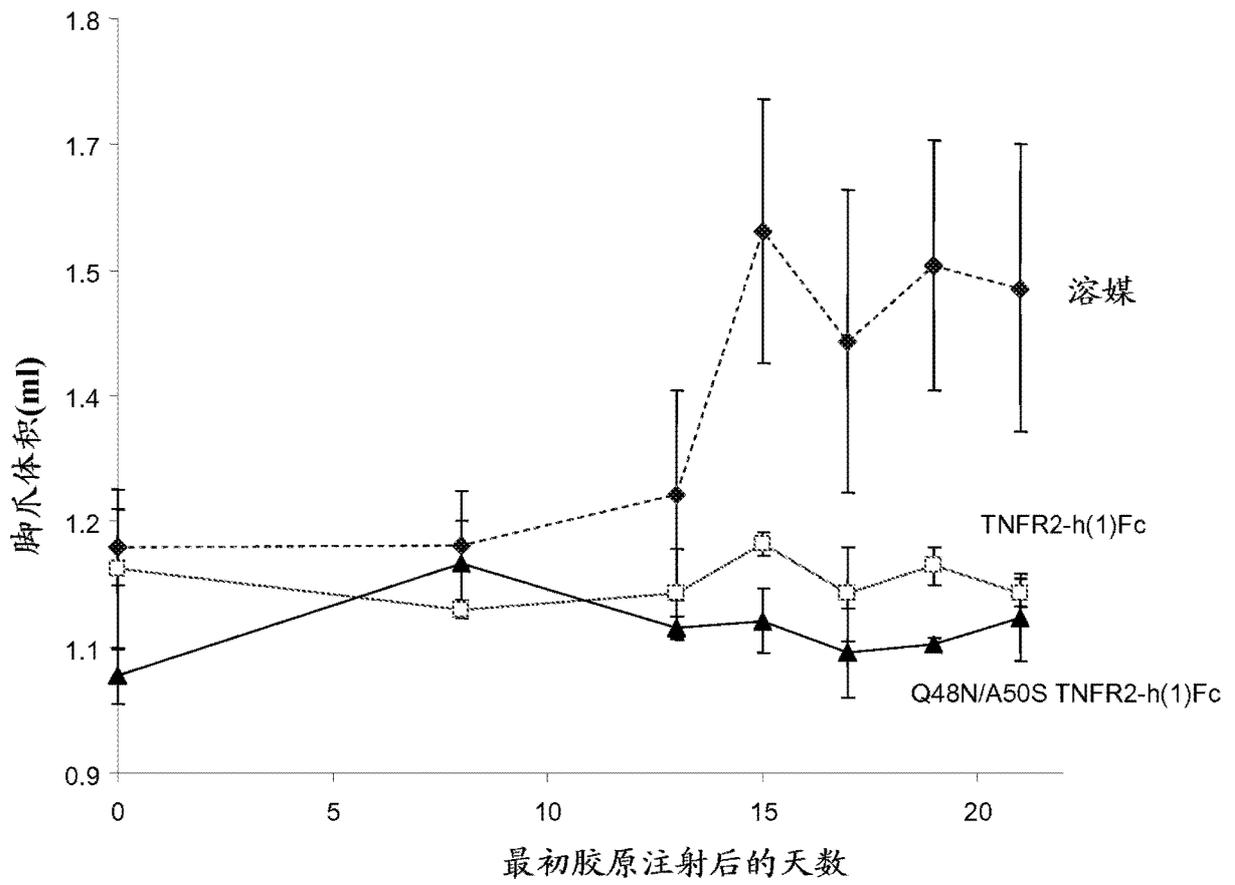


图 11

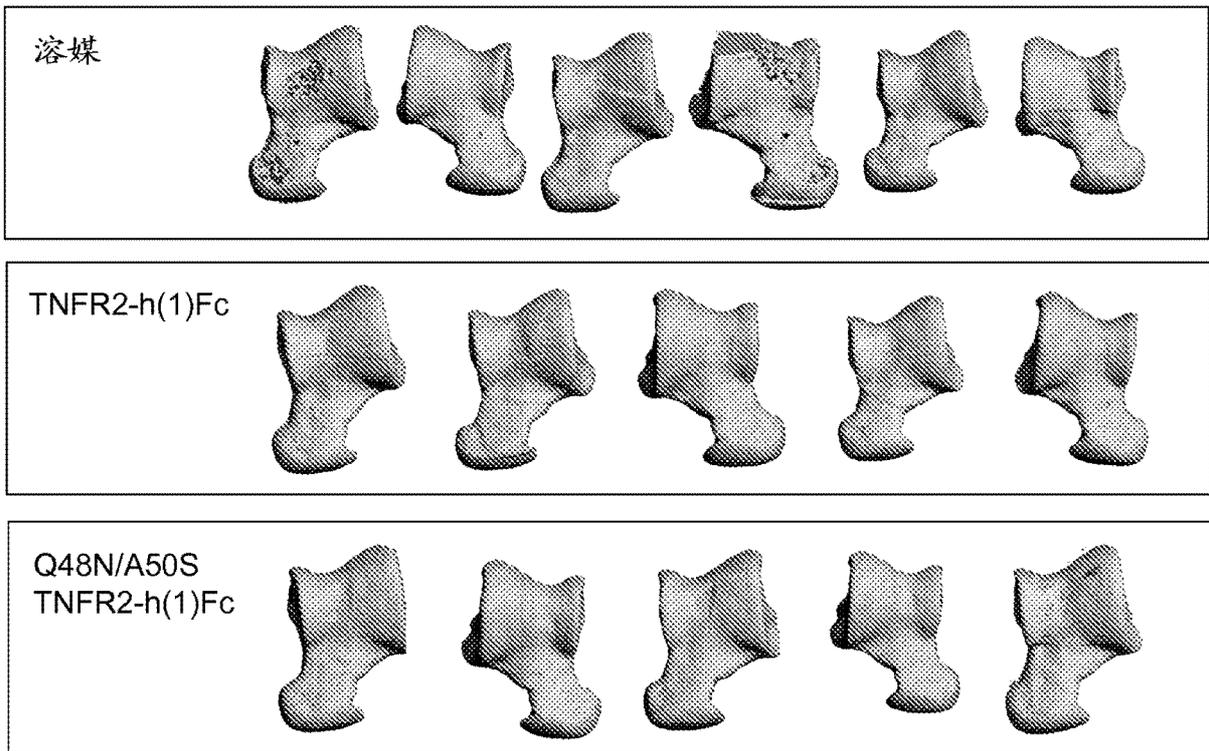


图 12