



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109415423 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780040158.3

(22)申请日 2017.10.11

(30)优先权数据

62/406,552 2016.10.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/056030 2017.10.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/071465 EN 2018.04.19

(71)申请人 威尔斯达眼科制剂公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 罗天赐 张俊

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 武肫 庞东成

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页

序列表10页 附图1页

(54)发明名称

短型视杆源性视锥活力因子与亲水性肽的融合蛋白

(57)摘要

本发明描述了包含第一N端信号肽序列、位于该信号肽序列C端的第二肽序列和位于第二肽序列C端的第三肽序列的融合蛋白,其中第二肽序列和第三肽序列中的一个为RdCVF-短肽序列,而另一个是亲水性肽序列。在翻译后,信号肽被切除,留下包含第二肽序列和第三肽序列而不带信号肽的融合蛋白。本发明还描述了编码所述融合蛋白的核酸和表达载体、包含所述核酸或表达载体的细胞,以及所述融合蛋白、核酸和表达载体的治疗方法和用途。所述融合蛋白可以通过在允许表达和分泌编码的融合蛋白的条件下培养本发明的细胞并从细胞培养物中分离出该融合蛋白来在体外制备。

1. 一种融合蛋白,其包含:(a) 第一N端信号肽序列、位于所述信号肽序列的C端的第二肽序列和位于所述第二肽序列的C端的第三肽序列;或(b) 第二肽序列和位于所述第二肽序列的C端的第三肽序列;

其中,所述第二肽序列和所述第三肽序列中的一个是RdCVF-短肽序列,而另一个是亲水性肽序列。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第二肽序列是RdCVF-短肽序列,且所述第三肽序列是亲水性肽序列。

3. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第二肽序列是亲水性肽序列,且所述第三肽序列是RdCVF-短肽序列。

4. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述信号肽序列是人信号肽序列。

5. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述信号肽序列选自Igk信号肽序列和白蛋白信号肽序列组成的组。

6. 如权利要求5所述的融合蛋白,其中,所述白蛋白信号肽序列是人白蛋白信号肽序列。

7. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述RdCVF-短肽序列是人RdCVF-短肽序列。

8. 如权利要求7所述的融合蛋白,其中,所述RdCVF-短肽序列选自RdCVF1-短肽序列和RdCVF2-短肽序列组成的组。

9. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述亲水性肽序列选自亲水性蛋白、亲水性蛋白结构域、亲水性寡肽和亲水性多肽组成的组。

10. 如权利要求9所述的融合蛋白,其中,所述亲水性肽序列是白蛋白。

11. 如权利要求10所述的融合蛋白,其中,所述白蛋白是人白蛋白。

12. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述亲水性肽序列对人不具有免疫原性。

13. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白的疏水性指数小于-0.20。

14. 如权利要求13所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白的疏水性指数小于-0.30。

15. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第一肽序列与所述第二肽序列通过单一肽键共价键合。

16. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,在所述第一肽序列与所述第二肽序列之间存在间隔序列。

17. 如权利要求16所述的融合蛋白,其中,所述第一肽序列与所述第二肽序列之间的所述间隔序列具有2至14个氨基酸。

18. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第二肽序列与所述第三肽序列通过单一肽键共价键合。

19. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,在所述第二肽序列与所述第三肽序列之间存在间隔序列。

20. 如权利要求19所述的融合蛋白,其中,所述第二肽序列与所述第三肽序列之间的所述间隔序列具有2至4个氨基酸。

21. 如权利要求1所述的融合蛋白,所述融合蛋白还包含位于所述第三肽序列的C端的多腺苷酸化信号。

22. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第一肽序列是人白蛋白信号序列,所述第

二肽序列是人白蛋白,且所述第三肽序列是RdCVF-短序列。

23.如权利要求22所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白具有序列SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:1的第25-717号氨基酸。

24.如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第一肽序列是Igk信号序列,所述第二肽序列是RdCVF-短序列,且所述第三肽序列是人白蛋白。

25.如权利要求24所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白具有序列SEQ ID NO:3,或SEQ ID NO:3的第22-732号氨基酸。

26.如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述信号肽序列、所述RdCVF-短肽序列和所述亲水性肽序列中的一个、两个或全部与相应的野生型序列不同。

27.如权利要求26所述的融合蛋白,其中,所述信号肽序列、所述RdCVF-短肽序列和所述亲水性肽序列中的一个、两个或全部与相应的野生型序列的差别在于一个或多个保守性氨基酸替换。

28.编码权利要求1至27中任一项所述的融合蛋白的核酸。

29.如权利要求28所述的核酸,其中,所述核酸是DNA。

30.如权利要求28所述的核酸,其中,所述信号肽序列、所述RdCVF-短肽序列和所述亲水性肽序列中的一个、两个或全部的编码序列与相应的野生型序列相比是重编码的。

31.如权利要求30所述的核酸,其中,所述RdCVF-短肽序列的编码序列是重编码的。

32.如权利要求29所述的核酸,其还包含一个或多个内含子。

33.如权利要求28所述的核酸,其编码具有序列SEQ ID NO:1的融合蛋白。

34.如权利要求33所述的核酸,其具有序列SEQ ID NO:2。

35.如权利要求28所述的核酸,其编码具有序列SEQ ID NO:3的融合蛋白。

36.如权利要求35所述的核酸,其具有序列SEQ ID NO:4。

37.一种表达载体,其包含可操作地连接至控制序列的权利要求28所述的核酸。

38.如权利要求37所述的表达载体,其中,所述控制序列是启动子。

39.如权利要求38所述的表达载体,其中,所述启动子是CMV启动子。

40.如权利要求37所述的表达载体,其中,所述载体是质粒。

41.如权利要求40所述的表达载体,其中,所述载体是AAV表达质粒。

42.如权利要求37所述的表达载体,其中,所述载体是病毒载体。

43.如权利要求42所述的表达载体,其中,所述病毒载体选自自由AAV载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体和合成病毒载体组成的组。

44.一种细胞,其包含权利要求1至27中任一项所述的核酸或权利要求37至43中任一项所述的表达载体。

45.一种药物组合物,其包含:(i)选自由权利要求1至27中任一项所述的融合蛋白、权利要求28至36中任一项所述的核酸、权利要求37至43中任一项所述的载体或权利要求44所述的细胞组成的组的成分;和(ii)药学上可接受的载剂。

46.一种治疗哺乳动物患者的病况的方法,

其中,所述病况选自自由以下组成的组:视网膜营养不良、斯塔加特病、色素性视网膜炎、干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)、地图状萎缩(干性AMD晚期)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、伴有或不伴有高眼压的青光眼、糖尿病性视网膜病变、Bardet-Biedel综合

征、Bassen-Kornzweig综合征、贝特病、脉络膜病、环状萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、Usher综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、前段疾病、晶状体疾病/白内障、视杯病症、葡萄膜炎、阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病；

所述方法包括向所述患者施用有效量的权利要求1至27中任一项所述的融合蛋白、权利要求28至36中任一项所述的核酸、权利要求37至43中任一项所述的载体、权利要求44所述的细胞或者权利要求45所述的药物组合物，由此治疗所述患者的所述病况。

47. 如权利要求46所述的方法，其中，所述病况是眼部病况，并且所述施用选自由视网膜下注射和玻璃体内注射组成的组。

48. 一种保护患者的眼部感光细胞的方法，其包括向所述患者的眼部施用有效量的权利要求1至27中任一项所述的融合蛋白、权利要求28至36中任一项所述的核酸、权利要求37至43中任一项所述的载体、权利要求44所述的细胞或者权利要求45所述的药物组合物，由此保护所述患者的眼部感光细胞。

49. 如权利要求48所述的方法，其中，所述施用选自由视网膜下注射和玻璃体内注射组成的组。

50. 如权利要求46至49中任一项所述的方法，其中，所述患者是人类患者。

51. 一种制备权利要求1至27中任一项所述的融合蛋白的方法，所述方法包括在允许表达和分泌所编码的所述融合蛋白的条件下培养权利要求44所述的细胞，并且从细胞培养物中分离出所述融合蛋白。

短型视杆源性视锥活力因子与亲水性肽的融合蛋白

[0001] 序列表的引用

[0002] 以附录C/ST.25文本文件的形式电子提交且文件参考号为WOC-019PCT的序列表是本公开的一部分。

背景技术

[0003] RdCVF是由视网膜中的视杆感光细胞特异性表达的硫氧还蛋白样蛋白(Léveillard等,(2004)Nature Genetics 36:755-759及补充信息)。在人类中有两种不同RdCVF,被称为RdCVF1和RdCVF2。两种RdCVF基因都经选择性剪接来编码两种产物:全长蛋白和C端转录后截短的蛋白,分别称为RdCVF-长(RdCVFL)和RdCVF-短(RdCVFS)。核氧还蛋白样-1基因(Nxn11)通过选择性剪接机制编码长型和短型RdCVF。Nxn11敲除导致小鼠中视杆和视锥的逐渐丧失,表明在基因水平上该基因对于感光细胞的存活以及维持正确的视网膜生理学和功能是至关重要的。

[0004] RdCVFS被描述为是促进视锥存活的分泌型营养因子,而RdCVFL是与细胞内蛋白相互作用的氧化还原活性酶(Léveillard等,(2010)Sci Transl Med.2(26):26ps16)。例如,tau被描述为RdCVF-L的结合伴侣,而tau仅位于细胞内(Fridlich等,(2009)Molecular & Cellular Proteomics 8(6):1206-18)。

[0005] 已发现,罹患某些视网膜营养不良的个体比未患视网膜营养不良的个体在眼中具有更低水平的RdCVF蛋白(PCT公开WO 02/081513)。

[0006] 已证明不同形式的RdCVF蛋白能促进体外和体内的视锥感光细胞存活。例如,在遗传性视网膜退化的动物模型中,眼内注射短型人RdCVF1(RdCVF1S)蛋白不仅挽救了视锥细胞免于退化,而且还维持了其功能(Yang等,(2009)Mol Therapy17:787-795)。然而,表现出该蛋白的体内视锥细胞保护效果需要多次眼内注射。

[0007] 色素性视网膜炎(RP)是以进行性视杆退化和随后的继发性视锥丧失为特征的视网膜退行性眼病。RP是遗传性失明的主要成因,仅在美国就影响着约10万患者和每年2000例新病例。RP影响所有族裔。全世界有超过150万人受RP影响。对于患者而言不幸的是,对RP没有有效疗法或经批准的疗法。因此,RP仍是迫切而未达成的医学需求。

[0008] 由于RP是临床进程为数年至数十年的慢性视网膜退行性疾病,通过在视网膜中成型地表达RdCVF,基因疗法对于RP适应证可以是理想的。对于急性紧急适应证(例如视网膜脱落),蛋白疗法可以是有益的。即,在视网膜可以重新连接至眼的背部(即,视网膜色素上皮和脉络膜层)之前,使用重组RdCVF蛋白来保护感光细胞免于死亡。不幸的是,本领域的科学家在有效表达和分泌RdCVF蛋白、尤其是短型RdCVF时遇到了相当的困难。参见例如美国专利公开第20110034546号第[0004]段。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种融合蛋白,其包含:第一N端信号肽序列、位于所述信号肽序列的C端的第二肽序列和位于所述第二肽序列的C端的第三肽序列;其中,所述第二肽序列和

所述第三肽序列中的一个RdCVF-短肽序列,而另一个是亲水性肽序列。翻译后,信号肽在内质网中被切下,留下包含第二肽序列和第三肽序列而缺少信号肽的融合蛋白。因此,本发明还提供了一种融合蛋白,其包含第二肽序列和位于所述第二肽序列C端的第三肽序列;其中,所述第二肽序列和所述第三肽序列中的一个RdCVF-短肽序列,而另一个是亲水性肽序列。本发明还提供了编码所述融合蛋白的核酸和表达载体、包含所述核酸或表达载体的细胞以及所述融合蛋白、核酸和表达载体的治疗方法和用途。本发明还提供了一种制备融合蛋白的方法,该方法包括在允许表达和分泌所编码的融合蛋白的条件下培养本发明的细胞并从细胞培养物中分离出所述融合蛋白。

附图说明

[0010] 图1A显示了人短型视杆源性视锥活力因子的氨基酸序列。人短RdCVF的氨基酸组成是高度疏水性的。短RdCVF中38.5%的氨基酸为疏水性的。下划线的氨基酸为疏水性氨基酸。

[0011] 图1B显示了人长型视杆源性视锥活力因子的氨基酸序列。长RdCVF的C端的25%的氨基酸为疏水性的(下划线的氨基酸为长型RdCVF的C端的疏水性氨基酸)。

[0012] 图2.短RdCVF与亲水性结构域的融合蛋白。

[0013] 图2显示了两种人短RdCVF融合蛋白的示意图。人短RdCVF在其N端或C端与亲水性结构域融合。融合蛋白具有信号肽以促进从细胞中分泌。

[0014] 图3.人白蛋白与人短RdCVF的新型融合蛋白的表达和分泌。

[0015] 图3显示了对人短RdCVF和人白蛋白融合蛋白的Western印迹分析。

[0016] 泳道1:来自用AAV-GFP(作为对照的编码GFP的AAV载体)转导的人293细胞的30μL细胞培养基;

[0017] 泳道2:来自用AAV-ALB-RdCVFS(编码在短RdCVF的N端与人白蛋白融合的短型人RdCVF的AAV载体)转导的人293细胞的30μL细胞培养基;

[0018] 泳道3:来自用AAV-RdCVFS-ALB(编码在短RdCVF的C端与人白蛋白融合的短型人RdCVF的AAV载体)转导的人293细胞的30μL细胞培养基。

[0019] 左侧的数字指示以kDa计的分子量标志物。

[0020] 序列表说明

[0021] SEQ ID NO:1.人白蛋白与短RdCVF的融合蛋白(ALB-RdCVFS)的氨基酸序列,其中人白蛋白位于融合蛋白的N端。

[0022] SEQ ID NO:2.编码在N端与人白蛋白融合的人短RdCVF(ALB-RdCVFS)的核苷酸序列。

[0023] SEQ ID NO:3.人白蛋白与短RdCVF的融合蛋白(RdCVFS-ALB)的氨基酸序列,其中人白蛋白位于融合蛋白的C端。在RdCVFS和人白蛋白之间存在4个氨基酸的间隔序列。自N端起的前21个氨基酸是来自小鼠Igk的信号序列。在信号序列和RdCVFS之间存在14个氨基酸的间隔序列(连接序列)。

[0024] SEQ ID NO:4.编码在C端与人白蛋白融合的人短RdCVF(RdCVFS-ALB)的核苷酸序列。

[0025] SEQ ID NO:5.人短型视杆源性视锥活力因子的氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO:6.人长型视杆源性视锥活力因子的氨基酸序列。

具体实施方式

[0027] 不希望受理论束缚,表达和分泌短型RdCVF的困难可能潜在地归因于其高度疏水性的氨基酸组成。仔细分析短型和长型人RdCVF蛋白的氨基酸组成发现,短型RdCVF蛋白极度疏水(图1A和1B)。在短RdCVF中,109个氨基酸中的42个(38.5%)是疏水性氨基酸。存在一段6个疏水性氨基酸的片段、一段4个疏水性氨基酸的片段、以及两段各有3个疏水性氨基酸的片段。非常可能的是,高百分比的疏水性氨基酸组成使得短RdCVF极难在体外和体内被哺乳动物细胞高效地表达和分泌,因为其更可能通过疏水-疏水相互作用粘附于脂质膜。有趣的是,虽然长型RdCVF的N端的109个氨基酸与整个短RdCVF相同,但长RdCVF的C端的103个氨基酸不是疏水性的,仅有25%的氨基酸为疏水性的(26/103)。长RdCVF的该C端中的最长的疏水性氨基酸片段仅为4个氨基酸长。不存在3疏水氨基酸片段。长RdCVF的C端中的相对亲水性可能在减少长RdCVF的总体疏水性方面起着重要作用。

[0028] 在本发明的融合蛋白的一个实施方式中,第二肽序列是RdCVF-短肽序列而第三肽序列是亲水性肽序列。在另一个实施方式中,第二肽序列是亲水性肽序列而第三肽序列是RdCVF-短肽序列。

[0029] 应当存在N端信号肽序列,其会促进融合蛋白从表达该融合蛋白的细胞中分泌出。可以利用任何使蛋白能够从哺乳动物细胞中分泌出的信号肽。在其他实施方式中,信号肽序列选自Igk信号肽序列和白蛋白信号肽序列组成的组。在更具体的实施方式中,IgK信号肽序列是小鼠IgK信号肽序列,而白蛋白信号肽序列是人白蛋白信号肽序列。

[0030] 在本发明的优选实施方式中,RdCVF-短肽序列是人RdCVF-短肽序列。合适的RdCVF-短肽序列的实例包括RdCVF1-短肽序列、RdCVF2-短肽序列和不同于相应野生型序列的RdCVF-短肽序列(例如区别在于一个或多个保守性氨基酸替换)。

[0031] 根据本发明,可以利用任何亲水性肽序列,只要其与不具有该亲水性肽序列的RdCVF-短肽序列相比会降低融合蛋白的疏水性指数即可。在本发明的一个实施方式中,包括任何信号肽序列(如果存在)的融合蛋白的疏水性指数小于-0.20,更优选小于-0.30。

[0032] 优选地,亲水性肽序列在人中无免疫原性,不会对人视网膜生理学或正常的视网膜功能带来任何其它负面效果,并且不会影响短RdCVF的生物学功能。亲水性肽序列可以是亲水性蛋白、亲水性蛋白结构域、亲水性寡肽或亲水性多肽。多于一个亲水性结构域可以是短RdCVF的亲水性融合伴侣的候选物。在本发明的一个实施方式中,亲水性肽序列是白蛋白,例如人白蛋白。

[0033] 根据本发明的融合蛋白,在第一肽序列和第二肽序列之间和/或在第二肽序列和第三肽序列之间,可以可选地存在一个或多个氨基酸的间隔序列。在本发明的一个实施方式中,在第一肽序列和第二肽序列之间不存在间隔序列,换言之,第一肽序列通过单一肽键与第二肽序列共价键合。在另一个实施方式中,在第一肽序列和第二肽序列之间存在间隔序列。在本发明的另一实施方式中,在第二肽序列和第三肽序列之间不存在间隔序列,换言之,第二肽序列通过单一肽键与第三肽序列共价键合。在另一个实施方式中,在第二肽序列和第三肽序列之间存在间隔序列。原则上对间隔序列的大小没有限制。在本发明的一个实施方式中,第一和第二肽序列之间的间隔序列具有2至14个氨基酸。在另一个实施方式中,

第二和第三肽序列之间的间隔序列具有2至14个氨基酸,更具体而言具有2至4个氨基酸。

[0034] 本发明的融合蛋白编码序列的一个实施方式进一步包含位于第三肽序列编码序列C端的多腺苷酸化信号。多腺苷酸化信号(聚A)可以是任何聚A。

[0035] 在本发明的融合蛋白的一个实施方式中,第一肽序列是人白蛋白信号序列,第二肽序列是人白蛋白,第三肽序列是RdCVF-短序列。在更具体的实施方式中,融合蛋白具有序列SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:1的第25-717号氨基酸。在本发明的融合蛋白的另一实施方式中,第一肽序列是Igk信号序列,第二肽序列是RdCVF-短序列,第三肽序列是人白蛋白。在更具体的实施方式中,融合蛋白具有序列SEQ ID NO:3,或SEQ ID NO:3的第22-732号氨基酸。

[0036] 在本发明的融合蛋白的实施方式中,信号肽序列、RdCVF-短肽序列和亲水性肽序列中的一个、两个或全部与相应的野生型序列有区别。在更具体的实施方式中,该区别包括一个或多个保守性氨基酸替换。在更具体的实施方式中,氨基酸替换是有限的一个或多个保守性氨基酸替换。

[0037] 本发明的融合蛋白可以糖基化或未糖基化。一般而言,糖基化有益于蛋白的稳定性和溶解性。在一个实施方式中,在用本发明的表达载体转导的细胞中所表达的融合蛋白发生糖基化,且在从细胞分泌出之后被糖基化。

[0038] 在一个实施方式中,本发明的核酸是DNA。在另一个实施方式中,信号肽序列、RdCVF-短肽序列和亲水性肽序列中的一个、两个或全部的编码序列与相应的野生型序列相比是重编码的。在更具体的实施方式中,RdCVF-短肽序列的编码序列是重编码的。本发明的核酸可以可选地包含一个或多个内含子,其处在第一和第二肽序列之间、第二和第三肽序列之间、或其他位置。在本发明的一个实施方式中,核酸编码具有序列SEQ ID NO:1的融合蛋白,例如为具有序列SEQ ID NO:2的核酸。在另一个实施方式中,核酸编码具有序列SEQ ID NO:3的融合蛋白,例如为具有序列SEQ ID NO:4的核酸。鉴于遗传密码的简并性,可以容易地想到其它核酸序列。

[0039] 本发明的一个实施方式是一种表达载体,其包含可操作地连接至控制序列(例如启动子)的上述核酸。驱动RdCVFS融合蛋白的启动子可以是任何启动子且不限于CMV启动子。当在启动子和融合蛋白编码序列之间存在内含子时,可以使用任何合适的常规内含子。例如, β -珠蛋白内含子是合适的。

[0040] 在实验中,通过融合人短RdCVF和亲水性结构域而创建了两融合蛋白(参见图2的示意)。一种为人短RdCVF在N端与人白蛋白融合,且白蛋白信号肽位于融合蛋白的N端(SEQ ID NO:1)。表达和分泌该融合蛋白的表达构建体在AAV载体的基础上设计,称为rAAV-ALB-RdCVFS。该载体编码经密码子优化(重编码)的在N端与人白蛋白融合的人短RdCVF(SEQ ID NO:2)。将该融合蛋白命名为ALB-RdCVFS。在融合蛋白编码序列的上游,将人白蛋白信号肽的编码序列并入该融合蛋白表达构建体中。该表达构建体进一步含有连接至融合蛋白编码序列的CMV启动子和内含子。该表达构建体进一步含有位于融合蛋白编码序列C端的多腺苷酸化信号。将整个表达盒克隆至AAV表达质粒内,对该质粒进行DNA测序以确认表达构建体的完整性。

[0041] 另一种示例性融合蛋白是人短RdCVF在C端与人白蛋白融合,且在融合蛋白的N端具有小鼠Igk信号肽(SEQ ID NO:3)。表达和分泌该融合蛋白的表达构建体在AAV载体的基

础上设,称为rAAV-RdCVFS-ALB。该载体编码经密码子优化(重编码)的在C端与人白蛋白融合的人短RdCVF (SED ID NO:4)。将该融合蛋白命名为RdCVFS-ALB。在融合蛋白编码序列的上游,还将经修改的小鼠Igk信号肽的编码序列并入融合蛋白表达构建体中。该表达构建体进一步含有连接至融合蛋白编码序列的CMV启动子和内含子。该表达构建体进一步含有位于融合蛋白编码序列C端的多腺苷酸化信号。将整个表达盒克隆至AAV表达质粒内,对该质粒进行DNA测序以确认表达构建体的完整性。

[0042] 存在共20种天然存在的氨基酸。其中一些为疏水性的,一些为亲水性的。氨基酸的疏水性指数是代表其侧链的疏水或亲水性质的数字。该数字越大,氨基酸越疏水(表1)。最疏水的氨基酸是异亮氨酸(4.5)和缬氨酸(4.2)。最亲水的氨基酸是精氨酸(-4.5)和赖氨酸(-3.9)。虽然蛋白的疏水或亲水性取决于其由什么氨基酸构成以及二级、三级和四级结构,但蛋白的疏水性指数对于蛋白的疏水性可以具有预测价值。

[0043] 表1.氨基酸的疏水性值

[0044] Ala:1.800

[0045] Arg:-4.500

[0046] Asn:-3.500

[0047] Asp:-3.500

[0048] Cys:2.500

[0049] Gln:-3.500

[0050] Glu:-3.500

[0051] Gly:-0.400

[0052] His:-3.200

[0053] Ile:4.500

[0054] Leu:3.800

[0055] Lys:-3.900

[0056] Met:1.900

[0057] Phe:2.800

[0058] Pro:-1.600

[0059] Ser:-0.800

[0060] Thr:-0.700

[0061] Trp:-0.900

[0062] Tyr:-1.300

[0063] Val:4.200

[0064] 使用公众可获得的GPMW程序来计算短RdCVF以及两种短RdCVF白蛋白融合蛋白的疏水性指数。天然短型人RdCVF (RdCVFS) 的疏水性指数为-0.12。在将人白蛋白融合至RdCVFS的N端后,所得到的融合蛋白ALB-RdCVFS的疏水性指数从-0.12降至-0.32(包括信号肽),疏水性指数下降266.7%。在将人白蛋白融合至RdCVFS的C端后,所得到的融合蛋白RdCVFS-ALB的疏水性指数从-0.12降至-0.33(包括信号肽),疏水性指数下降275%。疏水性指数的极大下降可能有助于该融合蛋白的高效表达和分泌。

[0065] 此外,已将融合蛋白编码序列克隆至AAV-2表达构建体内,本文包括的数据明确表

明该新型融合蛋白被高效表达,如采用RdCVF特异性抗体进行的Western印迹所检测到的(图3)。短RdCVF的融合伴侣不限于人白蛋白。可以使用任何亲水性蛋白或亲水性蛋白结构域或亲水性肽来产生带有短RdCVF的融合蛋白,以降低该蛋白的疏水性。优选的亲水性结构域对人无免疫原性。

[0066] 蛋白可以由基因疗法载体(例如AAV(腺相关病毒)载体、慢病毒载体、合成载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、裸DNA、纳米颗粒等)来编码和递送。作为另选,融合蛋白可以作为重组蛋白递送至视网膜。亲水性融合结构域不应当对人视网膜生理学或正常视网膜功能带来任何负面效果,并且不应当影响短RdCVF的生物学功能。有可能的是,多于一个亲水性结构域可以作为短RdCVF的亲水性融合伴侣的候选物。在实例中,人白蛋白用作亲水性结构域,充当人短RdCVF的融合伴侣。

[0067] 本发明提供了一种药物组合物,其包含:(i)选自由本发明的融合蛋白、核酸、表达载体或细胞组成的组的成分;和(ii)药学上可接受的载剂。

[0068] 本发明提供了一种治疗哺乳动物患者的易响应于该治疗的病况的方法,所述治疗包括向所述患者施用有效量的本文所述的蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物,由此治疗所述患者的病况。在本发明的实施方式中,所述病况选自由以下组成的组:视网膜营养不良、斯塔加特病、色素性视网膜炎、干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)、地图状萎缩(干性AMD晚期)、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、伴有或不伴有高眼压的青光眼、糖尿病性视网膜病变、Bardet-Biedel综合征、Bassen-Kornzweig综合征、贝特斯病、脉络膜病(choroidema)、环状萎缩、先天性黑朦、雷夫叙姆综合征、Usher综合征、甲状腺相关眼病、格雷夫斯氏病、与视网膜色素上皮细胞相关的疾病、前段疾病、晶状体疾病/白内障、视杯(eye cup)病症、葡萄膜炎、阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病和嗅觉疾病。可以利用任何常规施用途径,例如注射至眼、静脉内注射或其它全身性施用。在本发明的方法的一个实施方式中,所述病况为眼部病况,且所述施用选自视网膜下注射和玻璃体内注射。在更具体的实施方式中,患者为人类患者。

[0069] 本发明提供了一种保护患者的眼部感光细胞的方法,其包括向患者的眼部施用有效量的本文所述的蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物,由此保护所述患者的眼部感光细胞。在更具体的实施方式中,所述施用选自视网膜下注射和玻璃体内注射。在更具体的实施方式中,患者为人类患者。

[0070] 现参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅出于说明性目的,且本发明不应在任何意义上被认为受限于这些实施例,而应认为涵盖了因本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变化形式。

[0071] 然而,出于说明的目的已在本文中描述了本发明的特定实施方式,本领域技术人员应该理解,在不背离所附权利要求所述的本发明的情况下可以进行细节上的多种变化。

[0072] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在此通过援引以其整体并入说明书,其程度等同于每一个单独的出版物、专利和专利申请被具体且单独地指明通过援引并入本文。此外,还通过援引并入了与任何前述出版物、专利和专利申请一同公开的任何补充信息。例如,某些期刊文章在公开时还带有通常可在线获取的补充信息。

[0073] 实施例

[0074] 实施例1:产生编码人短型视杆源性视锥活力因子和白蛋白融合蛋白的rAAV载体

[0075] 质粒克隆

[0076] 由 GENEART® (一家付费服务公司) 合成了经密码子优化的在其N端与人白蛋白融合的人短型RdCVF蛋白的cDNA,并将该cDNA克隆至腺相关病毒载体质粒pAAV-MCS (Cell Biolabs, San Diego, CA) 中,从而创建了质粒pAAV-ALB-RdCVFS。还将来自人白蛋白的信号肽并入了RdCVF和白蛋白融合蛋白编码序列的上游。

[0077] 该pAAV-ALB-RdCVFS质粒在AAV-ITR之间含有以下特征:

[0078] CMV启动子— β -珠蛋白内含子—信号序列—白蛋白—短RdCVF—聚A

[0079] 所产生的该RdCVF和白蛋白融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0080] 由 GENEART® (一家付费服务公司) 合成了经密码子优化的在其C端与人白蛋白融合的人短型RdCVF蛋白的cDNA,并将该cDNA克隆至腺相关病毒载体质粒pAAV-MCS (Cell Biolabs, San Diego, CA) 中,从而创建了质粒pAAV-RdCVFS-ALB。还将来自小鼠Igk的信号肽并入了RdCVF和白蛋白融合蛋白编码序列的上游。

[0081] 该pAAV-RdCVFS-ALB质粒在AAV-ITR之间含有以下特征:

[0082] CMV启动子— β -珠蛋白内含子—信号序列—短RdCVF—白蛋白—聚A

[0083] 所产生的该RdCVF和白蛋白融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0084] 重组AAV-ALB-RdCVFS和AAV-RdCVFS-ALB载体的产生和纯化

[0085] 将质粒pAAV-ALB-RdCVFS或pAAV-RdCVFS-ALB、pHELPER (Cell BioLabs, 目录号340202) 和pRC2 (Cell BioLabs, 目录号340201) 转化至DH10B感受态细菌细胞 (Invitrogen, 目录号18297-010) 中,并利用Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit或EndoFree Plasmid Mega Kit根据制造商的说明书进行扩增。质粒浓度利用Beckman DU-600分光光度计确定。通过限制性消化和DNA测序分析来验证每个质粒的身份。

[0086] 为了产生rAAV-ALB-RdCVFS或rAAV-RdCVFS-ALB载体,将293AAV细胞 (Cell BioLabs, 目录号AAV-100) 按400万个细胞/15cm培养皿接种到cDMEM (DMEM, 补充有10%FBS、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸和1%青霉素/链霉素) 中。次日,用25mL新鲜cDMEM替换培养基。2小时后进行转染。将水 (57.4mL) 与1.3mg pHELPER、650 μ g pRC2、650 μ g pAAV-ALB-RdCVFS或pAAV-RdCVFS-ALB以及8.1mL 2M CaCl_2 混合 (水/质粒/ CaCl_2 混合物)。向5个50mL锥形管的每一个中转移12.5mL体积的2xHBS (Lonza, Sku:RR07005)。在进行涡旋的同时,将12.5mL水/质粒/ CaCl_2 混合物缓慢添加至含有2xHBS的每个锥形管中。温育5分钟后,将2.5mL该悬浮液添加至含293AAV细胞的每个细胞培养皿中。

[0087] 次日,每个培养皿用25mL新的cDMEM培养基更换培养基。两天后,使用细胞提升器收集细胞并将细胞/培养基混合物转移至250mL锥形管中。将样品于4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000rpm下离心15分钟,弃去上清液并将细胞沉淀块重悬于110mL DMEM中。将重悬的细胞样品等分 (30mL) 分配至50mL锥形管中,并利用乙醇/干冰浴和37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴进行冷冻/融化/冷冻步骤。将管储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 直至对材料的进一步处理。采取相同的过程来产生rAAV-GFP对照载体,其中将质粒pAAV-ALB-RdCVFS替换为质粒pAAV-GFP (Cell BioLabs, 目录号AAV-400)。

[0088] 为了纯化rAAV-ALB-RdCVFS载体,将4个含有来自冷冻/融化/冷冻步骤的载体的50mL锥形管在水浴中于37 $^{\circ}\text{C}$ 融化。向每个管中加入40微升 BENZONASE® (核酸酶) (Sigma, 目录号E8263-25kU),然后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。将这些管在3000rpm下离心10分钟,并将上清液转移至500mL瓶内。添加6毫升10%的脱氧胆酸钠溶液 (8.2g在82mL水中)。将

样品短暂混合并在37℃下温育30分钟。使用5μm过滤器将悬浮液过滤。随后,使用0.8μm过滤器进行另一个过滤步骤。准备肝素琼脂糖柱(8mL)(Sigma,目录号H6508-25mL),并用48mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Invitrogen,目录号10010-049)平衡该柱。将经过滤的细胞裂解液加载至柱上,并用40mL洗涤缓冲液(20mL 5M NaCl,980mL PBS)洗涤柱。使用15mL洗脱缓冲液(80mL 5M NaCl,920mL PBS)将载体洗脱出并收集在新的50mL锥形管中。

[0089] 通过离心过滤来浓缩载体。将AMICON ULTRA-15离心过滤单元(Millipore,目录号UFC910024)用PBS清洗一次,并将洗脱得到的样品添加至该装置。在Beckman Allegro 6KR离心机中于2200rpm、22℃进行离心,直到样品浓缩至1-2mL体积。添加15mL体积的PBS并重复进行离心,直到样品体积为≤1mL。收集经纯化的载体,并用100μL PBS清洗过滤器壁。将样品混合,并将30μL载体等分试样在-80℃下储存在600μL锥形管中待用。

[0090] 重复该过程以纯化rAAV-RdCVFS-ALB和rAAV-GFP载体。

[0091] 实施例2:rAAV载体介导的人短RdCVF和人白蛋白融合蛋白的表达和分泌

[0092] 使用标准技术,使用采用4%-20%SDS-PAGE凝胶的Western印迹分析来检测RdCVF和白蛋白融合蛋白的表达。作为对照,将5μL体积的MAGICMARK™XP Western蛋白标准物(Invitrogen,目录号LC5602)添加至外围的孔中。每孔中添加30μL细胞培养基,该细胞培养基来自与蛋白样品缓冲液混合的经每种rAAV载体转导的人293细胞。在200V下跑胶,直到染料到达凝胶底部。采用Vector Laboratories的VECTASTAIN® ABC-Amp Western印迹分析试剂盒,根据修改版本的制造商说明书来进行Western印迹分析。使SDS-PAGE在转移缓冲液中平衡20分钟,并使用Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell在20V下运行40分钟以将通过SDS-PAGE分离的蛋白转移至硝化纤维素膜上。一旦转移完成,在摇臂平台上的轻柔摇晃下,在200mL 1x酪蛋白溶液中将膜在室温(RT)下封闭至少2小时或在4℃下封闭过夜。将膜与含1:2000稀释的兔抗RdCVF蛋白特异性抗体(一抗,由Covance(Denver,PA)生产)的50mL 1x酪蛋白溶液一起在轻柔摇晃下在4℃下温育过夜或在室温下温育1小时。于RT下在轻柔摇晃下用30mL 1x酪蛋白溶液洗涤膜4次,每次5分钟。于RT下在轻柔摇晃下将膜与30mL的以1:10000稀释在1x酪蛋白溶液中的生物素化山羊抗兔IgG(二抗)温育1小时。于RT下在轻柔摇晃下用30mL 1x酪蛋白溶液洗涤膜3次,每次5分钟。将膜在含100μL试剂A和100μL试剂B的50mL 1x酪蛋白中的Vectastain ABC-Amp中温育45分钟。于RT下在轻柔摇晃下用30mL 1x酪蛋白溶液洗涤膜3次,每次5分钟。

[0093] 将膜在Tris,pH 9.5中温育。使用6mL DUOLOX底物(Vector Laboratories,目录号SK 6605)采集化学发光信号,并将膜在胶片盒中的KODAK BIOMAX MS X射线胶片(Kodak Carestream Health,目录号8572786)上曝光10秒至5分钟,随后用KODAK显影剂溶液(Kodak GBX,目录号1900984)和KODAK定影剂溶液使胶片显影。

[0094] 如图3所示,来自用rAAV-ALB-RdCVFS和rAAV-RdCVFS-ALB转导的人293细胞的细胞培养基均含有与兔抗RdCVF抗体特异性反应的分子量约为80KDa的条带。该条带在来自用rAAV-GFP对照载体转导的细胞的细胞培养基中未检出。该数据表明rAAV-ALB-RdCVFS和rAAV-RdCVFS-ALB载体介导了人短RdCVF与白蛋白的融合蛋白在人细胞中的表达和分泌。

[0095] rAAV-ALB-RdCVFS或rAAV-RdCVFS-ALB载体可以用于眼内施用以治疗上文所列的疾病。具体地,载体可以经视网膜下注射或晶状体内注射来递送。

[0096] 小结

[0097] 编码经密码子优化(重编码)的人短RdCVF及在其N端融合的人白蛋白融合蛋白编码序列的重组AAV载体能够介导该融合蛋白在人细胞中的表达和从人细胞中的分泌。编码经密码子优化的人短RdCVF及在其C端融合的人白蛋白融合蛋白的重组AAV载体能够介导该融合蛋白在人细胞中的表达和从人细胞中的分泌。

序列表

<110> 威尔斯达眼科制剂公司

<120> 短型视杆源性视锥活力因子与亲水性肽的融合蛋白

<130> WOC-019PCT

<150> US 62/406,552

<151> 2016-10-11

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 717

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1) .. (24)

<223> 来自人白蛋白的信号序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (609)

<223> 人白蛋白 (含N端信号肽)

<220>

<221> misc_feature

<222> (25) .. (609)

<223> 人白蛋白 (含N端信号肽)

<220>

<221> misc_feature

<222> (610) .. (717)

<223> RdCVFS

<400> 1

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala

20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp

65	70	75	80
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp			
	85	90	95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala			
	100	105	110
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln			
	115	120	125
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val			
	130	135	140
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys			
145	150	155	160
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro			
	165	170	175
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys			
	180	185	190
Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu			
	195	200	205
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys			
	210	215	220
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val			
225	230	235	240
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser			
	245	250	255
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly			
	260	265	270
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile			
	275	280	285
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu			
	290	295	300
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp			
305	310	315	320
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser			
	325	330	335
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly			
	340	345	350
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val			
	355	360	365
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys			
	370	375	380

Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385						390				395					400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
				405					410					415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
			420					425					430		
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
		435					440					445			
Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
	450					455					460				
Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
465					470					475					480
Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
				485					490					495	
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
			500					505					510		
Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
		515					520					525			
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu
	530					535					540				
Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys
545					550					555					560
Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala
				565					570				575		
Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe
		580						585				590			
Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly
	595					600						605			
Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly	Arg	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn	Asn	Ser	Asp
	610					615					620				
Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn
625					630					635				640	
Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Pro	Gln	Cys	Gln
				645					650				655		
Ala	Phe	Val	Pro	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Phe	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu
		660						665				670			
Phe	Tyr	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Ala	Leu	Val	Tyr	Val	Ser	Gln
	675						680					685			
Asp	Ser	Thr	Glu	Glu	Gln	Gln	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Met	Pro	Lys

690	695	700
Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg		
705	710	715
<210> 2		
<211> 2154		
<212> DNA		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 2		
atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt 60		
gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa 120		
gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt 180		
gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat 240		
gagtcagctg aaaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca 300		
gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct 360		
gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg 420		
agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa 480		
aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ctttactttt atgccccgga actccttttc 540		
tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc 600		
tgctgttgct caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag 660		
agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta 720		
gctcgctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgag aagtttccaa gttagtga 780		
gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac 840		
agggcggacc ttgccaaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag 900		
gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat 960		
gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc 1020		
aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgatga atatgcaaga 1080		
aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact 1140		
ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa 1200		
tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag 1260		
cagcttgag agtacaaaatt ccagaatgcg ctattagtgc gttacaccaa gaaagtacc 1320		
caagtgtcaa ctccaactct thtagaggct tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa 1380		
tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtgggtc 1440		
ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaagtc 1500		
tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca 1560		
tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttc atgcagatat atgcacactt 1620		
tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag 1680		
cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc ttttgtagag 1740		
aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttggtt 1800		
gctgcaagtc aagctgcctt aggcttagcc agcctgttca gcggccgat cctgatcagg 1860		

aacaacagcg accaggacga gctggacacc gaggccgaag tgagcaggag gctggagaac 1920
 agactggtgc tgctgttctt tggcgccgga gcctgccctc agtgccaggc cttcgtgccc 1980
 atcctgaagg atttctttgt gcggctgacc gacgagttct acgtgctgag agccgcccag 2040
 ctggccctgg tgtatgtgag ccaggacagc accgaggagc agcaggacct gttcctgaag 2100
 gacatgcccc agaagtggct gttcctgccc ttcgaggacg acctgcggag atga 2154

<210> 3

<211> 732

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自小鼠IgK的N段信号序列,之后是间隔序列,之后是RdCVFS,之后是间隔序列,之后是C端的人白蛋白

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1) .. (21)

<223> 来自小鼠IgK的N段信号序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (22) .. (35)

<223> 间隔序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (36) .. (143)

<223> RdCVFS

<220>

<221> misc_feature

<222> (144) .. (147)

<223> 间隔序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (148) .. (732)

<223> 人白蛋白

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Val Arg Ser

20 25 30

Leu Val Pro Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn

35 40 45

Ser Asp Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu		
50	55	60
Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln		
65	70	75 80
Cys Gln Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr		
	85	90 95
Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val		
	100	105 110
Ser Gln Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met		
	115	120 125
Pro Lys Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Gly		
	130	135 140
Arg Asp Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp		
145	150	155 160
Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln		
	165	170 175
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu		
	180	185 190
Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn		
	195	200 205
Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val		
	210	215 220
Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys		
225	230	235 240
Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn		
	245	250 255
Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr		
	260	265 270
Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu		
	275	280 285
Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe		
	290	295 300
Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp		
305	310	315 320
Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly		
	325	330 335
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys		
	340	345 350
Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln		

355	360	365
Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe	Ala Glu Val Ser Lys	Leu Val Thr Asp
370	375	380
Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	Leu Leu Glu Cys	
385	390	395
Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp		400
405	410	415
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu		
420	425	430
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp		
435	440	445
Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys		
450	455	460
Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu		
465	470	475
Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu		
485	490	495
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp		
500	505	510
Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val		
515	520	525
Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln		
530	535	540
Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys		
545	550	555
Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn		
565	570	575
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg		
580	585	590
Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys		
595	600	605
Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys		
610	615	620
Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val		
625	630	635
Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe		
645	650	655
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys		
660	665	670

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
 675 680 685
 Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
 690 695 700
 Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
 705 710 715 720
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 725 730

<210> 4

<211> 2199

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自小鼠IgK的N段信号序列,之后是间隔序列,之后是RdCVFS,之后是间隔序列,之后是C端的人白蛋白

<400> 4

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccag gcgcgccgta cgaagcttgg taccgccag cctgttcagc 120
 ggccggatcc tgatcaggaa caacagcgac caggacgagc tggacaccga ggccgaagtg 180
 agcaggaggc tggagaacag actggtgctg ctgttctttg gcgccggagc ctgccctcag 240
 tgccaggcct tcgtgcccac cctgaaggat ttctttgtgc ggctgaccga cgagttctac 300
 gtgctgagag ccgcccagct ggccctggtg tatgtgagcc aggacagcac cgaggagcag 360
 caggacctgt tcctgaagga catgccaag aagtggctgt tcctgccctt cgaggacgac 420
 ctgcggagag gacgagatgc agatgcacac aagagtgagg ttgctcatcg gtttaaagat 480
 ttgggagaag aaaatttcaa agccttggtg ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag 540
 tgtccatttg aagatcatgt aaaattagtg aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt 600
 gttgctgatg agtcagctga aaattgtgac aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa 660
 ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc tatggtgaaa tggctgactg ctgtgcaaaa 720
 caagaacctg agagaaatga atgcttcttg caacacaaag atgacaaccc aaacctcccc 780
 cgatttggtg gaccagaggt tgatgtgatg tgcactgctt ttcattgaca tgaagagaca 840
 tttttgaaaa aatacttata tgaaattgcc agaagacatc cttactttta tgccccggaa 900
 ctctttttct ttgctaaaag gtataaagct gcttttacag aatgttgcca agctgctgat 960
 aaagctgcct gcctgttgcc aaagctcgat gaacttcggg atgaaggga ggcttcgtct 1020
 gccaaacaga gactcaagtg tgccagtctc caaaaatttg gagaaagagc tttcaaagca 1080
 tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt cccaaagctg agtttgcaga agtttccaag 1140
 ttagtgacag atcttaccaa agtccacacg gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt 1200
 gctgatgaca gggcggacct tgccaagtat atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt 1260
 aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg ttggaaaaat cccactgcat tgccgaagtg 1320
 gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgctt tcattagctg ctgattttgt tgaaagtaag 1380

gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaag gatgtcttcc tgggcatgtt tttgtatgaa 1440
 tatgcaagaa ggcatcctga ttactctgtc gtgctgctgc tgagacttgc caagacatat 1500
 gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgct gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg 1560
 ttcgatgaat ttaaaccctct tgtggaagag cctcagaatt taatcaaaca aaattgtgag 1620
 ctttttgagc agcttggaga gtacaaattc cagaatgcgc tattagtctg ttacaccaag 1680
 aaagtacccc aagtgtcaac tccaactctt gtagaggctc caagaaacct aggaaaagtg 1740
 ggcagcaaat gttgtaaaca tcctgaagca aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta 1800
 tccgtgggtcc tgaaccagtt atgtgtgttg catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc 1860
 accaaatgct gcacagaatc cttggtgaac aggcgacat gcttttcagc tctggaagtc 1920
 gatgaaacat acgttcccaa agagttaaat gctgaaacat tcaccttcca tgcagatata 1980
 tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc aagaaacaaa ctgcacttgt tgagctcgtg 2040
 aaacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa ctgaaagctg ttatggatga tttcgcagct 2100
 tttgtagaga agtgctgcaa ggctgacgat aaggagacct gctttgccga ggagggtaaa 2160
 aaacttggtg ctgcaagtca agctgcctta ggcttataa 2199

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Met	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly	Arg	Ile	Leu	Ile	Arg	Asn	Asn	Ser	Asp
1			5					10						15	
Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn
			20					25						30	
Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Pro	Gln	Cys	Gln
			35					40						45	
Ala	Phe	Val	Pro	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Phe	Val	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu
			50					55						60	
Phe	Tyr	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Ala	Leu	Val	Tyr	Val	Ser	Gln
65				70						75					80
Asp	Ser	Thr	Glu	Glu	Gln	Gln	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Met	Pro	Lys
				85						90					95
Lys	Trp	Leu	Phe	Leu	Pro	Phe	Glu	Asp	Asp	Leu	Arg	Arg			
				100						105					

<210> 6

<211> 212

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp

1	5	10	15
Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn			
20	25	30	
Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln			
35	40	45	
Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu			
50	55	60	
Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln			
65	70	75	80
Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys			
85	90	95	
Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp Leu Gly			
100	105	110	
Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro			
115	120	125	
Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln Arg Leu			
130	135	140	
Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val Leu Asp			
145	150	155	160
Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser			
165	170	175	
Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala			
180	185	190	
Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala			
195	200	205	
Gly Gly Leu Phe			
210			

M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R
L V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y
V L R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L
F L P F E D D L R R (SEQ ID NO:5)

图1A

M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R
L V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y
V L R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L
F L P F E D D L R R D L G R Q F S V E R L P A V V V L K P D G D V
L T R D G A D E I Q R L G T A C F A N W Q E A A E V L D R N F Q L
P E D L E D Q E P R S L T E C L R R H K Y R V E K A A R G G R D P
G G G G G E E G G A G G L F (SEQ ID NO:6)

图1B

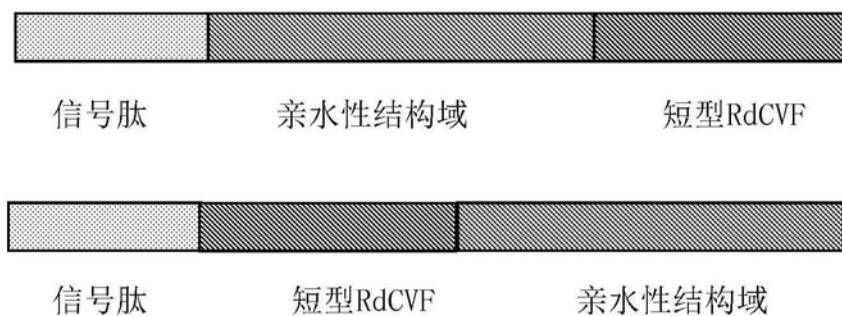


图2

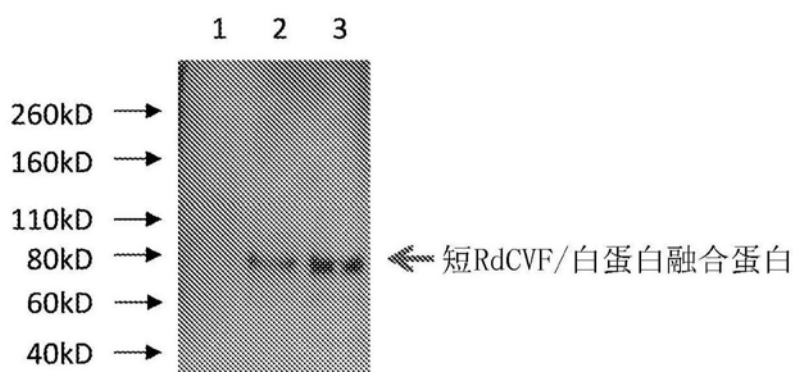


图3