

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-504400

(P2022-504400A)

(43)公表日 令和4年1月13日(2022.1.13)

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/55 (2006.01) | C 1 2 N 15/55 | 4 B 0 5 0 |
| C 1 2 N 9/22 (2006.01) | C 1 2 N 9/22 | Z N A 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 15/14 (2006.01) | C 1 2 N 15/14 | 4 C 0 7 6 |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N 15/62 | Z 4 C 0 8 4 |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 19/00 | 4 C 0 8 6 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全64頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------------------------------|--|
| (21)出願番号 特願2021-518905(P2021-518905) | (71)出願人 520055939 ニュートロリス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー セッツ ケンブリッジ ノース メイン ス トリート 7 0 0 |
| (86)(22)出願日 令和1年10月8日(2019.10.8) | |
| (85)翻訳文提出日 令和3年5月18日(2021.5.18) | |
| (86)国際出願番号 PCT/US2019/055178 | |
| (87)国際公開番号 WO2020/076817 | |
| (87)国際公開日 令和2年4月16日(2020.4.16) | (74)代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所 |
| (31)優先権主張番号 62/846,904 | |
| (32)優先日 令和1年5月13日(2019.5.13) | (72)発明者 フックス トビアス エー . アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー セッツ ケンブリッジ ノース メイン ス トリート 7 0 0 シー/オー ニュート ロリス インコーポレイテッド |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US) | (72)発明者 ハッキム アール . アブドゥル アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー セッツ ケンブリッジ ノース メイン ス |
| (31)優先権主張番号 62/779,104 | |
| (32)優先日 平成30年12月13日(2018.12.13) | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US) | |
| (31)優先権主張番号 62/808,601 | |

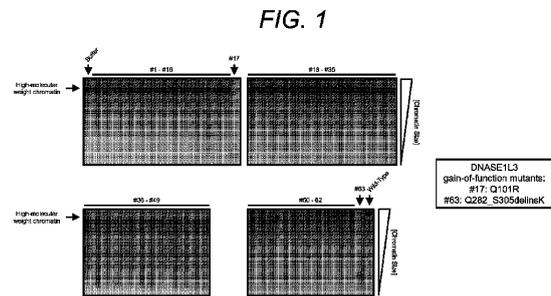
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 製造及び治療のためのDNASE酵素の操作

(57)【要約】

本開示は、好中球細胞外トラップ(NE T)の蓄積及び/または放出を特徴とする状態を治療するために有用である、操作されたヒト細胞外DNASEタンパク質(例えば、DNASE 1(D 1)、DNASE 1様1(D 1 L 1)、DNASE 1様2(D 1 L 2)、DNASE 1様3アイソフォーム1(D 1 L 3)、DNASE 1様3アイソフォーム2(D 1 L 3 - 2)、DNASE 2 A(D 2 A)、及びDNASE 2 B(D 2 B)のバリエーション)を提供する。本発明に従って、DNaseバリエーションは、治療及び/または大規模製造のための利点を有する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D N a s e 1 様 3 (D 1 L 3) バリエーションであって、前記 D 1 L 3 タンパク質バリエーションが、各事例において、配列番号 4 及び/または配列番号 5 の野生型 D 1 L 3 タンパク質と比較して、タンパク質分解に対する増加した抵抗性、増加した循環半減期、インビトロ発現系でのより高い産生レベル、ならびにインビトロでの実質的に低くはなく、同一の、またはより良好なクロマチン及び/または N E T 分解活性のうちの一つ以上を有する、前記 D N a s e 1 様 3 (D 1 L 3) バリエーション。

【請求項 2】

前記 D 1 L 3 バリエーションが、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される成熟酵素と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列、前記成熟酵素の N 末端側のアルブミンアミノ酸配列、及び前記アルブミンアミノ酸配列と前記成熟酵素のアミノ酸配列との間の連結アミノ酸配列を含む、融合タンパク質である、請求項 1 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

10

【請求項 3】

前記 D 1 L 3 バリエーションが、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される成熟酵素と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 4】

前記 D 1 L 3 バリエーションが、C 末端塩基性ドメインの少なくとも 5 個のアミノ酸の欠失を有し、前記 C 末端塩基性ドメインが、配列番号 4 または配列番号 5 の 2 3 個の C 末端アミノ酸によって定義される、請求項 2 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

20

【請求項 5】

前記 D 1 L 3 が、前記 C 末端塩基性ドメインの少なくとも 1 0 個のアミノ酸の欠失を有する、請求項 4 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 6】

前記 D 1 L 3 が、前記 C 末端塩基性ドメインの少なくとも 1 5 個のアミノ酸の欠失を有する、請求項 4 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 7】

前記 D 1 L 3 が、前記 C 末端塩基性ドメイン全体の欠失を有する、請求項 6 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

30

【請求項 8】

前記 D 1 L 3 が、配列番号 4 の 1 0 1 位に対応する位置にアミノ酸置換を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 9】

前記 D 1 L 3 が、Q 1 0 1 R であるアミノ酸置換を有する、請求項 8 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 1 0】

リンカーが、柔軟性、剛性である、またはプロテアーゼ切断部位を含む、請求項 2 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 1 1】

前記リンカーが、柔軟性リンカーである、請求項 1 0 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

40

【請求項 1 2】

前記リンカーが、少なくとも 1 0 個のアミノ酸、または少なくとも 1 5 個のアミノ酸を有する、請求項 1 0 または 1 1 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 1 3】

前記リンカーが、1 5 ~ 3 5 個のアミノ酸を有する、請求項 1 2 に記載の D 1 L 3 バリエーション。

【請求項 1 4】

前記バリエーションが、配列番号 8 ~ 3 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、各事例において、任意選択で、独立して挿入、欠失、または置換から選択される 1 ~ 2 0 個のアミノ

50

酸修飾を有する、請求項 1 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 15】

前記バリエントが、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、または配列番号 30 のアミノ酸配列を有する、請求項 14 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 16】

配列番号 4 の酵素と比較して、D 1 からの 1 つ以上の構成要素置換、及び / またはシステイン残基の 1 つ以上の欠失もしくは置換を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 17】

配列番号 4 の C 6 8 に対応するアミノ酸が置換される、請求項 16 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 18】

前記配列番号 4 の C 6 8 に対応するアミノ酸が、Ala、Ser、及び Gly から選択されるアミノ酸で置換される、請求項 17 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 19】

前記バリエントが、置換 N 6 4 _ I 7 0 d e l i n s H L T A V G K を含み、それは、前記構成要素置換が、システイン残基を含むように修飾されないことを条件として、任意選択で、1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、欠失、または挿入によって修飾される、請求項 16 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 20】

C 6 8 及び / または C 1 9 4 に対応するアミノ酸への P E G 複合を含む、請求項 1 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 21】

配列番号 4 及び / または配列番号 5 に存在するアルギニン及びリジン残基の 1 つ以上の置換を有し、前記置換により、前記 D 1 L 3 バリエントが、配列番号 4 のタンパク質または配列番号 5 のタンパク質と比較して、プラスミン、トロンピン、及び / またはトリプシンによるタンパク質分解に対する感受性が低下する、請求項 1 または 2 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 22】

前記アルギニン及びリジン置換のうちの 1 つ以上が、配列番号 4 : K 1 8 0、K 2 0 0、K 2 5 9、及び R 2 8 5 の位置 (複数可) に対応する、請求項 21 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 23】

前記アルギニンまたはリジン置換が、配列番号 4 に関して、K 1 8 0 A、K 2 0 0 A、K 2 5 9 A、及び R 2 8 5 A のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 22 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 24】

前記バリエントが、配列番号 4 に関して、K 1 8 0 _ A 1 8 1 d e l i n s G L、P 1 9 8 _ A 2 0 1 d e l i n s R P S Q、及び K 2 5 9 A から選択される置換を含む、請求項 22 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 25】

前記バリエントが、対塩基性残基の 1 つ以上の変異を含み、前記対塩基性残基が、配列番号 4 の K 5 0 / R 5 1、R 8 0 / R 8 1、K 1 1 4 / R 1 1 5、K 1 9 9 / K 2 0 0、K 2 2 6 / K 2 2 7、K 2 9 1 / K 2 9 2、R 2 9 7 / K 2 9 8 / K 2 9 9、及び K 3 0 3 / R 3 0 4 から選択される位置に対応する、請求項 21 に記載の D 1 L 3 バリエント。

【請求項 26】

前記対塩基性残基の 1 つ以上の変異が、配列番号 4 に関して、R 1 1 4 T、R 1 1 4 A、R 1 1 4 D、R 1 1 4 Q、K 2 2 7 S、及び K 2 2 7 E から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項 25 に記載の D 1 L 3 バリエント。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記対塩基性残基の1つ以上の変異が、配列番号4に関して、R51K、R81K、R115K、及びR304Kから選択されるアミノ酸置換を含む、請求項25に記載のD1L3バリエーション。

【請求項 28】

前記リンカーが、凝固経路プロテアーゼによって切断可能である、請求項10に記載のD1L3バリエーション。

【請求項 29】

前記リンカーが、第XII因子または好中球プロテアーゼによって切断可能である、請求項28に記載のD1L3バリエーション。

【請求項 30】

DNaase1(D1)バリエーションであって、システイン残基の1つ以上の欠失または置換を有する、配列番号1によって定義される酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、前記DNaase1(D1)バリエーション。

【請求項 31】

配列番号1のC123及びC126に対応する1つ以上のアミノ酸が、欠失または置換される、請求項30に記載のD1バリエーション。

【請求項 32】

前記システイン(複数可)が、Ala、Ser、及びGlyから、独立して選択されるアミノ酸で置換される、請求項31に記載のD1バリエーション。

【請求項 33】

前記バリエーションが、置換G122_N128delinsYQGDAを含む、請求項30に記載のD1バリエーション。

【請求項 34】

前記D1バリエーションが、アルブミンアミノ酸配列、及び任意選択で、ペプチドリンカーを含む、融合タンパク質である、請求項30~33のいずれか1項に記載のD1バリエーション。

【請求項 35】

前記融合タンパク質のアルブミンドメインが、前記D1ドメインのN末端側に位置する、請求項34に記載のD1バリエーション。

【請求項 36】

前記ペプチドリンカーが、前記アルブミンドメインと前記D1ドメインとの間に挿入される、請求項34または35に記載のD1バリエーションタンパク質。

【請求項 37】

前記ペプチドリンカーが、柔軟性リンカー、剛性リンカー、またはプロテアーゼ切断可能リンカーである、請求項36に記載のD1バリエーション。

【請求項 38】

前記リンカーが、少なくとも10個のアミノ酸、または少なくとも15個のアミノ酸を有する、請求項37に記載のD1バリエーション。

【請求項 39】

前記リンカーが、15~35個のアミノ酸を有する、請求項37に記載のD1バリエーション。

【請求項 40】

前記融合タンパク質の前記D1ドメインが、配列番号4または配列番号5によって定義される成熟酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項34~39のいずれか1項に記載のD1バリエーション。

【請求項 41】

前記D1バリエーションが、配列番号1の野生型D1タンパク質と比較して少なくとも80%のDNA分解活性を有する、請求項40に記載のD1バリエーション。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

前記 D 1 バリエントが、配列番号 1 の酵素と少なくとも 85%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 40 または 41 に記載の D 1 バリエント。

【請求項 43】

D 1 バリエントであって、配列番号 1 によって定義される酵素と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含み、C 1 2 3 及び / または C 1 2 6 に対応するアミノ酸への P E G 複合を有する、前記 D 1 バリエント。

【請求項 44】

D N a s e 1 様 1 (D 1 L 1) バリエントであって、1 つ以上の欠失または置換システイン残基を有する、配列番号 2 によって定義される酵素と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む、前記 D N a s e 1 様 1 (D 1 L 1) バリエント。

10

【請求項 45】

少なくとも 1 つの置換または欠失システイン残基が、配列番号 2 の C 2 2 または C 5 0 に対応する位置である、請求項 44 に記載の D 1 L 1 バリエント。

【請求項 46】

前記置換システイン残基のうちの 1 つ以上が、G l y、A r g、または S e r であるアミノ酸によって置換される、請求項 45 に記載の D 1 L 1 バリエント。

【請求項 47】

前記 D 1 L 1 バリエントが、配列番号 2 の酵素と少なくとも 85%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 44 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の D 1 L 1 バリエント。

20

【請求項 48】

前記バリエントが、アルブミンアミノ酸配列、及び任意選択で、D 1 L 1 ドメインとアルブミンドメインとの間のペプチドリンカーを含む、融合タンパク質である、請求項 44 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の D 1 L 1 バリエント。

【請求項 49】

前記アルブミンドメインが、前記 D 1 L 1 ドメインの N 末端側に位置する、請求項 48 に記載の D 1 L 1 バリエント。

【請求項 50】

前記融合タンパク質が、ペプチドリンカーを含み、前記ペプチドリンカーが、柔軟性リンカー、剛性リンカー、またはプロテアーゼ切断可能リンカーである、請求項 48 または 49 に記載の D 1 L 1 バリエント。

30

【請求項 51】

D 1 L 1 バリエントであって、配列番号 2 によって定義される酵素と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含み、C 2 2 及び / または C 5 0 に対応するアミノ酸への P E G 複合を有する、前記 D 1 L 1 バリエント。

【請求項 52】

D N a s e 1 様 2 (D 1 L 2) バリエントであって、1 つ以上の置換または欠失システイン残基を有する、配列番号 3 によって定義される酵素と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む、前記 D N a s e 1 様 2 (D 1 L 2) バリエント。

40

【請求項 53】

配列番号 3 の C 4 3 に対応するシステイン残基が、置換または欠失される、請求項 52 に記載の D 1 L 2 バリエント。

【請求項 54】

前記置換システイン残基のうちの 1 つ以上が、G l y、A r g、または S e r であるアミノ酸によって置換される、請求項 52 または 53 に記載の D 1 L 2 バリエント。

【請求項 55】

前記 D 1 L 2 バリエントが、配列番号 2 の酵素と少なくとも 85%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 52 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の D 1 L 2 バリエント。

50

【請求項 56】

前記バリエーションが、アルブミンアミノ酸配列、及び任意選択で、D1L2ドメインとアルブミンドメインとの間のペプチドリンカーを含む、融合タンパク質である、請求項52～55のいずれか1項に記載のD1L2バリエーション。

【請求項 57】

前記アルブミンドメインが、前記D1L2ドメインのN末端側に位置する、請求項56に記載のD1L2バリエーション。

【請求項 58】

ペプチドリンカーが、前記アルブミンドメインと前記D1L2ドメインとの間に挿入される、請求項56または57に記載のD1L2バリエーション。

10

【請求項 59】

前記ペプチドリンカーが、柔軟性リンカー、剛性リンカー、またはプロテアーゼ切断可能リンカーである、請求項58に記載のD1L2バリエーション。

【請求項 60】

D1L2バリエーションであって、配列番号3によって定義される酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、C43に対応するアミノ酸へのPEG複合を有する、前記D1L2バリエーション。

【請求項 61】

請求項1～60のいずれか1項に記載のD1、D1L1、D1L2、またはD1L3バリエーションをコードする、単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 62】

前記ポリヌクレオチドが、mRNAである、請求項61に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 63】

前記ポリヌクレオチドが、DNAである、請求項61に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 64】

請求項61～63のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 65】

請求項64に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 66】

請求項1～60のいずれか1項に記載のD1、D1L1、D1L2、またはD1L3バリエーションを発現するように修飾された、宿主細胞。

30

【請求項 67】

薬学的組成物であって、請求項1～60のいずれか1項に記載のD1、D1L1、D1L2、またはD1L3バリエーション、請求項61～63のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項64に記載のベクター、または請求項65もしくは66に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体を含む、前記薬学的組成物。

【請求項 68】

局所、非経口、または肺投与のために製剤化される、請求項67に記載の薬学的組成物。

【請求項 69】

皮内、筋肉内、腹腔内、関節内、静脈内、皮下、動脈内、経口、舌下、肺、または経皮投与のために製剤化される、請求項68に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 70】

細胞外DNA分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ(ET)分解、及び/または好中球細胞外トラップ(NET)分解を必要とする対象を治療するための方法であって、前記方法が、治療有効量の請求項67～69のいずれか1項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 71】

前記対象が、D1L3遺伝子内に機能喪失変異を有する、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

前記対象が、慢性好中球増加、好中球凝集または白血球停滞、血栓症または血管閉塞、虚

50

血再灌流障害、外科的または外傷性組織損傷、急性もしくは慢性炎症性反応または疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、代謝疾患、全身性炎症、呼吸器の炎症性疾患、腎炎症性疾患、移植組織に関連する炎症性疾患、及びがんから選択される状態を有する、請求項 70 または 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記対象が、管系を閉塞する NET を有するか、またはその危険性があり、前記状態が、任意選択で、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、乾性眼疾患、血管閉塞、及び腎疾患から選択される、請求項 70 または 71 に記載の方法。

【請求項 74】

前記対象が、内皮表面に NET の蓄積を有するか、またはその危険性がある、請求項 70 または 71 に記載の方法。 10

【請求項 75】

前記 D1L3 バリエントが、アルブミンアミノ酸配列を含む融合タンパク質であり、前記対象に非経口的に投与され、前記投与が、およそ週 1 回である、請求項 70 ~ 74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 76】

請求項 1 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の組換え DNase バリエントを産生するための方法であって、前記 DNase バリエントをコードするポリヌクレオチドを発現する細胞を培養することと、組換えタンパク質を回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 77】

前記細胞が、*Pichia pastoris* である、請求項 76 に記載の方法。 20

【請求項 78】

前記 *Pichia pastoris* 細胞が、アスパラギン酸プロテイナーゼ 3 及び / または ケキシンの遺伝的欠失もしくは不活性化、または薬理的障害を有する、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記細胞が、CHO 細胞である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 80】

前記 CHO 細胞が、フーリンプロテアーゼの遺伝的欠失もしくは不活性化、または薬理的障害を有する、請求項 79 に記載の方法。 30

【請求項 81】

前記 DNase バリエントが、対塩基性残基の 1 つ以上の変異を含む D1L3 バリエントであり、前記対塩基性残基が、配列番号 4 の K50 / R51、R80 / R81、K114 / R115、K199 / K200、K226 / K227、K291 / K292、R297 / K298 / K299、及び K303 / R304 から選択される位置に対応する、請求項 76 ~ 80 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 82】

前記対塩基性残基の 1 つ以上の変異が、R114T、R114A、R114D、R114Q、K227S、及び K227E から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項 81 に記載の方法。 40

【請求項 83】

前記対塩基性残基の 1 つ以上の変異が、R51K、R81K、R115K、及び R304K から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

組換え D1 タンパク質ファミリーメンバーまたはそのバリエントを産生する方法であって、ポリアニオン化合物の存在下で DNase バリエントをコードするポリヌクレオチドを発現する細胞を培養することと、組換えタンパク質を回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 85】

前記組換え D1 タンパク質ファミリーメンバーが、D1、D1L3、D1L1、または D 50

1 L 2 のバリエーションである、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記ポリアニオンが、デキストラン硫酸、ヘパリン、クエン酸第二鉄、及び E D T A のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 8 4 または 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記ポリアニオンが、デキストラン硫酸である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記細胞が、原核性または真核性である、請求項 8 4 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 D N A s e が、非哺乳動物発現系を使用して発現され、それが任意選択で、*P i c h i a p a s t o r i s*、*S a c c h a r o m y c e s* 種、または *E s c h e r i c h i a c o l i* である、請求項 8 8 に記載の方法。

10

【請求項 9 0】

前記発現系が、*P i c h i a p a s t o r i s* である、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記 *P i c h i a p a s t o r i s* 細胞が、アスパラギン酸プロテイナーゼ 3 及び / または ケキシンの遺伝的欠失もしくは不活性化、または薬理的阻害を有する、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記細胞が、C H O 細胞である、請求項 8 8 に記載の方法。

20

【請求項 9 3】

前記 C H O 細胞が、フーリンプロテアーゼの遺伝的欠失もしくは不活性化、または薬理的阻害を有する、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記組換え D 1 ファミリーメンバーが、ペプチドリンカーを介した N 末端でのアルブミンの融合を含む、請求項 8 4 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記リンカーが、柔軟性リンカーである、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記リンカーが、切断可能リンカーであり、任意選択で、凝固経路プロテアーゼまたは好中球プロテアーゼによって切断可能である、請求項 9 5 に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

凝固因子プロテアーゼが、第 X I I 因子である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記ペプチドリンカーが、第 X I 因子またはプレカリクレインにおける F X I I 切断部位のすべてまたは一部から選択される、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記組換え D 1 ファミリーメンバーまたはバリエーションが、前記細胞からの前記組換えタンパク質の分泌を指示するシグナルペプチドをコードする構築物で発現される、請求項 8 4 ~ 9 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 0 0】

前記組換え D 1 ファミリーメンバーまたはバリエーションが、アニオン交換樹脂を使用して前記ポリアニオン化合物から精製される、請求項 8 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記組換え D 1 ファミリーメンバーまたはバリエーションが、カチオン交換樹脂を使用してさらに精製される、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

関連出願

本出願は、2018年10月8日に出願された米国仮出願第62/742,682号、2018年12月5日に出願された同第62/775,563号、2018年12月13日に出願された同第62/779,104号、2019年2月21日に出願された同第62,808,601号、及び2019年5月13日に出願された同第62/846,904号の利益及び優先権を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、操作されたDNASE酵素の分野に関する。

【背景技術】

10

【0003】

炎症は、侵入する微生物を制御し、損傷した組織を治癒させるために不可欠な宿主応答である。非制御性及び持続的な炎症は、多数の炎症性障害において組織損傷を引き起こす。好中球は、急性炎症における主な白血球である。感染中、好中球は、好中球細胞外トラップ(NET)、毒性ヒストンで装飾されたDNAフィラメントの格子、ならびに細菌を固定及び中和する酵素を生成する。しかしながら、不適切に放出されたNETは、それらの細胞傷害性、炎症促進性、及び血栓形成促進性活性に起因して宿主細胞に害を及ぼし得る。

【0004】

DNASE1(D1)は、DNASE1様1(D1L1)、DNASE1様2(D1L2)及びDNASE1様3(D1L3)と共に、相同分泌型DNase1タンパク質酵素の群であるDNASE1タンパク質ファミリーを形成する。DNASE2A及びDNASE2Bは、相同な細胞外DNase酵素の追加の群を形成する。DNASE1-及びDNASE2-タンパク質ファミリーメンバーは、進化的に保存され、ヒトを含む様々な種において発現される。組換えヒトDNASE1及びDNASE2タンパク質ファミリーメンバーは、NET関連疾患の薬物候補を提供する。D1は、患者におけるいくつかの治療用途のために開発されているが、DNASE1タンパク質ファミリーの他のメンバーの大規模製造の条件は記載されていない。さらに、これらの酵素の物理的、酵素的、及び薬物動態特性は、臨床応用には理想的ではない。したがって、D1L1、D1L2、及びD1L3酵素の製造プロセスを定義し、NETを分解することを含む、治療で使用するためのDNaseを操作する必要がある。

20

30

【発明の概要】

【0005】

本発明は、細胞外DNA、細胞外クロマチン、及び好中球細胞外トラップ(NET)の蓄積及び/または放出を特徴とする状態を治療するために有用である、操作されたヒト細胞外DNASEタンパク質(例えば、DNASE1(D1)、DNASE1様1(D1L1)、DNASE1様2(D1L2)、DNASE1様3アイソフォーム1(D1L3)、DNASE1様3アイソフォーム2(D1L3-2)、DNASE2A(D2A)、及びDNASE2B(D2B)のバリエーション)を提供する。本発明の態様に従って、本明細書に記載されるDNaseバリエーションは、治療により好適であり、及び/または大規模製造により適している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるDNaseバリエーションは、全身療法を含む医療療法に対する利点を有する。かかる利点としては、より遅い薬物排出、例えば、増加した循環半減期(例えば、血清半減期)、延長した薬力学的活性の持続時間、高クロマチン分解活性、及びプロテアーゼ抵抗性が含まれる。

40

【0006】

いくつかの態様では、本発明は、D1L3バリエーションであって、D1L3バリエーションが、配列番号4の野生型D1L3アイソフォーム1酵素または配列番号5の野生型D1L3アイソフォーム2酵素と比較して、増加したタンパク質安定性、より遅い薬物排出、増加した薬力学的活性の持続時間、タンパク質分解に対する抵抗性、インビトロ発現系でのより高い産生レベル、精製のためのより良好な適合性、ならびに実質的に低くはなく、同一の

50

、またはより良好なクロマチン及び/またはNET分解活性のうちの1つ以上を有する、D1L3バリエーションを提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号4または配列番号5によって定義される成熟酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列、成熟酵素のN末端側のアルブミンアミノ酸配列、及び任意選択で、アルブミンアミノ酸配列（アルブミンドメイン）とD1L3アミノ酸配列（D1L3ドメイン）との間の連結アミノ酸配列を含む、融合タンパク質である。これらの実施形態では、D1L3は、全身療法を含む、より遅い排出（例えば、改善された循環半減期または血清半減期）及び延長した薬力学的活性の持続時間を示す。いくつかの実施形態では、D1L3ドメインへの連結配列を有するアルブミンの融合は、アルブミン融合を有しない酵素と比較して、酵素のクロマチン分解活性（例えば、インビトロアッセイを使用して測定される）に実質的に影響を及ぼさない。

10

【0008】

これらの実施形態では、融合タンパク質のD1L3ドメインは、野生型D1L3酵素に存在するC末端塩基性ドメインのすべてまたは一部の欠失を有する。C末端塩基性ドメインの欠失または不活性化は、クロマチン分解活性を実質的に改善する。すなわち、C末端塩基性ドメイン（BD）の除去は、クロマチンを分解するための野生型D1L3酵素を活性化化する。

【0009】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、D1からの1つ以上の構成要素置換を有する。例えば、D1L3バリエーションは、Q282_S305 del ins Kの構成要素置換を有し得、それは、C末端塩基性ドメインの欠失を含み、そのドメインがD1において欠如する。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号4の101位に対応する位置にアミノ酸置換を有する。置換は、D1からの対応する構成要素に基づくArgであり得るか、またはいくつかの実施形態では、Lysである。この位置での置換は、D1L3バリエーションのクロマチン分解活性を増強することができる。

20

【0010】

存在するリンカーは、柔軟性リンカー、剛性リンカー、またはプロテアーゼ切断可能リンカーなどの生理学的に切断可能なリンカーであり得る。例えば、リンカーは、親水性アミノ酸配列であり得、主に、Gly、Ala、Ser、Thr、及びProから選択されるアミノ酸から構築され得る。いくつかの実施形態では、バリエーションは、主にグリシン及びセリン残基である柔軟性リンカー（例えば、(GyS)_nリンカーであり、yは1~5であり、nは1~20である）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘリックスリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも15個のアミノ酸、または少なくとも25個のアミノ酸を有する。様々な実施形態では、少なくとも15個のアミノ酸のより長いリンカーは、CHO細胞またはPichia pastorisなどの哺乳動物及び非哺乳動物発現系における発現時の収率の改善を提供することができる。さらに、驚くべきことに、より長いリンカー配列は、より短いリンカー配列と比較して、インビトロクロマチン分解アッセイにおいて改善されたクロマチン分解活性を示した。

30

40

【0011】

様々な実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号17~30のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、各事例において、任意選択で、独立して挿入、欠失、または置換から選択される1~20個のアミノ酸修飾を有する。これらの配列は、D1L3（またはD1L3バリエーション）とアルブミン配列との間の例示的な融合タンパク質を提供し、様々なリンカー設計を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸修飾が、D1L3ドメイン、アルブミンドメイン、または両方のドメイン内にある。いくつかの実施形態では、バリエーションは、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、または配列番号30のアミノ酸配列を有する。これらの実施形態では、D1L3バリエーションは、N末端からC末端の順序で、アルブミンアミノ酸配列、中程度または長い柔

50

軟性リンカー、及びD1L3アミノ酸配列（すなわち、D1L3バリエーションを含む）を含む。配列番号28は、長い柔軟性ペプチドリンカーを介したC末端でのアルブミン融合をさらに含む。

【0012】

他の実施形態では、リンカーは、プロテアーゼ、例えば、凝固経路プロテアーゼ、例えば、活性化第XI因子によって切断可能である。特定の実施形態では、リンカーは、第XI因子及び/またはプレカリクレインのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、リンカーは、好中球エラスターゼ、カテプシンG、またはプロテイナーゼ3などの好中球特異的プロテアーゼによる切断のために標的化されるペプチド配列を含む。

【0013】

いくつかの態様では、本発明は、製造において利点を有するように操作された細胞外DNASE酵素のバリエーションを提供し、治療に使用するのに好適な組換え酵素の産生を提供する。様々な実施形態では、本発明は、システイン残基における1つ以上のアミノ酸置換（またはCys残基のPEG化）を含む組換えD1、D1L1、D1L2、及びD1L3バリエーションを提供し、タンパク質発現中のジスルフィド架橋を介した分子内及び分子間架橋の減少をもたらす。

【0014】

他の態様では、本発明は、インビボでの曝露を改善するために、例えば、排出を遅らせる、例えば、半減期（例えば、血清半減期）を延長する、及び薬学的活性の持続時間を延長する、ならびに組換え酵素産生中のタンパク質分解を低減させるために、プロテアーゼ抵抗性において利点を有するように操作された細胞外DNASE酵素のバリエーションを提供する。本開示は、例えば、プラスミン、トロンピン、及び/またはトリプシンによるタンパク質分解に感受性のあるD1L3残基、ならびに哺乳動物及び非哺乳動物細胞株によって産生されるプロテアーゼに感受性のある残基（例えば、対塩基性アミノ酸）を特定する。これらの残基の操作された変異は、プロテアーゼ抵抗性においてこれらの利点を付与することができる。

【0015】

他の態様では、本発明は、細胞外DNASEタンパク質の組換え産生のための方法を提供し、本明細書に記載されるそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、非哺乳動物発現系、例えば、*Pichia pastoris*などの真核性非哺乳動物発現系を利用する。いくつかの実施形態では、*Pichia pastoris*は、宿主細胞からの分泌を可能にするその天然シグナルペプチドを有するDNase酵素をコードする。いくつかの実施形態では、発現系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞発現系である。

【0016】

いくつかの実施形態では、組換え発現系は、対塩基性アミノ酸で切断する1つ以上のプロテアーゼの欠失または不活性化を有する。例示的な酵素としては、フェーリン（CHO細胞によって発現される）、ならびに*Pichia pastoris*によって発現されるアスパラギン酸プロテイナーゼ3（Ysp1）及びケキシン（Kex2）が含まれる。いくつかの実施形態では、これらの酵素は、遺伝子的に欠失または不活性化されないが、組換えタンパク質産生中に、それらの活性がプロテアーゼ阻害剤で阻害される。

【0017】

いくつかの実施形態では、非哺乳動物発現系または哺乳動物発現系についての成長培地は、デキストラン硫酸、ヘパリン、クエン酸第二鉄、EDTAなどのポリアニオンで補充される。さらなる実施形態では、*Pichia pastoris*または他の発現系の成長培地は、5kDa~100kDaの平均分子量を有するデキストラン硫酸で補充される。例えば、ポリアニオンは、産生された組換えタンパク質と複合体化するのに十分な量で培養物に追加され得る。いくつかの実施形態では、非哺乳動物発現系または哺乳動物発現系の培養培地からの組換え細胞外DNASEタンパク質及びそのバリエーションは、デキストラン硫酸、ヘパリン、及びEDTAなどのポリアニオンからの組換え細胞外DNASEタン

10

20

30

40

50

パク質及びバリエーションの解離を含む方法を通じて精製される。

【0018】

他の態様では、本発明は、D1、D1L1、D1L2、またはD1L3バリエーションをコードする単離ポリヌクレオチド、ならびにベクター及び宿主細胞を提供する。ポリヌクレオチドは、コードするmRNAまたはDNAであり得る。宿主細胞は、*Pichia pastoris*などの非哺乳動物であるか、またはCHO細胞などの哺乳動物であるかを問わず、細菌または真核生物を含む組換え発現系の細胞であり得る。他の実施形態では、宿主細胞は、DNASE治療のために送達され得る。例えば、いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載される細胞外DNASEタンパク質のうちの1つ以上を分泌するように修飾され、治療剤としての投与を意図する、宿主細胞、例えば、ヒト細胞、例えば、白血球を提供する。 10

【0019】

本発明は、本明細書に記載される細胞外DNASEタンパク質もしくはそのバリエーション、または任意選択で、記載されるポリヌクレオチドもしくはベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物をさらに提供する。薬学的組成物は、任意の投与経路のために製剤化され得る。

【0020】

他の態様では、本発明は、治療有効量の本明細書に記載の細胞外DNASEもしくはそのバリエーションまたは組成物を投与することによる、細胞外DNA分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ(ET)分解、及び/または好中球細胞外トラップ(NET)分解を必要とする対象を治療するための方法を提供する。 20

【0021】

本発明の他の態様及び実施形態は、以下の詳細な記載から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】配列番号4の変異Q101R及びQ282__S305delinsKが、DNASE1L3の高分子量クロマチンを分解する活性を増加させることを示す。CHO細胞は、野生型DNASE1L3または構成要素置換を有するDNASE1L3で一過性トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞の上清を、精製した核(高分子量クロマチン)または緩衝液と共にインキュベートした。DNAを単離し、アガロースゲル電気泳動によって分析した。図は、DNA色素で染色したアガロースゲルを示す。 30

【図2】2つのDNASE1L3バリエーションの特徴を示す。野生型DNASE1L3またはQ101RもしくはQ282__S305delinsK変異を有するDNASE1L3でトランスフェクトしたCHO細胞の異なる濃度の上清を、抗DNASE1L3抗体を使用するウエスタンブロット(WB)によって分析した。野生型DNASE1L3及びQ101R変異を有する試料において、より大きい(バリエーション1)及びより小さい(バリエーション2)バンドを検出した。より小さいバンド(バリエーション2)のみが、Q282__S305delinsK変異を有する試料中に示された。並行して、異なる濃度の上清におけるクロマチン分解活性を分析した。図は、アガロースゲル電気泳動によって分析したDNAを示す。Q101RまたはQ282__S305delinsK変異の両方が、野生型DNASE1L3と比較してクロマチン分解活性を増加させた。 40

【図3】野生型DNASE1L3で安定的にトランスフェクトしたCHO細胞の上清中のDNASE1L3バリエーション1及び2の存在を示す。試料を、抗DNASE1L3抗体を使用するウエスタンブロット(WB)によって分析した。より大きい(バリエーション1)及びより小さい(バリエーション2)バンドを、5個のクローンにおいて検出した。

【図4】高頻度な切断部位を特定するために、*Pichia pastoris*において組換え発現した野生型D1L3のC末端アミノ酸配列を示す。精製した野生型D1L3のアミノ酸配列決定により、3つのC末端欠変異体：K291__S305del、K292__S305del、及びS293__S305delを特定した。野生型D1L3のC末端は、検出されなかった。並行して、異なる濃度の精製したタンパク質におけるクロマチ 50

ン分解活性を分析し、精製した D N A S E 1 (D 1) 及び F 2 7 5 Y / F 2 7 9 _ K 2 8 0 d e l i n s V M / Q 2 8 2 _ S 3 0 5 d e l i n s K 変異を有する塩基性ドメイン欠失 D N A S E 1 L 3 (B D D - D 1 L 3) と比較した。図は、アガロースゲル電気泳動によって分析した D N A を示す。

【図 5】 C H O 培地にデキストラン硫酸を追加すると、タンパク質収率を改善することを示す。野生型 D 1 L 3 を発現する C H O 細胞の安定したプールを、標準 C H O 培地またはデキストラン硫酸を補充した C H O 培地でインキュベートした。上清を、抗 D N A S E 1 L 3 抗体を使用するウエスタンブロット (W B) によって分析した。図は、 D 1 L 3 が C H O 細胞において不十分な発現であり、低収率であることを示す。デキストラン硫酸の追加は収率を増加させるが、産生断片化を防止しない。

10

【図 6】デキストラン硫酸複合 D 1 L 3 の親和性精製のためのアニオン交換表面及びカチオン交換表面の使用を示す。 A は、デキストラン硫酸 (D S) などのポリアニオンが、 D 1 L 3 と複合体を形成することを示す。 D 1 L 3 - D S 複合体は、生産プロセス中に、負に帯電した表面によって、 D 1 L 3 の相互作用と除去が防止される。 B 及び C は、 D S - D 1 L 3 複合体から D 1 L 3 を精製する 2 ステップのプロセスを示す。

【図 7】 D 1 L 3 分解を制限するためのトリプシン切断部位変異戦略を列挙する。

【図 8】ヒト D 1 (配列番号 1) 及びヒト D 1 L 3 (配列番号 4) アミノ酸配列の、示されるプラスミン感受性 K R 残基とのアライメントである。

【図 9】 D 1 L 3 分解を制限するためのプラスミン切断部位変異戦略を示す。

【図 10】変異したプラスミン切断部位を有する D 1 L 3 が、酵素活性を保持することを示す。 4 つの推定プラスミド切断部位 (K 1 8 0 _ A 1 8 1 d e l i n s G L 、 P 1 9 8 _ A 2 0 1 d e l i n s R P S Q 、 K 2 5 9 A 、 R 2 8 5 A) において変異を含む D N A S E 1 L 3 を一過性にトランスフェクトした細胞からの上清を、精製した核 (高分子量クロマチン) または緩衝液と共にインキュベートした。 D N A を単離し、アガロースゲル電気泳動によって分析した。図は、 D N A 色素で染色したアガロースゲルを示す。

20

【図 11】プラスミン消化に基づくプラスミン切断部位を列挙し、 D 1 L 3 分解を制限するための変異戦略を示す。

【図 12】 D 1 L 3 が、 C H O 細胞内で発現した際にミスフォールドする傾向を有することを示す。 A は、天然分泌シグナルペプチドを使用した D 1 L 3 発現のための単純な発現ベクターを示す。安定したプールの上清を、抗 D N A S E 1 L 3 抗体を使用するウエスタンブロットによって分析し、 B は、非還元条件下で高分子量の凝集体の存在を示し、これは還元条件下で分解される。

30

【図 13】ヒト D 1 (配列番号 1) 及びヒト D 1 L 3 (配列番号 4) アミノ酸配列の、示される保存及び非保存システイン残基とのアライメントである。

【図 14】 D 1 L 3 におけるシステイン残基を列挙し、タンパク質発現中に高分子量の凝集体を制限するための変異戦略を示す。

【図 15】 D 1 L 3 における C 6 8 A 及び C 1 9 4 A 変異がクロマチン分解活性に影響を及ぼさないことを示す。変異 C 2 4 A 及び C 5 2 A は、クロマチン分解活性を無効にした。変異 D N A S E 1 L 3 バリエーションで一過性にトランスフェクトした細胞からの上清を、精製した核または緩衝液と共にインキュベートした。 D N A を単離し、アガロースゲル電気泳動によって分析した。図は、 D N A 色素で染色したアガロースゲルを示す。

40

【図 16】天然分泌シグナルまたは *Saccharomyces cerevisiae* からの 接合因子 (M F) のいずれかを使用する、 *Pichia pastoris* における D 1 L 3 の発現を示す。 A は、 D 1 L 3 の N 末端が *Saccharomyces cerevisiae* からの 接合因子 (M F) のプレ - プロ分泌リーダーによって誘導されることを示す。 B は、 M F からの分泌シグナルが、シグナルペプチドのグリコシル化及び非プロセッシングをもたらすことを示す。

【図 17】 M E 、 ヒト血清アルブミン (H S A) 、 リンカー配列、及び D 1 L 3 の融合構築物が、 *P. pastoris* 発現系においてグリコシル化されず、クロマチン分解活性を維持することを示す。 A は、 M F 、 ヒト血清アルブミン (H S A) 、 リンカー配列

50

、及びD1L3の融合構築物を示す。この融合構築物は、P. pastoris発現系においてグリコシル化されておらず(B)、クロマチン分解活性を保持する(C)。

【図18】Pichia pastorisにおける塩基性ドメイン欠失DNASE1L3(BDD-D1L3)または野生型DNASE1L3(D1L3)のヒト血清アルブミン(HSA)融合構築物の発現レベルを示す。HSAを、BDD-D1L3またはD1L3のNまたはC末端のいずれかに融合した。2つのリンカー配列、L1及びL2を、HSAとBDD-D1L3またはD1L3との間に配置した。

【図19】Pichia pastorisにおける野生型DNASE1L3(D1L3)のヒト血清アルブミン(HSA)融合構築物の発現レベルを示す。HSAを、D1L3のN末端に融合した。3つの異なるリンカー配列(L2、L3、L4)を、HSAとD1L3との間に配置した。

10

【図20】Pichia pastorisにおいて産生された塩基性ドメイン欠失DNASE1L3(BDD-D1L3)のヒト血清アルブミン(HSA)融合構築物の発現レベル及びクロマチン分解活性を示す。HSAを、BDD-D1L3のN末端に融合した。3つの異なるリンカー配列(L5、L6、L7)を、HSAとD1L3との間に配置した。

【図21】血清クロマチン分解活性及びアルブミンD1L3融合タンパク質の循環半減期を示す。Aは、配列番号14及び配列番号19を注入したDnase1-/-Dnase1L3-/-マウスが、血清中で同様のクロマチン分解活性を示すことを示す。Bは、配列番号19が、ヒトFcRn受容体を発現するマウスにおいて3.3日の循環半減期を有することを示す。

20

【図22】Pichia pastorisにおいて産生された塩基性ドメイン欠失DNASE1L3(BDD-D1L3)のヒト血清アルブミン(HSA)融合構築物の発現レベル及びクロマチン分解活性を示す。HSAを、BDD-D1L3のN末端及びC末端に融合した。2つの異なるリンカー配列(L7及びL8)を、HSAとBDD-D1L3との間に配置した。

【図23】切断可能なリンカーの設計を示す。Aは、HSAとリンカーの融合構築物を示す。Bは、第XIIa因子によって切断可能なリンカーの融合構築物を示す。ヒト第XII因子配列(配列番号42)を含むリンカー及びヒトプレカリクレイン(配列番号44)を含むリンカーを示す。

30

【図24】ヒト細胞外DNase、ヒト凝固因子、及びヒト補体因子を含む、半減期延長融合タンパク質に第XIIa因子切断可能リンカーを利用する他の構築物を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、細胞外DNA、細胞外クロマチン、及び好中球細胞外トラップ(NET)の蓄積及び/または放出を特徴とする状態を治療するために有用である、操作されたヒト細胞外DNASEタンパク質(例えば、DNASE1(D1)、DNASE1様1(D1L1)、DNASE1様2(D1L2)、DNASE1様3アイソフォーム1(D1L3)、DNASE1様3アイソフォーム2(D1L3-2)、DNASE2A(D2A)、及びDNASE2B(D2B)のバリエーション)の候補を提供する。本発明の態様に従って、本明細書に記載されるDNaseバリエーションは、治療により好適であり、及び/または有効であり、及び/または大規模製造により適している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるDNaseバリエーションは、全身療法に対する利点を有する。かかる利点は、より長い曝露(例えば、より遅い排出、より長い循環半減期)、延長した薬力学的作用の持続時間、改善されたクロマチン分解活性、及びプロテアーゼ抵抗性を含む。

40

【0024】

定義

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上別途明確に指示されない限り、単数及び複数の参照を含む。したがって、例えば、「薬剤」への言及は、単一の薬剤及び複数のかかる薬剤を含む。

50

【 0 0 2 5 】

「クロマチン酵素」という用語は、クロマチン、すなわち、1つ以上のヒストンタンパク質に関連するDNAを切る、切断する、または消化する軽微な能力を超えるデオキシリボヌクレアーゼ酵素のクラスを指す。ヒトDNASE1L3は、クロマチン酵素である。一般に、本明細書に開示される様々なDNASE1L3パリアントは、クロマチン酵素である。すべてのDNASEがクロマチン酵素ではない。例えば、ヒトDNASE1は、クロマチンを切る、切断する、または消化する能力を本質的に有さず、クロマチン酵素ではない。

【 0 0 2 6 】

薬物に関して本明細書で使用される場合、「半減期」は、対象のマトリックス、例えば、血清または血漿で測定される、動物における薬物の濃度の排出半減期を指す。当業者は、すべての薬物が一次動態を示すわけではないこと、または排出のすべての段階で行うわけではないことを理解するであろう。かかる事例では、当業者は、「半減期延長」または「延長した半減期」という用語は、より遅い排出速度を指す表現であることを当業者は理解するであろう。

10

【 0 0 2 7 】

「単離」とは、自然状態から改変または除去されることを意味する。例えば、生体動物において天然に存在する核酸またはペプチドは、「単離」されているのではなく、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドが「単離」されている。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、または例えば、宿主細胞などの非天然環境で存在し得る。

20

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される場合、「好中球細胞外トラップ」及び頭字語「NET」は、核内容物、例えば、プログラムされた様式で免疫細胞、典型的には好中球から放出されるヒストンタンパク質と結合したDNAを含む細胞外線維のネットワークを指す。

【 0 0 2 9 】

別途明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列または核酸」は、互いに縮重した形式であり、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいくつかの形式でイントロン（複数可）を含み得る範囲でイントロンを含み得る。

30

【 0 0 3 0 】

「約」及び「およそ」という用語は、関連する数値の $\pm 10\%$ である量を含む。

【 0 0 3 1 】

「細胞外DNASE」という用語は、DNASE1及びDNASE2ファミリー（例えば、DNASE1(D1)、DNASE1様1(D1L1)、DNASE1様2(D1L2)、DNASE1様3アイソフォーム1(D1L3)、DNASE1様3アイソフォーム2(D1L3-2)、DNASE2A(D2A)、及びDNASE2B(D2B))の細胞外DNASEタンパク質を指す。

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様及び実施形態では、細胞外DNASEまたはそのパリアントは、任意選択で、挿入リンカーによって、アルブミン、トランスフェリン、Fcもしくはエラスチン様タンパク質、またはそのパリアントなどの半減期延長部分に融合される。例えば、US9,458,218を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞外DNASEまたはそのパリアントは、免疫グロブリンヒンジ領域によって二量体化される。例えば、本明細書に記載される操作された酵素は、Fc融合ドメイン（例えば、免疫グロブリンのヒンジ及びCH2ドメイン及びCH3ドメイン）も含み得る。いくつかの実施形態では、DNASE（例えば、D1L3パリアント）は、アルブミンアミノ酸配列またはドメイン、例えば、ヒトアルブミンまたはその断片もしくはパリアントに融合される。例えば、WO2015/066550及びUS9,221

40

50

、896を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。アルブミンは、操作された細胞外DNA SEまたはそのバリエーションのN末端及び/またはC末端に、任意選択で、挿入リンカーを用いてDNA SEと連結することができる。例示的なアルブミンアミノ酸配列は、配列番号39によって提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるD1L3及びD1、またはバリエーションは、Fcヒンジ領域によって一緒に二量体化され、NETを分解するための相乗的機能特性を有する二量体分子を作製する。いくつかの実施形態では、細胞外DNA SEまたはそのバリエーションは、ペプチドリンカーを介してN末端でアルブミンアミノ酸配列と融合される。ペプチドリンカーは、柔軟性リンカー、剛性リンカー、またはいくつかの実施形態では、生理学的に切断可能リンカー（例えば、プロテアーゼ切断可能リンカー）であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、5～100アミノ酸長、または5～50アミノ酸長である。さらに他の実施形態では、リンカーは、細胞外DNA SE及び半減期延長部分（例えば、アルブミン）と共有結合した有機分子、基、ポリマー（例えば、PEG）、または化学部分である。

10

【0033】

いくつかの態様では、本発明は、D1L3バリエーションであって、D1L3バリエーションが、配列番号4の野生型D1L3アイソフォーム1酵素または配列番号5の野生型D1L3アイソフォーム2酵素と比較して、増加したタンパク質安定性、増加した薬物動態曝露及び薬力学的活性の持続時間、タンパク質分解に対する抵抗性、インビトロ発現系でのより高い産生レベル、精製のためのより良好な適合性、ならびに実質的に低くはなく、同一の、またはより良好なクロマチン及び/またはNET分解活性のうちの一つ以上を有する、D1L3バリエーションを提供する。本明細書で使用される場合、反して記載されない限り、「D1L3」という用語は、アイソフォーム1またはアイソフォーム2のいずれかを含む。

20

【0034】

酵素、例えば、D1L3バリエーションのDNA及び/またはクロマチン及び/またはNET分解活性は、例えば、NETを形成するように誘導された精製された核、DNA、またはエクスピボ血液もしくは好中球から得られたDNA、クロマチン、またはNETとの酵素のインキュベーションによって、インビトロで測定することができる。代替的に、酵素、例えば、D1L3バリエーションのDNA及び/またはクロマチン及び/またはNET分解活性は、例えば、酵素を対象に投与することによって、インビボで測定することができ、対象は、細胞外DNA、クロマチン、またはNETを産生するか、または産生するように誘導され、マトリックス中のDNA、クロマチン、またはNETレベルの濃度に対する酵素の効果を、例えば、血清、好ましくは並行陰性対照を用いて、または酵素の投与前及び後の濃度を時間的に比較することによって測定する。

30

【0035】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号4の野生型D1L3アイソフォーム1酵素または配列番号5の野生型D1L3アイソフォーム2酵素と比較して、ほぼ同じクロマチン及び/またはNET分解活性を有する。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号4の野生型D1L3アイソフォーム1酵素または配列番号5の野生型D1L3アイソフォーム2酵素と比較して、より高いクロマチン及び/またはNET分解活性を有する。

40

【0036】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、アルブミンドメイン、任意のリンカー、及びD1L3ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、アルブミンドメイン及び任意のリンカーは、D1L3ドメインのN末端側に位置する。いくつかの実施形態では、アルブミンドメイン及び任意のリンカーは、D1L3ドメインのC末端側に位置する。すべてのかかる実施形態では、任意のリンカーは、アルブミンドメインとD1L3ドメインとの間に挿入される。

【0037】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質のアルブミンアミノ酸配列またはドメインは、配列番号39によって定義される参照アルブミン配列と少なくとも約75%、または少な

50

くとも約 80%、または少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% 同一である。いくつかの実施形態では、アルブミンアミノ酸配列またはドメインは、配列番号 39 によって定義される参照アルブミン配列を含むか、またはそれからなる。様々な実施形態では、アルブミンアミノ酸配列は、新生児の Fc 受容体 (FcRn)、例えば、ヒト FcRn と結合する。アルブミンアミノ酸配列は、野生型 HSA のバリエーション (例えば、配列番号 39 によって表される) であり得る。様々な実施形態では、アルブミンバリエーションは、配列番号 39 に関して、独立して欠失、置換、及び挿入から選択される 1~20 個、または 1~10 個のアミノ酸修飾を有し得る。いくつかの実施形態では、アルブミンアミノ酸配列は、任意の哺乳動物アルブミンアミノ酸配列である。

10

【0038】

いくつかの実施形態では、アルブミンアミノ酸配列またはドメインは、配列番号 39 で表される全長アルブミンの断片である。「断片」という用語は、アルブミンの文脈で使用される場合、それが融合または複合される DNASE 酵素の半減期を、対応する非融合 DNASE と比較して延長する、全長アルブミンまたはそのバリエーションの任意の断片を指す。いくつかの実施形態では、アルブミンの断片は、ドメイン I 及び III、ならびにドメイン II 及び III などのアルブミンの複数のドメインの融合を含むアミノ酸配列を指し得る (例えば、WO2011/124718 を参照されたい)。一般に、アルブミンの断片は、全長配列の少なくとも約 100 個のアミノ酸、または少なくとも約 200 個もしくは少なくとも約 300 個のアミノ酸を有する。様々な実施形態では、アルブミン断片は、ヒト FcRn と結合する能力を維持する。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の D1L3 様ドメインは、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される成熟 D1L3 酵素参照配列と少なくとも約 85%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% 同一である。いくつかの実施形態では、D1L3 ドメインは、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される参照配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、参照配列は、C 末端の 23 個のアミノ酸によって定義される配列番号 4 または 5 の C 末端の塩基性ドメインを含まない。

【0040】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、D1L3 ドメインを含み、D1L3 ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される成熟酵素と少なくとも約 80% 同一である。融合タンパク質は、成熟酵素の N 末端にアルブミンアミノ酸配列またはドメイン、ならびにアルブミンアミノ酸配列と成熟酵素のアミノ酸配列との間の連結アミノ酸配列をさらに含む得る。いくつかの実施形態では、D1L3 ドメインは、配列番号 4 または配列番号 5 によって定義される成熟酵素参照配列と少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、参照配列は、C 末端の 23 個のアミノ酸によって定義される配列番号 4 または 5 の C 末端の塩基性ドメインを含まない。D1L3 ドメインを含む融合タンパク質は、全身療法を含む、改善された循環半減期及び薬力学的効果の持続時間を示す。加えて、アルブミンと連結配列との融合は、アルブミン融合を有しないバリエーションと比較して、インビトロクロマチン分解アッセイを使用して決定されるように、クロマチン分解活性に実質的に影響を及ぼさない (またはいくつかの実施形態では、負の影響を及ぼさない)。

30

40

【0041】

野生型 DNase 酵素との配列同一性を指す場合、特に明記しない限り、配列はシグナルペプチドを欠く成熟酵素を指す。さらに、特に明記しない限り、明確にするために、シグナルペプチドを含む、完全翻訳 DNase 配列に関してアミノ酸位置に番号付けされる。したがって、例えば、配列番号 4 の酵素 (ヒト D1L3、アイソフォーム 1) に対する配列同一性への言及は、N 末端に M21 を有する成熟酵素とのパーセント同一性を指す。同様に、配列番号 1 の酵素 (ヒト D1) に対する配列同一性への言及は、N 末端に L23 を

50

有する成熟酵素とのパーセント同一性を指す。

【0042】

いくつかの実施形態では、D1L3は、C末端塩基性ドメインのすべてまたは一部の欠失を有する。C末端塩基性ドメインは、配列番号4または配列番号5のC末端の23個のアミノ酸として定義される。D1L3のC末端塩基性ドメインの欠失または不活性化は、クロマチン分解活性を実質的に改善する。図1、2、及び4を参照されたい。いくつかの実施形態では、D1L3パリアントは、C末端塩基性ドメインの少なくとも5個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態では、少なくとも10個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態では、少なくとも15個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態では、少なくとも20個のアミノ酸などのC末端塩基性ドメインアミノ酸の欠失を有する。いくつかの実施形態では、D1L3パリアントは、配列番号4または配列番号5のC末端の23個のアミノ酸によって定義されるC末端塩基性ドメイン全体の欠失を有する。例示的なBD欠失には、Q282__S305delinsK（配列番号9を参照されたい）、S305delinsK（配列番号10を参照されたい）、K292__S305del（配列番号11を参照されたい）、及びS293__S305del（配列番号12を参照されたい）が含まれる。いくつかの実施形態では、D1L3ドメインのC末端（BD欠失を有する）は、C末端に、C末端BDと整列せず、インビトロアッセイにおいてクロマチン分解活性に悪影響を及ぼさない1~10個または1~5個のアミノ酸を有する。

10

【0043】

いくつかの実施形態では、D1L3パリアントは、配列番号8~配列番号16から選択される配列のDNA SE1L3ドメイン、配列番号31~配列番号38から選択される配列のリンカー、及び配列番号39の配列または記載されるパリアントまたは断片を有するアルブミンドメインを含む、操作された融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、D1L3パリアントは、PCT/US2018/04708に記載される、D1からの1つ以上の構成要素置換を有し、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0044】

いくつかの実施形態では、D1L3配列またはドメインは、D1からの構成要素置換を含み、それは、M21__R22delinsLK、C24__S25delinsAA、V28__S30delinsIQT、S34T、Q36__V44delinsMSNATLVSY、K47__K50delinsQILS、C52Y、I55__M58delinsIALVQE、I60__K61delinsVR、N64__I70delinsHLTAVGK、M72__K74delinsLDN、R77__I83delinsQDAPD、N86H、I89V、S91__R92delinsEP、T97S、Q101R、A103L、L105V、K107__L110delinsRPDQ、V113__R115delinsAVD、H118Y、H120D、Y122__A127delinsGCEPCGN、V129T、S131N、F135__V136delinsAI、W138R、Q140__H143delinFSRF、A145__D148delinsEVRE、V150A、I152V、T156__T157delinsAA、E159__S161delinsGDA、K163A、E167A、V169__E170delinsYD、T173L、K176__R178delinsQEK、K180__A181delinsGL、N183__F186delinsDVML、P198__A201delinsRPSQ、K203__N204delinsSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220__E221delinsSA、V225__S228delinsATP、N230H、L238__R239delinsVA、Q241__S246delinsMLLRGA、K250D、N252__V254delinsALP、D256N、K259A、K262G、T264__E267delinsSDQL、L269__V271delinsQAI、F275Y、F279__K280delinsVM、Q282__S205delinsKのうち1つ以上から選択でき、前述の置換の各々が、配列番号4に関して番号付けされる。

30

40

【0045】

50

例えば、D1L3バリエーションは、Q282__S305 del ins KのD1からの構成要素置換を有し得、それは、C末端塩基性ドメインの欠失を含み、D1において欠如する。いくつかの実施形態では、D1L3酵素は、配列番号4の101位に対応する位置にアミノ酸置換を有する。置換は、D1からの対応する構成要素に基づくArgであり得るか、またはいくつかの実施形態では、Lysである。この位置での置換は、D1L3のクロマチン分解活性を増強することができる。この位置での他の置換は、同様の特性を示す可能性が高い。

【0046】

存在する場合のリンカーは、柔軟性、剛性、及び切断可能ペプチドリンカーから選択することができる。柔軟性リンカーは、主にまたは完全に、Gly、Ser、及びThrなどの小さい、非極性、または極性残基から構成される。例示的な柔軟性リンカーは、(GlySer)_nリンカーを含み、yは1~10（例えば、1~5）であり、nは1~約10であり、いくつかの実施形態では、3~約6である。例示的な実施形態では、yは2~4であり、nは3~8である。それらの柔軟性のために、これらのリンカーは非構造性である。より剛性なリンカーとしては、ポリプロリンまたはポリPro-Alaモチーフ及び-ヘリックスリンカーが含まれる。例示的な-ヘリックスリンカーは、A(EAAAK)_nAであり、nは、上記で定義されたとおりである（例えば、1~10、または2~6）。一般に、リンカーは、主に、Gly、Ser、Thr、Ala、及びProから選択されるアミノ酸から構成され得る。例示的なリンカー配列は、少なくとも10個のアミノ酸を含み、15~35個のアミノ酸の範囲であり得る。例示的なリンカー設計は、配列番号31~38として提供される。

【0047】

いくつかの実施形態では、バリエーションは、リンカーを含み、リンカーのアミノ酸配列は、主にグリシン及びセリン残基であるか、またはグリシン及びセリン残基から本質的になる。いくつかの実施形態では、リンカーにおけるSer及びGlyの比率は、それぞれ、約1:1~約1:10、約1:2~約1:6、または約1:4である。例示的なリンカー配列は、S(GGS)₄GSS（配列番号36）、S(GGS)_gGSS（配列番号37）、(GGS)_gGSS（配列番号39）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも10個のアミノ酸、または少なくとも15個のアミノ酸、または少なくとも20個のアミノ酸、または少なくとも25個のアミノ酸を有する。例えば、リンカーは、15~30個のアミノ酸の長さを有し得る。様々な実施形態では、少なくとも15個のアミノ酸のより長いリンカーは、*Pichia pastoris*における発現時の収率の改善を提供することができる。図20を参照されたい。さらに、驚くべきことに、より長いリンカー配列は、より短いリンカー配列と比較して、改善されたクロマチン分解活性を示した。図20を参照されたい。

【0048】

様々な実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号17~30のいずれか1つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質である。他の実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号17~30のいずれか1つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質であり、配列番号17~30から選択される参照配列に関して独立して、アミノ酸の挿入、欠失、または置換から選択される1~20個、または1~10個、または1~5個のアミノ酸修飾を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸修飾は、融合タンパク質のD1L3ドメイン、アルブミンドメイン、または両方のドメインにある。いくつかの実施形態では、バリエーションは、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、または配列番号30のアミノ酸配列を有する。これらの実施形態では、アルブミンアミノ酸配列は、D1L3（またはバリエーション）のN末端またはN末端側で、中程度または長い柔軟性リンカーを介して融合される。

【0049】

他の実施形態では、リンカーは、生理学的に切断可能リンカー、例えばプロテアーゼ切断可能リンカーである。例えば、プロテアーゼは、活性化第XII因子などの凝固経路プロ

テアーゼであり得る。特定の実施形態では、リンカーは、第 X I 因子（配列番号 4 2）及び/もしくはプレカリクレイン（配列番号 4 4 または 4 5）のアミノ酸配列、またはその生理学的に切断可能な断片を含む。選択される実施形態では、第 X I 因子からのリンカーアミノ酸配列は、配列番号 4 2 のすべてまたは一部（例えば、第 X I I a 因子による切断を可能にする配列番号 4 2 の修飾を含む配列番号 4 2 の一部）を含む。いくつかの実施形態では、プレカリクレインからのリンカーアミノ酸配列は、配列番号 4 4 のすべてまたは一部（例えば、第 X I I a 因子による切断を可能にする配列番号 4 4 の修飾を含む配列番号 4 4 の一部）を含む。他の実施形態では、リンカーは、好中球エラスターゼ、カテプシン G、及びプロテイナーゼ 3 などの好中球特異的プロテアーゼによる切断のために標的化されるペプチド配列を含む。

10

【 0 0 5 0 】

D 1 L 3 融合タンパク質のいくつかの例示的な実施形態は独立して、本明細書に開示される配列から選択され得る 3 個のアミノ酸配列の組み合わせを含み、かかる配列は、以下のように N 末端から C 末端の順に配置される：

【 0 0 5 1 】

融合 1：配列番号 4、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 2：配列番号 5、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 3：配列番号 8、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 4：配列番号 9、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 5：配列番号 1 0、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

20

融合 6：配列番号 1 1、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 7：配列番号 1 2、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 8：配列番号 1 3、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 9：配列番号 1 4、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 1 0：配列番号 1 5、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 1 1：配列番号 1 6、配列番号 3 1、配列番号 3 9；

融合 1 2：配列番号 4、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 3：配列番号 5、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 4：配列番号 8、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 5：配列番号 9、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

30

融合 1 6：配列番号 1 0、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 7：配列番号 1 1、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 8：配列番号 1 2、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 1 9：配列番号 1 3、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 2 0：配列番号 1 4、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 2 1：配列番号 1 5、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 2 2：配列番号 1 6、配列番号 3 2、配列番号 3 9；

融合 2 3：配列番号 4、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 2 4：配列番号 5、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 2 5：配列番号 8、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

40

融合 2 6：配列番号 9、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 2 7：配列番号 1 0、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 2 8：配列番号 1 1、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 2 9：配列番号 1 2、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 3 0：配列番号 1 3、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 3 1：配列番号 1 4、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 3 2：配列番号 1 5、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 3 3：配列番号 1 6、配列番号 3 3、配列番号 3 9；

融合 3 4：配列番号 4、配列番号 3 4、配列番号 3 9；

融合 3 5：配列番号 5、配列番号 3 4、配列番号 3 9；

50

融合 8 6 : 配列番号 1 4、配列番号 3 8、配列番号 3 9 ;
 融合 8 7 : 配列番号 1 5、配列番号 3 8、配列番号 3 9 ;
 融合 8 8 : 配列番号 1 6、配列番号 3 8、配列番号 3 9 ;
 融合 8 9 : 配列番号 4、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 0 : 配列番号 5、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 1 : 配列番号 8、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 2 : 配列番号 9、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 3 : 配列番号 1 0、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 4 : 配列番号 1 1、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 5 : 配列番号 1 2、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ; 10
 融合 9 6 : 配列番号 1 3、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 7 : 配列番号 1 4、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 8 : 配列番号 1 5、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 9 9 : 配列番号 1 6、配列番号 4 2、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 0 : 配列番号 4、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 1 : 配列番号 5、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 2 : 配列番号 8、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 3 : 配列番号 9、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 4 : 配列番号 1 0、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 5 : 配列番号 1 1、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ; 20
 融合 1 0 6 : 配列番号 1 2、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 7 : 配列番号 1 3、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 8 : 配列番号 1 4、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 0 9 : 配列番号 1 5、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 0 : 配列番号 1 6、配列番号 4 3、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 1 : 配列番号 4、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 2 : 配列番号 5、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 3 : 配列番号 8、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 4 : 配列番号 9、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 5 : 配列番号 1 0、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ; 30
 融合 1 1 6 : 配列番号 1 1、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 7 : 配列番号 1 2、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 8 : 配列番号 1 3、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 1 9 : 配列番号 1 4、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 0 : 配列番号 1 5、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 1 : 配列番号 1 6、配列番号 4 4、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 2 : 配列番号 4、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 3 : 配列番号 5、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 4 : 配列番号 8、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 5 : 配列番号 9、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ; 40
 融合 1 2 6 : 配列番号 1 0、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 7 : 配列番号 1 1、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 8 : 配列番号 1 2、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 2 9 : 配列番号 1 3、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 3 0 : 配列番号 1 4、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 3 1 : 配列番号 1 5、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;
 融合 1 3 2 : 配列番号 1 6、配列番号 4 5、配列番号 3 9 ;

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、シグナルペプチドと合成される。シグナルペプチドは、宿主細胞からの分泌中に除去され得る。例示的なシグナルペプチドは、配列 50

番号 4 ~ 16 及び配列番号 44 ~ 46 に示される。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、成熟タンパク質であり、すなわちシグナルペプチドを欠く。

【0053】

様々な実施形態では、融合タンパク質は、融合タンパク質 1 ~ 132 から選択され、選択された融合タンパク質は、任意選択で、独立してアミノ酸の欠失、挿入、及び置換から選択される最大 20 個（または最大 10 個）のアミノ酸修飾を有し得る。

【0054】

いくつかの態様では、本発明は、製造において利点を有するように操作された細胞外 DNAse 酵素のバリエーションを提供し、治療での使用に好適な組換え酵素の生産を提供し、すでに記載されているように、任意選択で、融合タンパク質の実施形態（アルブミン融合の実施形態を含む）に関連して使用することができる。様々な実施形態では、本発明は、システイン残基の 1 つ以上のアミノ酸置換または欠失を含む組換え D1、D1L1、D1L2、及び D1L3 バリエーションを提供し、タンパク質発現中のジスルフィド架橋を介した分子内及び分子間の架橋の低減をもたらす。例えば、DNAse バリエーションは、野生型配列に存在する 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのシステイン残基を欠くことができる（例えば、1 つ、2 つ、もしくは 3 つのシステイン残基が欠失される）、または他のアミノ酸（複数可）で置換されたかかするシステイン（複数可）のうち 1 つ以上を有する。いくつかの実施形態では、1 つ以上のシステイン残基は独立して、Ala、Gly、及び Ser から選択されるアミノ酸で置換されるか、またはシステイン残基のうち 1 つ以上は、構成要素置換の一部として置換される。いくつかの実施形態では、置換される 1 つ以上のシステイン残基は、D1 タンパク質ファミリーの他のメンバー（例えば、D1、D1L1、D1L2、及び D1L3）間で保存されない。いくつかの実施形態では、操作された酵素は、野生型酵素と比較して、増加したタンパク質安定性、増加したプロテアーゼによる分解に対する抵抗性、増加した生物学的利用率、ならびに実質的に同じまたはより良い DNA 及び / またはクロマチン及び / または NET 分解活性（インビトロまたはインビボ）をもたらす D1 タンパク質ファミリーの別のメンバーからの少なくとも 1 つの構成要素置換及び / または他の点変異を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、置換及び / または修飾は、他の修飾の中でも、システイン残基における単一の修飾のみを含む。いくつかの実施形態では、単一のシステイン残基の除去は、製造における重要な利点のために十分である。

【0055】

他の態様では、本発明は、インビボ半減期を改善し、組換え酵素産生中のタンパク質分解を低減するために、プロテアーゼ耐性において利点を有するように操作された細胞外 DNAse 酵素のバリエーションを提供する。本開示は、例えば、プラスミン、トロンピン、及び / またはトリプシンによるタンパク質分解に感受性のある D1L3 残基、ならびに哺乳動物及び非哺乳動物細胞株によって産生されるプロテアーゼに感受性のある残基（例えば、対塩基性アミノ酸）を特定する。

【0056】

本明細書に記載される組換え細胞外 DNAse バリエーションは、システイン残基における置換、プロテアーゼ感受性残基における置換を含む点変異の組み合わせを有し得、及び / または 1 つ以上の要素置換を含み得る。構成要素タンパク質操作（BBPE）は、PCT / US 18 / 47084 及び US 62 / 800,790 に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。BBPE は、ドナー及びレシピエント細胞外 DNAse 酵素のタンパク質 - タンパク質アライメントを提供すること、及び移行のための可変アミノ酸配列（「構成要素」）を特定することを伴う。可変アミノ酸（複数可）は、ドナー及びレシピエント細胞外 DNAse 酵素（構成要素の上流及び下流）における 1 つ以上の保存されたアミノ酸に隣接している。これらの構築要素は、キメラ酵素を生成するために、レシピエントタンパク質とドナータンパク質との間で交換することができる。

【0057】

他の態様では、本発明は、細胞外 DNAse タンパク質の組換え産生のための方法を提供

10

20

30

40

50

し、本明細書に記載されるそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、方法は、*Pichia pastoris*などの非哺乳動物発現系を利用する。いくつかの実施形態では、*Pichia pastoris*は、宿主細胞からの分泌を可能にする天然シグナルペプチドを有するDNAse酵素をコードする。いくつかの実施形態では、発現系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞発現系である。いくつかの実施形態では、活性に不要なシステイン残基を除去することにより、本発明は、分子間及び分子内ジスルフィド結合を回避する。そうしなければ、結合が形成されて組換え生産を妨げる。いくつかの実施形態では、誤った分子間及び分子内ジスルフィド結合の実質的な低減は、単一のシステイン残基の置換によって達成され得る。

【0058】

いくつかの実施形態では、組換え発現系は、対塩基性アミノ酸で切断する1つ以上のプロテアーゼの欠失または不活性化を有する。例示的な酵素としては、フーリン（CHO細胞によって発現される）、ならびに*Pichia pastoris*によって発現されるアスパラギン酸プロテイナーゼ3（Ysp1）及びケキシン（Kex2）が含まれる。いくつかの実施形態では、これらの酵素は、遺伝子的に欠失または不活性化されないが、組換えタンパク質産生中に、それらの活性がプロテアーゼ阻害剤で阻害される。

【0059】

いくつかの実施形態では、非哺乳動物発現系または哺乳動物発現系についての成長培地は、デキストラン硫酸、ヘパリン、クエン酸第二鉄、EDTAなどのポリアニオンで補充される。さらなる実施形態では、*Pichia pastoris*または他の発現系の成長培地は、5kDa~100kDaの平均分子量を有するデキストラン硫酸で補充される。いくつかの実施形態では、デキストラン硫酸は、約10kDa以下、または約20kDa以下、または約30kDa以下、または約40kDa以下、または約50kDa以下、または約75kDa以下、または約100kDa以下の平均分子量を有する。様々な実施形態では、ポリアニオンは、産生された組換えタンパク質と複合体化するのに十分な量で培養物に追加される。

【0060】

いくつかの実施形態では、非哺乳動物発現系または哺乳動物発現系の培養培地からの組換え細胞外DNAseタンパク質及びそのバリエーションは、デキストラン硫酸、ヘパリン、EDTAなどのポリアニオンからの組換え細胞外DNAseタンパク質及びバリエーションの分離を含む方法を通じて精製される。特定の実施形態では、精製方法は、トリエチルアミノエチルなどの強力なアニオン交換樹脂を含む。いくつかの実施形態では、本方法に従って産生される細胞外DNAseタンパク質は、D1L3またはそのバリエーションである。

【0061】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号4（ヒトD1L3、アイソフォーム1）または配列番号5（ヒトD1L3、アイソフォーム2）によって定義される酵素と少なくとも80%同一であり、タンパク質分解、例えばインビボタンパク質分解に感受性である、システイン残基の1つ以上の置換及び/またはアミノ酸の1つ以上の置換を有する、アミノ酸配列を含むD1L3バリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、D1L3タンパク質バリエーションは、配列番号4または配列番号5の野生型D1L3タンパク質と比較して、増加したタンパク質安定性（例えば、プロテアーゼ抵抗性）、インビトロ発現系での高い産生レベル、及び/または実質的に低くはなく、同一の、またはより良好なクロマチン及び/またはNET分解活性をもたらす1つ以上の追加の修飾を含む。例えば、D1L3バリエーションは、PCT/US2018/47084（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示される少なくとも1つの追加の構成要素置換もしくは点変異を含み得るか、またはプロテアーゼ抵抗性を増加させるために本明細書に記載される1つ以上の置換を含み得る。

【0062】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、Cys68の置換を有し、任意選択で、Ala、Ser、及びGlyから選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、このバリエーションは、置換 N 6 4 __ I 7 0 d e l i n s H L T A V G K を含む。いくつかの実施形態では、配列 H L T A V G K は、C y s 残基が含まれないことを条件として、1つ、2つ、もしくは3つの置換、欠失、及び/または挿入(合わせて)によってさらに修飾され得る。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、参照配列番号 4 または配列番号 5 と少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、非対システインであると考えられる C y s 6 8 に対応する位置に複合されたポリエチレングリコール (P E G) 部分を有する D 1 L 3 酵素を提供する。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、C 1 9 4 に対応するアミノ酸との P E G 複合を有する。これらの実施形態では、P E G 部分は、ジスルフィドスクランブル及び/またはタンパク質ミスフォールディングを回避しながら、半減期延長特性を提供する。いくつかの実施形態では、P E G 部分は、穏やかな条件下で行うことができるマレイミド化学を通して複合される。ビニルスルホン、ジチオピリジン、及びヨードアセトアミド活性化化学などの他の複合化学が既知であり、使用することができる。P E G 部分は、直鎖状または分枝状であり得、概して 1 0 k D a ~ 4 0 k D a の範囲、または 2 0 ~ 3 0 k D a の範囲であり得る。

【 0 0 6 4 】

代替的に、または加えて、本発明は、プロテアーゼ抵抗性の増加をもたらす 1 つ以上の置換アルギニン及び/またはリジン残基を含む、D 1 L 3 バリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、配列番号 4 の K 1 8 0、K 2 0 0、K 2 5 9、及び/または R 2 8 5 に対応する 1 つ以上の位置に置換を有する。本開示によれば、かかるリジン及びアルギニン残基は、潜在的なプロテアーゼ感受性部位として特定される。したがって、これらの残基のうち 1 つ以上(例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ)は独立して、A l a、G l y、L e u、I l e、V a l、T h r、S e r、及び P r o から選択される残基などの非荷電残基で修飾され得る。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ感受性リジンまたはアルギニン残基は、構成要素置換の一部として置換される。例えば、D 1 L 3 バリエーションは、K 1 8 0 __ A 1 8 1 d e l i n s G L、P 1 9 8 __ A 2 0 1 d e l i n s R P S Q、及び K 2 5 9 A から選択される 1 つ以上の置換を含み得る。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、K 1 8 0 __ A 1 8 1 d e l i n s G L、及び/または P 1 9 8 __ A 2 0 1 d e l i n s R P S Q の置換の一方または両方を含み、そのいずれも、構成要素置換が、R または K 残基での置換または挿入によって修飾されないことを条件として、任意選択で、1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、欠失、または挿入によって修飾される。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、プラスミン、トロンピン、及び/またはトリプシンから選択される 1 つ以上のプロテアーゼによるタンパク質分解に対する増加した抵抗性を有する。

【 0 0 6 5 】

代替的に、または加えて、D 1 L 3 バリエーションは、対塩基性残基の 1 つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、対塩基性残基は、配列番号 4 の K 5 0 / R 5 1、R 8 0 / R 8 1、K 1 1 4 / R 1 1 5、K 1 9 9 / K 2 0 0、K 2 2 6 / K 2 2 7、K 2 9 1 / K 2 9 2、R 2 9 7 / K 2 9 8 / K 2 9 9、及び K 3 0 3 / R 3 0 4 から選択される位置に対応する。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、配列番号 4 の R 1 1 4 T、R 1 1 4 A、R 1 1 4 D、R 1 1 4 Q、K 2 2 7 S、及び K 2 2 7 E に対応する置換から選択される 1 つ以上の置換を有する。いくつかの実施形態では、対塩基性残基の 1 つ以上の変異には、R 5 1 K、R 8 1 K、R 1 1 5 K、及び R 3 0 4 K に対応するアミノ酸置換が含まれる。いくつかの実施形態では、対塩基性残基は、対応する構成要素置換を使用して置換される。これらの実施形態によれば、D 1 L 3 バリエーションは、組換えタンパク質発現系(例えば、C H O 及び P i c h i a p a s t o r i s) によって発現されるプロテアーゼに対してより抵抗性があるであろう。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、本発明は、システイン残基の1つ以上の置換を有する、配列番号1によって定義される酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むD N a s e 1 (D1)バリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、D1タンパク質バリエーションは、配列番号1の野生型D1タンパク質と比較して、増加したタンパク質安定性、インビトロ発現系での高い産生レベル、及び/または実質的に低くはなく、同一の、またはより良好なクロマチン及び/またはNET分解活性をもたらす1つ以上の追加の修飾を有する。例えば、D1バリエーションは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、P C T / U S 2 0 1 8 / 4 7 0 8 4 に開示される少なくとも1つの追加の構成要素置換もしくは点変異を含み得る。

【0067】

いくつかの実施形態では、D1バリエーションは、C123及びC126のうち的一方または両方の置換を有し、任意選択で、A l a、S e r、及びG l yで置換される。いくつかの実施形態では、D1バリエーションは、置換G122__N128 d e l i n s Y Q G D Aを含む。いくつかの実施形態では、D1バリエーションは、配列番号1と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、本発明は、C123及び/またはC126に対応する位置に複合されたP E G部分を有するD1酵素を提供する。これらの実施形態では、P E G部分は、ジスルフィドスクランブル及び/またはタンパク質ミスフォールディングを回避しながら、半減期延長特性を提供する。いくつかの実施形態では、P E G部分は、穏やかな条件下で行うことができるマレイミド化学を通して複合される。ビニルスルホン、ジチオピリジン、及びヨードアセトアミド活性化化学などの他の複合化学が既知であり、使用することができる。P E G部分は、直鎖状または分枝状であり得、概して10 k D a ~ 40 k D aの範囲、または20 ~ 30 k D aの範囲であり得る。

【0069】

他の態様では、本発明は、1つ以上の置換システイン残基を有する、配列番号2によって定義される酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むD1L1バリエーションを提供する。システイン残基(複数可)は、任意選択で、D1ファミリー(例えば、C22及び/またはC50)内で非保存性であり、任意選択で、G l y、A r g、もしくはS e rで置換されるか、または構築要素置換の一部として置換される。いくつかの実施形態では、D1L1バリエーションは、配列番号2と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、本発明は、C22及び/またはC50に対応する位置に複合されたP E G部分を有するD1L1酵素を提供する。これらの実施形態では、P E G部分は、ジスルフィドスクランブル及び/またはタンパク質ミスフォールディングを回避しながら、半減期延長特性を提供する。いくつかの実施形態では、P E G部分は、穏やかな条件下で行うことができるマレイミド化学を通して複合される。ビニルスルホン、ジチオピリジン、及びヨードアセトアミド活性化化学などの他の複合化学が既知であり、使用することができる。P E G部分は、直鎖状または分枝状であり得、概して10 k D a ~ 40 k D aの範囲、または20 ~ 30 k D aの範囲であり得る。

【0071】

いくつかの態様では、本発明は、1つ以上の置換システイン残基を有する、配列番号3によって定義される酵素と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むD1L2バリエーションを提供する。システイン残基は、D1ファミリー(例えば、C43)内で非保存性であり得、任意選択で、G l y、A r g、もしくはS e rで置換されるか、または構築要素置換の一部として置換される。いくつかの実施形態では、D1L2バリエーションは、配列番号3と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0072】

いくつかの実施形態では、本発明は、C43に対応する位置に複合されたPEG部分を有するD1L2酵素を提供する。これらの実施形態では、PEG部分は、ジスルフィドスクランブル及び/またはタンパク質ミスフォールディングを回避しながら、半減期延長特性を提供する。いくつかの実施形態では、PEG部分は、穏やかな条件下で行うことができるマレイミド化学を通して複合される。ビニルスルホン、ジチオピリジン、及びヨードアセトアミド活性化化学などの他の複合化学が既知であり、使用することができる。PEG部分は、直鎖状または分枝状であり得、概して10kDa~40kDaの範囲、または20~30kDaの範囲であり得る。

【0073】

他の態様では、本発明は、本明細書に開示されるD1、D1L1、D1L2、またはD1L3バリエーションをコードする単離ポリヌクレオチド、ならびにベクター及び宿主細胞を提供する。宿主細胞は、*Pichia pastoris*などの非哺乳動物であるか、またはCHO細胞などの哺乳動物であるかを問わず、細菌または真核生物を含む任意の発現系の細胞であり得る。

10

【0074】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの送達は、治療に使用される。コード化ポリヌクレオチドは、既知の手順、例えば、電気穿孔法もしくは細胞スクイーミング、及び/またはベクター(ウイルスベクターを含む)を使用して、mRNAとして、またはDNA構築物として送達することができる。mRNAポリヌクレオチドは、自然免疫系の活性化を回避するための既知の修飾(mmRNA)を含むことができる。WO2014/028429号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、対象の身体に送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、インビトロで細胞内に送達され、細胞は、対象の身体に送達される。細胞は、例えば、白血球(例えば、T細胞またはマクロファージ)、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、または幹細胞であり得る。

20

【0075】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載される細胞外DNASEバリエーションを産生するための方法を提供する。本方法は、細胞外DNASEをコードするポリヌクレオチドを発現する細胞を培養することと、組換えDNaseタンパク質を回収することと、を含む。細胞は、原核性または真核性であり得る。いくつかの実施形態では、DNaseは、任意選択で、*Pichia pastoris*または*Saccharomyces*種などの非哺乳動物発現系を使用して発現される。いくつかの実施形態では、CHO細胞などの哺乳動物発現系が使用される。

30

【0076】

本発明は、本明細書に記載される細胞外DNASEもしくはそのバリエーション、または任意選択で、記載されるポリヌクレオチドもしくはベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物をさらに提供する。

【0077】

ベクターは、一般に、単離された核酸を含み、これを使用して、単離された核酸を細胞の内部に送達することができる。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルスを含むがこれらに限定されない、多数のベクターが当該技術分野で既知である。例示的なベクターには、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスが含まれる。この用語はまた、例えば、ポリリジン化合物、リポソーム等の、核酸の細胞への移入を促進する非プラスミド及び非ウイルス化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが含まれる。

40

【0078】

薬学的組成物は、局所、非経口、または肺投与を含む任意の投与経路のために製剤化する

50

ことができる。様々な実施形態では、組成物は、皮内、筋肉内、腹腔内、関節内、静脈内、皮下、動脈内、経口、舌下、肺、または経皮投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は静脈内または皮下投与のために製剤化される。

【0079】

他の態様では、本発明は、細胞外DNA分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ(ET)分解、及び/または好中球細胞外トラップ(NET)分解を必要とする対象を治療するための方法を提供する。本方法は、治療有効量の本明細書に記載される細胞外DNA S Eもしくはそのバリエーション、または組成物を投与することを含む。対象が細胞外DNAまたはクロマチン分解(ETまたはNET分解を含む)を必要とする例示的な適応症は、PCT/US18/47084に開示されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、方法が、治療有効量の配列番号8~配列番号30の配列のいずれか1つによって表されるタンパク質を投与することを含む、それを必要とする対象を治療するための方法を提供する。

10

【0080】

対象を治療するための方法が記載される各例において、本発明は同様に、ET及び/またはNETに関連する疾患の治療または予防のための細胞外DNA S Eタンパク質のうちの1つ以上の使用を提供する。

【0081】

様々な実施形態では、本発明は、NETの存在もしくは蓄積を特徴とする疾患または状態を治療、予防、または管理するための方法を提供する。かかる疾患または状態には、これらに限定されないが、慢性好中球増加、好中球凝集及び白血球停滞、血栓症及び血管閉塞、虚血再灌流障害、外科的及び外傷性組織損傷、急性もしくは慢性炎症性反応または疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、代謝疾患、全身性炎症、呼吸器の炎症性疾患、腎炎症性疾患、移植組織に関連する炎症性疾患(例えば、移植片対宿主疾患)、ならびにがん(白血病を含む)に関連する疾患が含まれる。

20

【0082】

特定の実施形態では、本発明は、D1L3の欠損もしくはD1の欠損を特徴とする疾患または状態の治療に関する。いくつかの事例では、対象は、Dnase1l3遺伝子またはDnase1遺伝子に変異(例えば、機能喪失変異)を有する。かかる対象は、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)(ループス腎炎を含む)、強皮症または全身性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む)、及び蕁麻疹性血管炎)を示し得る。いくつかの事例では、対象は、D1(例えば、抗Dnase1抗体及びアクチン)、及び/またはD1L3(例えば、抗Dnase1l3抗体)の後天性阻害因子を有する。かかる対象はまた、自己免疫疾患または炎症性疾患(例えば、SLE、全身性硬化症)を有し得る。

30

【0083】

いくつかの実施形態では、対象は、管系を閉塞するNETを有するか、またはその危険性がある。例えば、本明細書に開示されるDNA S E酵素は、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、乾性眼疾患、血管閉塞、または腎疾患を治療するために対象に投与することができる。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、対象は、内皮表面(例えば、外科的癒着)、皮膚(例えば、創傷/瘢痕)、または滑膜関節(例えば、痛風及び関節炎、例えば、関節リウマチ)上に蓄積するNETを有するか、またはその危険性がある。本明細書に記載されるDNA S E酵素は、外科用癒着などであるがこれらに限定されない内皮表面上のNETの蓄積を特徴とする状態を治療するために対象に投与することができる。

【0085】

本明細書に開示されるDNA S E酵素を使用して治療または予防することができるNETに関連する他の疾患及び状態としては、ANCA関連血管炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、好中球性皮膚症、皮膚筋炎、火傷、蜂巣炎、髄膜炎、脳炎、中耳炎、咽頭炎、扁桃炎、肺

50

炎、心内膜炎、膀胱炎、腎盂腎炎、虫垂炎、胆嚢炎、膵炎、ブドウ膜炎、角膜炎、播種性血管内凝固症候群、急性腎障害、急性呼吸窮迫症候群、ショック肝臓、肝腎症候群、心筋梗塞、脳卒中、虚血性腸、四肢虚血、精巢捻転、子癇前症、子癇、及び固形臓器移植（例えば、腎臓、心臓、肝臓、及び/または肺移植）が含まれる。さらに、本明細書に開示されるDNAse酵素は、例えば、皮膚に局所的に適用することによって、その危険性がある個体、例えば、外科的切開、裂傷、または火傷を有する個体において癒痕または拘縮を予防するために使用され得る。

【0086】

様々な実施形態では、対象は、D1及びストレプトドルナーゼを含む野生型DNAseで治療されたか、または治療されている疾患を有する。かかる疾患または状態としては、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝障害、心内膜炎、肝感染症、膵炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流、腎臓障害、血液凝固、アルム誘発性炎症、肝腎損傷、胸膜滲出、血胸、胆管内血栓、空気圧貧血後、潰瘍、耳鼻咽喉科疾患、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊症、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルタゲナー症候群、喘息、大葉性無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、狼瘡、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、乾性眼疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、閉塞性肺疾患が含まれる。

10

【0087】

本発明の他の態様及び実施形態は、以下の実施例から明らかとなるであろう。

20

【実施例】

【0088】

すべての生物学的製剤のおよそ70%は、チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞を使用して産生されている。実際に、野生型DNAse1（D1；ドルナーゼアルファ）は典型的にはCHO細胞内で産生される。CHO細胞を使用した細胞株の開発及び大規模産生において顕著な利点があるにもかかわらず、かなりの変動性、及び細胞成長特性を予測またはモデル化するための信頼できる方法がないため、DNAse酵素の産生において依然として顕著な課題がある。重要なことに、CHO細胞は、D1の活動亢進バリエーションを安定して産生することができず、臨床的製造を妨げ、本開示以前では、DNAse1様3（D1L3）を含む他のDNAse1タンパク質ファミリーメンバーの製造特性は不明であった。

30

【0089】

CHO及び微生物発現系を使用して、D1L3の製造における、低産生収率、タンパク質分解、タンパク質ミスフォールディング、ならびに誤ったまたは望ましくないグリコシル化を含む、いくつかの課題を特定した。本開示は、製造におけるこれら及び他の課題に対する技術的解決策を提供し、それはまた、D1L3の治療特性を改善することができる。

【0090】

実施例1：チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞及び*Pichia pastoris*における、塩基性ドメイン欠失（BDD）を有するD1L3の発現及び特徴付け
DNAse1及びDNAse1L3はそれぞれ、無タンパク質性DNA及びDNA-ヒストン複合体（すなわち、クロマチン）を優先的に切断する。以前の研究では、DNAse1において欠如する、DNAse1L3のC末端の塩基性ドメイン（BD）が、両方の酵素の異なる基質特異性に関与することが示唆されている（Sisirak et al., Cell, 2016; Keyel, Developmental Biology, 2017）。

40

【0091】

構成要素タンパク質工学と称されるタンパク質工学技術は、PCT/US18/47084及びUS62/800,790に記載されており、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。このアプローチをDNAse1及びDNAse2タンパク

50

質ファミリーのメンバーに適用することができる。本方法は、ドナー及びレシピエント D n a s e 酵素のタンパク質 - タンパク質アライメントを提供する；可変アミノ酸が、ドナー及びレシピエント D n a s e 酵素における1つ以上の保存されたアミノ酸に隣接する、移行のための可変アミノ酸配列を特定する；レシピエント D n a s e の可変アミノ酸をドナー D n a s e の可変アミノ酸で置き換えてキメラ D n a s e を作製する；及びキメラ D n a s e を組み換えて産生する、ステップに基づく。

【0092】

クロマチン分解活性（「クロマチン酵素」活性）を担うアミノ酸を特徴付けるために、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 4 7 0 8 4 に開示されるように、野生型 D 1 L 3 を D 1 からの構成要素置換で置換した。D 1 L 3 への構成要素置換は、ヒト D 1 から選択され、配列番号 4 に関して、M 2 1 _ _ R 2 2 d e l i n s L K、C 2 4 _ _ S 2 5 d e l i n s A A、V 2 8 _ _ S 3 0 d e l i n s I Q T、S 3 4 T、Q 3 6 _ _ V 4 4 d e l i n s M S N A T L V S Y、K 4 7 _ _ K 5 0 d e l i n s Q I L S、C 5 2 Y、I 5 5 _ _ M 5 8 d e l i n s I A L V Q E、I 6 0 _ _ K 6 1 d e l i n s V R、N 6 4 _ _ I 7 0 d e l i n s H L T A V G K、M 7 2 _ _ K 7 4 d e l i n s L D N、R 7 7 _ _ I 8 3 d e l i n s Q D A P D、N 8 6 H、I 8 9 V、S 9 1 _ _ R 9 2 d e l i n s E P、T 9 7 S、Q 1 0 1 R、A 1 0 3 L、L 1 0 5 V、K 1 0 7 _ _ L 1 1 0 d e l i n s R P D Q、V 1 1 3 _ _ R 1 1 5 d e l i n s A V D、H 1 1 8 Y、H 1 2 0 D、Y 1 2 2 _ _ A 1 2 7 d e l i n s G C E P C G N、V 1 2 9 T、S 1 3 1 N、F 1 3 5 _ _ V 1 3 6 d e l i n s A I、W 1 3 8 R、Q 1 4 0 _ _ H 1 4 3 d e l i n F S R F、A 1 4 5 _ _ D 1 4 8 d e l i n s E V R E、V 1 5 0 A、I 1 5 2 V、T 1 5 6 _ _ T 1 5 7 d e l i n s A A、E 1 5 9 _ _ S 1 6 1 d e l i n s G D A、K 1 6 3 A、E 1 6 7 A、V 1 6 9 _ _ E 1 7 0 d e l i n s Y D、T 1 7 3 L、K 1 7 6 _ _ R 1 7 8 d e l i n s Q E K、K 1 8 0 _ _ A 1 8 1 d e l i n s G L、N 1 8 3 _ _ F 1 8 6 d e l i n s D V M L、P 1 9 8 _ _ A 2 0 1 d e l i n s R P S Q、K 2 0 3 _ _ N 2 0 4 d e l i n s S S、R 2 0 8 W、D 2 1 0 S、R 2 1 2 T、V 2 1 4 Q、G 2 1 8 P、Q 2 2 0 _ _ E 2 2 1 d e l i n s S A、V 2 2 5 _ _ S 2 2 8 d e l i n s A T P、N 2 3 0 H、L 2 3 8 _ _ R 2 3 9 d e l i n s V A、Q 2 4 1 _ _ S 2 4 6 d e l i n s M L L R G A、K 2 5 0 D、N 2 5 2 _ _ V 2 5 4 d e l i n s A L P、D 2 5 6 N、K 2 5 9 A、K 2 6 2 G、T 2 6 4 _ _ E 2 6 7 d e l i n s S D Q L、L 2 6 9 _ _ V 2 7 1 d e l i n s Q A I、F 2 7 5 Y、F 2 7 9 _ _ K 2 8 0 d e l i n s V M、Q 2 8 2 _ _ S 2 0 5 d e l i n s K の変異を特徴とするヒト D 1 L 3 のバリエーションをもたらす。

【0093】

これら63個のD 1 L 3 バリエーションを、クロマチン分解活性の喪失または増加についてスクリーニングした。簡潔には、インビトロ発現ベクターを使用して、D 1 L 3 バリエーションをCHO細胞内で一過性に発現させた。培養上清を収集し、精製した核をクロマチン源として使用してクロマチン分解活性について試験した。図1に示すように、D 1 からの構成要素置換# 17及び# 63は、野生型D 1 L 3と比較して、高分子量(HMW)クロマチンの小断片への分解を有意に改善した。構成要素置換# 7はミスセンス変異Q 1 0 1 Rを引き起こし、101位のグルタミンをアルギニンに置き換える(配列番号8)。構成要素置換# 63は、変異Q 2 8 2 _ _ S 3 0 5 d e l i n s Kを引き起こし、D 1 L 3の完全なC末端BDをアミノ酸283~305位から欠失させ、282位のグルタミン(Q)をリジンに置き換える(配列番号9)。次に、上清のウエスタンブロット分析を行い、野生型D 1 L 3及び両方の変異の発現レベルを検出した(図2)。驚いたことに、野生型D 1 L 3及びQ 1 0 1 R変異を有する試料において、異なるサイズの2つのD 1 L 3 バリエーションを検出した。Q 2 8 2 _ _ S 3 0 5 d e l i n s Kを有する試料は、より小さいD 1 L 3 バリエーションのみを含んだ。データは、野生型D 1 L 3のBDが、CHO細胞での発現中または分泌後に自発的に除去される(例えば、タンパク質分解される)ことを示唆する。2つのD 1 L 3 バリエーションはまた、WT - D 1 L 3を安定して発現するCHO細胞からの上清中で検出した(図3)。注目すべきことに、塩基性ドメイン欠失D 1 L 3(BDD - D 1 L 3)は、野生型D 1 L 3と比較して、実質的に増加したクロマチン酵素活性を示した。

【0094】

次に、CHO細胞に対する代替の微生物発現系としての *Pichia pastoris* を試験した。一般に、野生型 D1L3 と比較した場合、BDD-D1L3 でより高い発現レベルを観察した。ここでは、*Pichia pastoris* 発酵上清から野生型 D1L3 及び BDD-D1L3 を精製し、特徴付けする(図4)。予期せぬことに、野生型 D1L3 は、アミノ酸 K291 位、K291 位、または S293 位において BD 内でタンパク質分解的に切断され、精製後に D1L3 パリアントの異種混合物が生じることを観察した。野生型 D1L3 とは異なり、3つの構成要素置換(F275Y、F279_K280 del ins VM、Q282_S205 del ins K)による BDD-D1L3 の発現は、純粋なタンパク質を生成した。

10

【0095】

次に、両方の D1L3 精製のクロマチン酵素活性を比較した。K291、K291、または S293 位での BD 切断を有する D1L3 パリアントの異種混合は、F275Y/F279_K280 del ins VM/Q282_S205 del ins K による完全な BD 欠失を有する D1L3 パリアントと比較して、およそ 10 倍低いクロマチン酵素活性を有することを観察した。まとめると、データは、BD のタンパク質分解切断が微生物及び哺乳動物発現系(すなわち、CHO 及び *P. pastoris*)において自然に生じることができ、BD の除去が D1L3 活性を活性化してクロマチンを分解するようにして現れることを示す。

20

【0096】

実施例 2: バイオリクターにおける CHO 細胞の D1L3 の発現

野生型 D1L3 (配列番号 4) を産生する安定な CHO 細胞株の開発を本明細書に開示する。細胞株を、標準的な CHO 培養培地を使用してバイオリクターで培養した。詳細には、図 5 は、cGMP 適合条件下でバイオリクターにおいて CHO 細胞によって発現及び分泌されたヒト D1L3 のウエスタンブロットを示す。試料を異なる時点(t1~t3)で収集した。わずかなレベルの D1L3 及び D1L3 断片のみを検出した。データは、D1L3 の低い生産収率が D1L3 の製造における課題であることを示唆する。

30

【0097】

本明細書に開示されるように、野生型 D1L3 の高い生産レベルは、培養培地へのポリアニオンの追加によって達成した。かかるポリアニオンは、ヘパリン、デキストラン硫酸、クエン酸第二鉄、及びエチレンジアミン四酢酸のうちの一つ以上を含み得、「抗細胞凝集試薬」中の生物学的に活性な成分を表す。詳細には、CHO 培養培地にデキストラン硫酸を追加し、D1L3 及び D1L3 断片の強い増加を観察した(図5)。データは、ポリアニオンが D1L3 の生産収率を増加させたが、タンパク質分解を防止しなかったことを示す。

40

【0098】

図 6A は、デキストラン硫酸(DS)などのポリアニオンが D1L3 と複合体を形成することを示す。D1L3-D1L3 複合体は、生産プロセス中に負に帯電した表面により D1L3 の相互作用及び除去が防止される。かかる負に帯電した表面には、これらに限定されないが、産生細胞(例えば、CHO 細胞、*Pichia pastoris*、*Saccharomyces* 種)の細胞表面、染色細胞によって曝露された DNA、及びバイオリクター表面を含む。図 6B 及び図 6C は、DS-D1L3 複合体からの D1L3 の 2 段階精製プロセスを示す。図 6 に示すように、第 1 のステップは、DS-D1L3 複合体を解離することを目的とする。解離は、DS-D1L3 複合体を強力なアニオン交換表面とインキュベートすることによって達成することができ、これは DS と結合し、したがって D1L3 を遊離する。詳細には、精製プロセスは、DS-D1L3 を含む培養培地を強力なアニオン交換樹脂で満たされたクロマトグラフィカラムに通し、続いて、DS フリー D1L3 を含有するフロースルーの収集を含むことができる。精製プロセスの第 2 のステップを図 6C に示し、強力なカチオン交換樹脂の適用を介した DS フリーフローからの D1L3 の親和性精製を含む。結論として、D1L3 の生産収率は、デキストラン硫酸などのポリ

50

アニオンの追加によって大幅に増加させることができる。

【0099】

実施例3：プロテアーゼ抵抗性について操作したD1L3

野生型D1L3は、50個のアルギニン及びリジン残基を含み、これにより、酵素はトリプシン、トロンピン、及びプラスミンなどのプロテアーゼに特に感受性となる。この実施例では、トリプシン及びプラスミン切断部位をD1L3において特定した。部位は、D1L3のプロテアーゼ抵抗性パリアントを生成するように変異させることができる。

【0100】

簡潔には、精製したD1L3をトリプシンで消化した。D1L3断片を単離し、液体クロマトグラフィ(LC)及び質量分析(MS)の組み合わせを使用して断片のアミノ酸配列を決定した。トリプシンが、R22、R29、R51、R66、R80、R81、R95、K99、R115、K147、K163、K180、R208、R212、R235、R239、K250、及びK262のアルギニン及びリジン残基でD1L3を切断したことを特定した。これらのアルギニン及びリジン残基は、アラニン、バリン、及びセリンなどの小アミノ酸で置換され得るか、またはグランサム距離スコアに従って同様の特性を有するアミノ酸で置換され得る(例えば、ヒスチジン、グルタミン、及びグルタミン酸; 図7)。プロテアーゼ抵抗性であるD1は、R51、R95、K99、及びR235に対応するアルギニン及びリジン残基を特徴とし、これらの残基が主にD1L3のタンパク質分解に関与しないことを示唆する。

【0101】

構成要素タンパク質工学を適用して、R22(変異: M21__R22delinsLK)、R29(V28__S30delinsIQT)、R66(N64__I70delinsHLTAVGK)、R80(R77__I83delinsQDAPD)、R81(R77__I83delinsQDAPD)、R115(V113__R115delinsAVD)、K163(K163A)、K180(K180__A181delinsGL)、R208(R208W)、MR212(R212T)、R239(L238__R239delinsVA)、K250(K250D)、及びK262(K262G)の構成要素をD1から移行し、トリプシン切断部位を含むD1L3の構成要素を置き換えた(図7)。

【0102】

プラスミンは、その酵素前駆体プラスミノーゲンの活性化によって生成される血漿プロテアーゼである。プラスミノーゲン活性化因子阻害剤1(PAI-1)は、プラスミンの活性化を阻害する。興味深いことに、PAI-1は、血清中のD1L3の酵素活性を増加させ、プラスミンがD1L3をタンパク質分解的に不活性化し得ることを示唆する。しかしながら、D1L3におけるプラスミン切断部位は特定されていない。

【0103】

コンピューター分析では、アミノ酸の組み合わせリジン-アラニン(KA)またはアルギニン-アラニン(RA)は、好ましくはプラスミンまたはプラスミン様活性を有するプロテアーゼによって切断されると考えられることが示された。D1L3は、合計4個の推定プラスミン切断部位を含む(図8): (部位1) K180/A181(シグナルペプチドを含まないK160/A161)、(部位2) K200/A201(シグナルペプチドを含まないK180/A181)、(部位3) K259/A260(シグナルペプチドを含まないK239/A240)、及び(部位4) R285/A286(シグナルペプチドを含まないR270/A250)。D1及びD1L3の対アライメントを使用して、プラスミン切断部位のいずれもD1に存在しないことを見出した(図8)。データは、D1活性がトロンピン及びプラスミンなどの血清プロテアーゼによる不活性化に対して抵抗性であるという事実と一致する。構成要素タンパク質工学を適用して、(部位1) K180__A181delinsGL、(部位2) P198__A201delinsRPSQ、及び(部位3) K259Aの構成要素をD1から移行し、プラスミン切断部位を含むD1L3の構成要素を置き換えた(図9)。R285/A286(部位4)は、D1において欠如するC末端延長部に位置する。したがって、K180__A181delinsGL、P

198__A201delinsRPSQ、K259A、及びR285Aの4つすべての推定プラスミン切断部位が変異したD1L3バリエーションを作製した。次に、D1L3バリエーションによるクロマチン分解を分析し、変異したD1L3で強力なクロマチン分解活性を観察した(図10)。まとめると、データは、4つのアルギニン及びリジン残基、K180、K200、K259、及びR285を変異させて、酵素活性を損なうことなくタンパク質分解のリスクを低減できることを示す。

【0104】

次に、精製したD1L3を精製したプラスミンで消化した。D1L3断片を単離し、LC及びMSの組み合わせを使用して断片のアミノ酸配列を決定した。プラスミンが、R22、R29、K45、K47、K74、R81、R92、K107、K176、R212、R226、R227、K250、K259、及びK262のアルギニン及びリジン残基でD1L3を切断したことを特定した。これらのアルギニン及びリジン残基は、アラニン、バリン、及びセリンなどの小アミノ酸で置換され得るか、またはグランサム距離スコアに従って同様の特性を有するアミノ酸で置換され得る(例えば、ヒスチジン、グルタミン、及びグルタミン酸;図11)。プロテアーゼ耐性であるD1は、K45に対応するリジン残基を特徴とし、この残基が主にプラスミンによるD1L3のタンパク質分解に関与しないことを示唆する。構成要素タンパク質工学を適用して、R22(変異:M21__R22delinsLK)、R29(V28__S30delinsIQT)、K47(K47__K50delinsQILS)、K74(M72__K74delinsLDN)、R81(R77__I83delinsQDAPD)、R92(S91__R92delinsEP)、K107(K107__L110delinsRPDQ)、K176(K176__R178delinsQEK)、R212(R212T)、K226(V225__S228delinsATP)、K227(V225__S228delinsATP)、K250(K250D)、K259(K259A)、及びK262(K262G)の構成要素をD1から移行し、コンピューター分析でのトリプシン切断部位を含むD1L3の構成要素を置き換えた(図11)。

【0105】

最後に、組換え発現野生型D1L3を単離し、そのC末端を配列決定した。それぞれS290(配列番号10)、K291(配列番号11)、及びK292(配列番号12)で終わる3つの異なるアミノ酸配列を特定した(図4、実施例1)。データは、大規模製造中のD1L3の顕著なタンパク質分解切断部位としてリジン残基291及び292を特定する。

【0106】

実施例4:分解を防止するために操作したD1L3

*Pichia pastoris*における異種発現後のD1L3の断片化を観察した。断片の分析は、対塩基性アミノ酸、アルギニン(R)、及びリジン(K)残基をタンパク質分解切断部位として特徴付けた。CHO細胞でD1L3を発現した後に同様の分解パターンを観察した。これらの観察結果は、*Pichia pastoris*及びCHO細胞が、対塩基性アミノ酸でのD1L3を切断する相同プロテアーゼを共有していることを示唆するが、その効果はCHO細胞でより顕著であった。

【0107】

対塩基性アミノ酸切断酵素(PACE)がDNASE1L3断片化に寄与することを決定した。フューリン(Uniprot ID:P09958)としても知られるPACEは、ヒト及び哺乳動物において発現する。*Pichia pastoris*は、対塩基性アミノ酸を標的とする2つの酵素、すなわち、アスパラギン酸プロテイナーゼ3(遺伝子:Ysp1;Uniprot ID:P32329)、及びケキシン(遺伝子:Kex2;Uniprot ID:P13134)を発現する。したがって、DNASE1L3及びDNASE1L3バリエーションは、*Pichia pastoris*及びCHO細胞で発現させることができ、フューリン、アスパラギン酸プロテイナーゼ3、及びケキシンが薬理的に阻害されるか、または遺伝的に枯渇される。

10

20

30

40

50

【0108】

加えて、DNASE1L3及びDNASE1L3バリエントにおける対塩基性アミノ酸の変異は、断片化が減少したCHO及び*Pichia pastoris*におけるそれらの発現を可能にする。特定したDNASE1L3断片は、分析により、配列番号2のK50/R51、R80/R81、K114/R115、K199/K200、K226/K227、K291/K292、R297/K298/K299、及びK303/R304の位置での対塩基性アミノ酸を特徴とする。

【0109】

米国仮特許出願第62/800,790号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されるように、他の種からのDNASE1L3は、R114T(マウス)、R114A(ラット)、R114D(モルモット)、R114Q(ウシ)、K227S(イヌ)、及びK227E(ゾウ)を含むこれらの切断部位でのアミノ酸置換を特徴とする。これらのアミノ酸置換をヒトDNASE1L3に適用して、CHO細胞及び*Pichia pastoris*での発現中を含め、酵素をタンパク質分解に対して抵抗性とすることができる。

10

【0110】

ケキシンは、KR及びRR残基の後に切断することが好ましい。K50/R51、R80/R81、K114/R115、及びK303/R304におけるDNASE1L3特徴は、4個のKEX2切断部位である。これらの残基のアミノ酸置換は、DNASE1L3をKEX2に対して抵抗性とし、*Pichia pastoris*及びCHO細胞におけるDNASE1L3及びDNASE1L3バリエントの発現を可能にする。これらのアミノ酸置換は、例えば、R51K、R81K、R115K、及びR304Kなど、保存的であり得る。

20

【0111】

実施例5：高分子量凝集体を防止するために操作したD1L3バリエント

CHO細胞におけるD1L3のcGMP適合性発現の間に(図12A)、D1L3の高分子量凝集体の蓄積を観察し、D1L3を分析的に製造するための追加の課題を指摘する。高分子量凝集体は、*Pichia pastoris*においてはるかに低い程度で観察した。

30

【0112】

バイオリクター物質のタンパク質への還元条件の適用がD1L3凝集体を溶解した。データは、D1L3凝集体形成が、タンパク質発現中にジスルフィド架橋を介した分子内及び/または分子間架橋によって引き起こされることを示す。詳細には、図12Bに示すように、ゲルを非還元条件下で実行し、経時的なD1L3の高分子量凝集体の蓄積を示す。ゲルを還元条件下で実行し、凝集体を検出しなかった。データは、誤った分子内及び分子間ジスルフィド結合が製造条件下でヒトD1L3のミスフォールディングを引き起こすことを示す。

【0113】

図13は、ヒトD1(配列番号1)及びヒトD1L3(配列番号4)のアミノ酸配列アラインメントを示す。シグナルペプチド、保存アミノ酸、可変アミノ酸、非保存システイン残基、及び保存システイン残基を強調表示した。非保存システイン残基における変異は、タンパク質発現中の分子内及び分子間ジスルフィド結合の可能性を低減する。D1L3(配列番号4)のアミノ酸配列の分析は、C24、C52、C68、C194、及びC231(図14)の5個のシステイン(C)残基の存在を示した。システイン残基C194及びC231は、DNASE1タンパク質ファミリーのすべてのメンバー間で保存され、DNASE1の酵素活性に必要なジスルフィド結合を形成する。D1L3におけるシステイン残基の機能は、本開示の前には知られていなかった。したがって、本明細書に開示されるように、これらのシステイン残基の変異は、ジスルフィド架橋を介した架橋を減少させ、したがってタンパク質産生の収率を増加させる。

40

【0114】

50

システイン残基は、アラニン（A）、セリン（S）、及びグリシン（G）などの他の小アミノ酸で置換され得る。かかる置換は、アミノ酸変異C24A/S/G、C52A/S/G、C68A/S/G、C194A/S/G、及びC231A/S/Gを引き起こす。加えて、保存システイン残基を含む構成要素は、DNASE1タンパク質ファミリーのドナーDNase（例えば、D1及びD1L3）からの構成要素によって置き換えることができる。以下のD1からの構成要素を使用して、非保存システイン残基C24、C52、及びC68を含むD1L3の構成要素を置き換えた：C24_S25delinsAA、C52Y、及びN64_I70delinsHLTAVGK。D1L3バリエーションのクロマチン分解活性を、PCT/US18/4708に記載されるように定量化した。従来のアミノ酸置換（C24A、C52A）及び構成要素置換（C24_S25delinsAA、C52Y）の両方が、クロマチン分解の完全な欠如を引き起こし、C24及びC52がD1L3活性に必要であることを示した（図15）。重要なことに、従来のアミノ酸置換[C68A、（配列番号13）]またはBB変異（N64_I70delinsHLTAVGK）のいずれかによるシステインC68の変異は、クロマチン分解活性を有するD1L3バリエーションをもたらした（図15）。アミノ酸配列アラインメントは、システインC68が他のDNASE1タンパク質ファミリーメンバー間で保存されていないことを示し、C68が酵素活性に必要とされないという考えを支持する。さらに、高度保存システインC194をアラニンでアミノ酸置換（C194A）したが、高度保存システインC231をアラニンで変異（C231A）しなかったことを観察し、酵素的に活性なD1L3バリエーションをもたらした（図15）。したがって、システインC68及びC194を変異させ、D1L3産生中の誤ったジスルフィド結合のリスクを減少させることができる。

【0115】

同様のアプローチを適用して、D1、DNase1様1（D1L1）、及びDNase1様2（D1L2）のDNase1タンパク質ファミリーの他のメンバー内の非保存システイン残基を変異させることができる。D1は、C123及びC126の2つの非保存システインを有する。D1L1は、D1L2におけるC24及びC52に対応する2つの非保存システイン残基（C22、C50）が1つの非保存システイン残基：C43のみを有することを示す。DNASE1タンパク質ファミリーのメンバーの非保存システイン残基の変異は、タンパク質発現中に誤ったジスルフィド架橋を介した架橋を低減し、したがって、治療用途のためのD1、D1L1、D1L2、及びD1L3の製造を可能とする。

【0116】

実施例6：Pichia pastorisにおけるD1L3及びアルブミン-D1L3融合タンパク質の構築及び発現
D1L3を含む組換えヒト細胞外DNASESのPichia pastoris発現を試験した。図16Aに示すように、D1L3のN末端を、Pichia pastorisにおける異種タンパク質発現のための一般的なツールであるSaccharomyces cerevisiae（配列番号46）からのアルファ接合因子（aMF）プロ-プロ分泌リーダーによって導いた。本明細書に開示されるように、aMFとD1L3との組み合わせは、グリコシル化に起因するaMFの予期しない非プロセッシングを引き起こした（図16B）。D1L3タンパク質のグリコシル化は、D1L3の分析的製造に対してP. pastorisを使用することを妨げた。N末端がD1L3の天然分泌シグナルペプチドによって導かれた場合に、D1L3は適切にプロセッシングされた[図16B、（配列番号48）]。重要なことに、aMFは、D1L3の天然シグナルペプチドと比較してD1L3発現を3~5倍増加させた。したがって、D1L3融合タンパク質のプロセッシングを試験した。予備試験では、aMF及びヒト血清アルブミン[HS A（配列番号39）]のD1L3とのN末端融合を生成した（図17A）。いくつかのバリエーションは、HS AとD1L3との間にリンカーペプチド[例えば、（GSSSS）₃]を含有した。図17B及び図17Cに示すように、P. pastorisにおける融合タンパク質の発現は、非グリコシル化及び酵素活性D1L3を生成した。更に、発現レベルは、D1L3の天然分泌シグナルペプチド駆動発現と比較して5~10倍増加した。まとめると、データは、D

1 L 3 のアルブミンとの融合が、*P i c h i a p a s t o r i s*での製造を可能にすることを示している。

【 0 1 1 7 】

これらの予備試験に基づいて、野生型 D 1 L 3 及び B D D - D 1 L 3 の様々な H S A 融合構築物を設計し、標的タンパク質（配列番号 1 7 ~ 2 8 ）の発現レベルについてスクリーニングした。図 1 8 に示すように、ヒト血清アルブミン（配列番号 1 7 ）の B D D - D 1 L 3 バリエーション（配列番号 1 6 ）との N 末端融合が、発現レベルを実質的に増加させなかったことを観察した。しかしながら、H S A と B D D - D 1 L 3 との間にグリシン（G）及びセリン（S）残基からなる柔軟性リンカーを挿入した際に、発現レベルの強い増加を検出した。さらに、リンカー配列の長さは、発現の増加と相関した。例えば、1 2 ± 1 . 9 相対単位の発現が 5 個のアミノ酸リンカー（配列番号 1 8 ）で得られた一方で、1 5 個のアミノ酸リンカー（配列番号 1 9 ）発現が 3 2 ± 3 . 2 相対単位であり、リンカーなしの H S A 融合よりも約 7 . 5 倍改善した。さらに、リンカー - H S A 構築物の C 末端融合が低レベルで発現されたため、N 末端位置は、発現レベルの改善に重要であった（配列番号 2 0、配列番号 2 1）。注目すべきことに、柔軟性リンカーを介した H S A の N 末端融合は、野生型 D 1 L 3 （配列番号 2 2 ）の発現を、天然 D 1 L 3 （配列番号 4 ）の約 2 0 倍も強力に増加させた。結論として、リンカーを介した H S A の N 末端との融合は、D 1 L 3 及び B D D - D 1 L 3 バリエーションの産生を可能とする。

10

【 0 1 1 8 】

次に、リンカー配列の性質が D 1 L 3 発現の改善に重要であるかを試験した。2 つの追加の配列、A P A P A P A P A P A P A P （配列番号 3 3、1 4 個のアミノ酸、剛性リンカー）、及び A E A A A K E A A A K A （配列番号 3 4、1 2 個のアミノ酸、剛性らせん状リンカー）を試験した。図 1 9 に示すように、両方の試験構築物（配列番号 2 3、配列番号 2 4）において、発現の強い増加を観察したが、剛性らせんリンカーは、G G G G S G G G G S G G G G S リンカーについて観察したのと同様の強い発現レベルを達成しなかった。したがって、リンカーの長さ及び酸組成は、D 1 L 3 発現のレベルに影響を及ぼした。

20

【 0 1 1 9 】

次に、リンカー長、発現レベル、及び酵素活性の関係を分析した。これらの試験のために、B D D - D 1 L 3 バリエーション（配列番号 2 5 ~ 2 7）に対する G S - リンカーとの H S A の N 末端融合を含む発現ベクターを設計した。3 つの異なるリンカー長を、S G G S G S S [7 個のアミノ酸、（配列番号 3 5）]、S G G S G G S G G S G G S G S S [1 6 個のアミノ酸、（配列番号 3 6）]、S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G S S [3 1 個のアミノ酸、（配列番号 3 7）] で試験した。図 2 0 に示すように、7 個のアミノ酸から 1 6 個のアミノ酸へのリンカー配列の伸長は、発現レベルの増加をもたらした。1 6 から 3 1 個へのアミノ酸のさらなる伸長は、タンパク質発現を増加させなかったが、H M W - クロマチンの L M W - クロマチンへの分解によって検出されるように酵素活性を増加させた。アルブミン融合に融合された生物学的製剤は、アルブミンが基質及びリガンドとの相互作用を立体的に阻害するため、活性の低下を示すことが多い。したがって、ペプチドリンカーを使用して、アルブミンと融合タンパク質またはペプチドとの間の距離を増加させることができる。しかしながら、H S A と D 1 L 3 との間にリンカー配列を挿入すると、酵素活性及び発現レベルが同時に改善するという観察は予想外であった。

30

40

【 0 1 2 0 】

B D D - D 1 L 3 （配列番号 1 4 ）のクロマチン分解活性を、そのアルブミン融合対応物（配列番号 1 9 ）と比較した。簡潔には、D n a s e 1 - / - D n a s e 1 l 3 - / - マウスに配列番号 4 または配列番号 1 9 を注入した。注入の 1 5 分後に血清を収集した。図 2 1 A に示すように、両方の動物において同様の血清クロマチン分解活性を観察した。重要なことに、D 1 L 3 及び他のヒト細胞外 D N A S E S の N 末端へのアルブミンの融合は、半減期が延長された D N A S E 治療薬を提供する。本明細書に開示されるように、市販

50

のげっ歯類モデルにおいて、15個のアミノ酸の柔軟性GSリンカーを有するHSA-BDD-D1L3融合タンパク質である配列番号19の半減期を決定した。動物モデルは、循環中のアルブミンの長い半減期を担うヒトFcRnのトランスジェニック発現を特徴とする。非複合D1L3（例えば、配列番号4）は、循環中の非常に短い半減期を有するが（30分未満）、アルブミン融合物は、半減期を3.3日まで延長し、それによって全身曝露を実質的に改善し、同時に5分のt_{max}で急速な吸収をもたらした（図21B）。まとめると、データは、リンカー配列を介したHSAのD1L3へのN末端融合が、製造を容易にするだけでなく、D1L3のインビボ薬物動態特性も改善することを示す。

【0121】

最後に、D1L3のN及びC末端へのHSAの二重融合を試験した。まず、潜在的な付着部位についてD1L3のC末端を分析した。BD(RAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)のD1L3のコアボディへの柔軟な接続を提供する、283位及び284位の2つのセリン残基を特定した。したがって、BDを削除し、柔軟性GSリンカー（配列番号38）を介してHSAをS284に接続することを選択した。図22に示すように、BDD-D1L3（配列番号28）のN及びC末端へのHSAの融合は、N末端HSA融合（配列番号27）で観察した高い発現レベルを維持した。

10

【0122】

実施例7：切断可能リンカー配列の設計

本明細書に開示される発見は、製造を超える意味を有する。例えば、配列番号9～配列番号12によって例示されるように、クロマチン及び/またはNETを分解するためのこれらの酵素活性を保持するC末端アミノ酸欠失を有するD1L3バリエーションをD1L3治療に使用することができる。加えて、非対システインチオール部位特異的アルキル化は、治療用途のための半減期延長生物学的製剤を生成するために一般的に使用される。詳細には、D1L3の非必須システインC68及びC194は、部位特異的PEG化（PEG、ポリエチレングリコール）に使用できる。さらに、K180__A181delinsGL、P198__A201delinsRPSQ、K259A、及びR285Aなどの変異に起因するプラスミンによる不活性化に抵抗性のD1L3バリエーションは、改善された半減期を有し、したがって、治療用途において有効性が期待される。

20

【0123】

重要なことに、D1L3及び他のヒト細胞外DNASESのN末端へのアルブミンの融合は、半減期が延長されたDNASE治療薬を提供する（図23A）。いくつかのリンカー配列を使用して、アルブミンによるD1L3の立体障害を低減した。さらに、生理学的に切断可能ペプチドリンカーを開発した。融合タンパク質が好中球細胞外トラップ（NET）に近接しているときに、リンカーペプチドを切断するように設計した。好中球エラスターゼ、カテプシンG、及びプロテイナーゼ3などの好中球特異的プロテアーゼによって標的とされるペプチド配列は、切断可能リンカー配列の候補である。

30

【0124】

血管内で切断され、したがって静脈内及び動脈内に適用されるDNASE治療薬に最適な切断可能リンカー配列を開発した。ペプチドを設計するために、NETは、血液凝固因子、特に凝固因子XII（FXII）を活性化する能力を有すると考えた。活性化FXII（FXIIa）は、2つの主要基質：凝固因子XI（FXI、配列番号40）及びプレカリクレイン（PK、配列番号41）を有する。アミノ酸配列アライメントは、FXIIa切断部位がFXI及びPK中で保存されていることを示した（図23B）。FXIにおいて、切断部位は、アルギニン387とイソロイシン388との間にある。PKにおいて、切断部位は、アルギニン390とイソロイシン391との間にある。実際に、FXI及びPKは相同タンパク質である。本明細書に開示されるように、FXI配列380位～403位（配列番号42、配列番号43）またはPK配列383位～406位（配列番号44）のすべてまたは一部を含むいくつかのリンカーペプチドを設計した。

40

【0125】

最後に、FXIIa切断可能なリンカーは、他の細胞外DNASE、ヒト凝固因子（例え

50

ば、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、及び第 I X 因子)、及び補体因子(例えば、第 H 因子)のバリエーションを含むがこれらに限定されない、他の生物学的製剤の半減期を延長する形式(図 2 4)を製造するために使用することができる。

【 0 1 2 6 】

本明細書に引用される全ての特許及び特許刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

野生型ヒト D N A S E

配列番号 1

DNASE1 (NP_005212.2):シグナルペプチド、成熟タンパク質:

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRDShLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDMVMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLI PDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

10

配列番号 2

DNASE1 様 1 (NP_006721.1):シグナルペプチド;
成熟タンパク質:

MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEV
VDSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSYVY
NDEDDVFAREFVFAQFSLPSNVLP SLVLVPLHTTPKAVEKELNALYDV FLEVSQHWQS
KDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLH
GERCRSLLHTAAAFDFPTS FQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLL
LSLLSPQLCPAA

20

30

配列番号 3

DNASE1 様 2 (NP_001365.1):シグナルペプチド、成
熟タンパク質:

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFQDQSKVSDPACGSI IAKILAGYDLALV
QEVDRPDL SAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDY
LYDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPH
QAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLSSEVFKWLI
PDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRLKPKQSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFP
VEVTLKFHR

40

配列番号 4

50

D N A S E 1 様 3 ; アイソフォーム 1 (N P _ 0 0 4 9 3 5 . 1) : シグナルペプチド、成熟タンパク質 :

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTEEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KKSVTLRKKT KSKRS

10

配列番号 5

D N A S E 1 様 3 ; アイソフォーム 2 (N P _ 0 0 1 2 4 3 4 8 9 . 1) : シグナルペプチド ; 成熟タンパク質 :

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNREKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAV
 KDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKN
 IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQKAYK
 LTEEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNS KKSVTLRKKT KSKRS

20

配列番号 6

D N A S E 2 A (O O O 1 1 5) : シグナルペプチド ; 成熟タンパク質 :

MIPLLLAALLCVPAGALTCYGDGQPVDFVYKLPALRGSGEAAQRGLQYKYLDESS
 GGWRDGRALINSPEGAVGRSLQPLYRSNTSQLAFLLYNDQPPQPSKAQDSSMRGHTKG
 VLLLDHDGGFWLVHSPNFPASSAAYSWPHSACTYGQTLTLCVSPFAQFSKMGKQL
 TYTYPWVYNYQLEGI FAQEFPDLENVVKGHHVSQEPWNSSITLTSQAGAVFQSFQKFS
 KFGDDL YSGWLAALGTNLQVQFWHKT VGI LPSNCS DIWQVLNVN QIAFP GPAGPSFN
 STEDHSKWCVSPKGPWTCVGD MNRN QGEEQRGGT LCAQLPALWKA FQPLVKNYQPCN
 GMARKPSRAYKI

30

配列番号 7

40

50

D N A S E 2 B (Q 8 W Z 7 9) : シグナルペプチド ; 成熟タンパク質 :
MKQKMMARLLRTSFALLFLGLFGVLGAATISCRNEEGKAVDWFTFYKLPKRQNKESGE
 TGLELYLDSTTRSWRKSEQLMNDTKSVLGRTLQQLYEAYASKSNNTAYLIYNDGVPK
 PVNYSRKYGHTKGLLLWNRVQGFWLIHSIPQFPPIPEEGYDYPPTGRRNGQSGICITF
 KYNQYEAIDSQLLVCNPNVYSCSIPATFHQELIHMPQLCTRASSEIPGRLLTTLQSA
 QGQKFLHFAKSDSFLDDIFAAWMAQRLKTHLLTETWQRKRQELPSNCSLPYHVYNIKA
 IKLSRHSYFSSYQDHAKWCISQKGTKNRWTCIGDLNRS PHQAFRSGGFICTQNWQIYQ
 AFQGLVLYYESCK

10

ヒト D N A S E 1 L 3 パリアント

配列番号 8

D N A S E 1 様 3 、 Q 1 0 1 R (シグナルペプチド ; 成熟タンパク質)
MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICS FNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKE RYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KKSVTLRKKT KSKRS

20

配列番号 9

D N A S E 1 L 3 、 Q 2 8 2 _ S 3 0 5 d e l i n s K (シグナルペプチド ;
 成熟タンパク質) :
MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICS FNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLK

30

配列番号 1 0

D N A S E 1 L 3 、 S 3 0 5 d e l i n s K (シグナルペプチド ; 成熟タンパク
 質) :
MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICS FNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQAAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS

40

配列番号 1 1

50

D N A S E 1 L 3、K 2 9 2 _ S 3 0 5 d e l (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDQAAYKLTEEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNS
 K

10

配列番号 1 2

D N A S E 1 L 3、S 2 9 3 _ S 3 0 5 d e l (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDQAAYKLTEEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KK

20

配列番号 1 3

D N A S E 1 L 3、C 6 8 A (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRI**A**PILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDQKAYKLTEEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KKSVTLRKKTKSKRS

30

配列番号 1 4

D N A S E 1 L 3、F 2 7 5 Y / F 2 7 9 _ K 2 8 0 d e l i n s V M / Q
 2 8 2 _ S 3 0 5 d e l i n s K (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDQKAYKLTEEEALDVS DHYPVEVMLK

40

配列番号 1 5

50

D N A S E 1 L 3、S 2 8 3 _ S 3 0 5 d e 1 (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQ

10

配列番号 1 6

D N A S E 1 L 3、R 2 8 5 _ S 3 0 5 d e 1 (シグナルペプチド；成熟タンパク質)：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLNREKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAV
KDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA YDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYK
LTEEEALDVSDHFPVEFKLQSS

20

D N A S E 1 L 3 及びバリエントを有するアルブミン融合物

配列番号 1 7

アルブミン-D N A S E 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、D N A S E 1 L 3 バリエント)：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLOQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL L L R
LAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQOLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKLVAAASQ
AALGLMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILME
KLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFS
REPFVWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGD
FNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA YDRIVLRGQEIIVSSV
VPKSNVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

30

40

配列番号 1 8

50

アルブミン-DNA SE 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3 バリエント) :

DAHKSEVAHRFKDLGGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNL PRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLGGGGSMR ICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRIC
PILMEKLN RNSRRGIT YNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGD
ADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVI I PLHTTPETSVKE IDELVEVYTDVKHRWKAENF
IFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLI GDQEDTTVKKSTNCA YDRIVLRGQE
IVSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

10

20

配列番号 1 9

アルブミン-DNA SE 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3 バリエント) :

DAHKSEVAHRFKDLGGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNL PRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLGGGGSGGGGSGGGGSMR ICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLN RNSRRGIT YNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVI I PLHTTPETSVKE IDELVEVYTD
VKHRWKAENF IFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLI GDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQE IVSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

30

40

配列番号 2 0

50

アルブミン-DNA SE 1 L 3 -融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3) :

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPNLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNKYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLGGGGSGGGSGGGGSMR IC SFNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETS VKE IDELVEVYTD
VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPPKAWKN IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
KKSVTLRKKTKSKRS

10

20

配列番号 2 3

アルブミン-DNA SE 1 L 3 -融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3) :

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPNLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNKYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLAPAPAPAPAPAPMR IC SFNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVME
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSY
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETS VKE IDELVEVYTDV
KHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPPKAWKN IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAY
DRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSK
KSVTLRKKTKSKRS

30

40

配列番号 2 4

50

アルブミン-DNA SE 1 L 3 -融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3) :

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEOQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLAEAAAKEAAAKAMR ICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDI ILVMEIK
DSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHY
HDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVI I PLHTT PETS VKE IDELVEVYTDVKH
RWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVW LIGDQEDTTVKKSTNCAYDR
IVLRGQEI VSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS
VTLRKKTKSKRS

10

20

配列番号 2 5

アルブミン-DNA SE 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3 バリエント) :

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEOQLGEYKFQNA
LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGLSGGSGSSMR ICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDI ILVMEIKDSNNR
ICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQD
GDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVI I PLHTT PETS VKE IDELVEVYTDVKHRWKA E
NFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVW LIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRG
QEI VSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQ

30

40

配列番号 2 6

50

アルブミン-DNA SE 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3 バリエント) :

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
 AENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNP NLPRLV
 RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAADK
 AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
 KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
 AEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
 LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E LFEQLGEYKFQNA
 LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
 EKT PVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
 AALGLSGGSGGSGGSGGSGSSMRICSFNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILV
 MEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKR
 SYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTPETS VKEIDELVEVYT
 DVKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNC
 AYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQ

10

20

配列番号 2 7

アルブミン-DNA SE 1 L 3 バリエント-融合タンパク質。(アルブミン、DNA SE 1 L 3 バリエント) :

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKALVLI AFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
 AENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNP NLPRLV
 RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAADK
 AACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
 KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCI
 AEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LLLR
 LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E LFEQLGEYKFQNA
 LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
 EKT PVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
 AALGLSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSSMRICSFNVR SFGESKQEDKNAM
 DVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKE
 QYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFV I I PLHTTP
 ETSVK EIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWL
 IGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDH
 FPVEFKLQ

30

40

配列番号 2 8

50

リンカー配列

配列番号 3 1

G G G G S

配列番号 3 2

G G G G S G G G G G G G G S

配列番号 3 3

A P A P A P A P A P A P A P

配列番号 3 4

A E A A A K E A A A K A

配列番号 3 5

S G G S G S S

配列番号 3 6

S G G S G G S G G S G G S G S S

配列番号 3 7

S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G S G S

配列番号 3 8

G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G S G S

他の配列

配列番号 3 9

ヒト血清アルブミン (成熟タンパク質) :

D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D H V
K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L
R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V
D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y E I A R R H P Y F Y A P E L L F F A K R
Y K A A F T E C C Q A A D K A A C L L P K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C
A S L Q K F G E R A F K A W A V A R L S Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K
V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C C E
K P L L E K S H C I A E V E N D E M P A D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A
E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D Y S V V L L L R L A K T Y E T T L E K C
C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E
Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H
P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S
L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K E F N A E T F T F H A D I C T L S E K E
R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K
A D D K E T C F A E E G K K L V A A S Q A A L G L

配列番号 4 0

ヒト第 X I 因子 :

M I F L Y Q V V H F I L F T S V S G E C V T Q L L K D T C F E G G D I T T V F T
P S A K Y C Q V V C T Y H P R C L L F T F T A E S P S E D P T R W F T C V L K D
S V T E T L P R V N R T A A I S G Y S F K Q C S H Q I S A C N K D I Y V D L D M
K G I N Y N S S V A K S A Q E C Q E R C T D D V H C H F F T Y A T R Q F P S L E
H R N I C L L K H T Q T G T P T R I T K L D K V V S G F S L K S C A L S N L A C
I R D I F P N T V F A D S N I D S V M A P D A F V C G R I C T H H P G C L F F T
F F S Q E W P K E S Q R N L C L L K T S E S G L P S T R I K K S K A L S G F S L
Q S C R H S I P V F C H S S F Y H D T D F L G E E L D I V A A K S H E A C Q K L
C T N A V R C Q F F T Y T P A Q A S C N E G K G K C Y L K L S S N G S P T K I L
H G R G G I S G Y T L R L C K M D N E C T T K I K P R I V G G T A S V R G E W P
W Q V T L H T T S P T Q R H L C G G S I I G N Q W I L T A A H C F Y G V E S P K
I L R V Y S G I L N Q S E I K E D T S F F G V Q E I I I H D Q Y K M A E S G Y D
I A L L K L E T T V N Y T D S Q R P I C L P S K G D R N V I Y T D C W V T G W G

10

20

30

40

50

Y R K L R D K I Q N T L Q K A K I P L V T N E E C Q K R Y R G H K I T H K M I C
A G Y R E G G K D A C K G D S G G P L S C K H N E V W H L V G I T S W G E G C A
Q R E R P G V Y T N V E Y V D W I L E K T Q A V

配列番号 4 1

ヒトプレカリクレイン :

M I L F K Q A T Y F I S L F A T V S C G C L T Q L Y E N A F F R G G D V A S M Y
T P N A Q Y C Q M R C T F H P R C L L F S F L P A S S I N D M E K R F G C F L K
D S V T G T L P K V H R T G A V S G H S L K Q C G H Q I S A C H R D I Y K G V D
M R G V N F N V S K V S S V E E C Q K R C T N N I R C Q F F S Y A T Q T F H K A
E Y R N N C L L K Y S P G G T P T A I K V L S N V E S G F S L K P C A L S E I G
C H M N I F Q H L A F S D V D V A R V L T P D A F V C R T I C T Y H P N C L F F
T F Y T N V W K I E S Q R N V C L L K T S E S G T P S S S T P Q E N T I S G Y S
L L T C K R T L P E P C H S K I Y P G V D F G G E E L N V T F V K G V N V C Q E
T C T K M I R C Q F F T Y S L L P E D C K E E K C K C F L R L S M D G S P T R I
A Y G T Q G S S G Y S L R L C N T G D N S V C T T K T S T R I V G G T N S S W G
E W P W Q V S L Q V K L T A Q R H L C G G S L I G H Q W V L T A A H C F D G L P
L Q D V W R I Y S G I L N L S D I T K D T P F S Q I K E I I I H Q N Y K V S E G
N H D I A L I K L Q A P L N Y T E F Q K P I C L P S K G D T S T I Y T N C W V T
G W G F S K E K G E I Q N I L Q K V N I P L V T N E E C Q K R Y Q D Y K I T Q R
M V C A G Y K E G G K D A C K G D S G G P L V C K H N G M W R L V G I T S W G E
G C A R R E Q P G V Y T K V A E Y M D W I L E K T Q S S D G K A Q M Q S P A

10

20

活性可能リンカー配列

配列番号 4 2

F X I I a 感受性リンカー (第 X I 因子ペプチド) :

C T T K I K P R I V G G T A S V R G E W P W Q V T

配列番号 4 3

F X I I a 感受性リンカー

G G G G S P R I G G G S

配列番号 4 4

F X I I a 感受性リンカー (プレカリクレインペプチド) :

V C T T K T S T R I V G T N S S W G E W P W Q V S

30

配列番号 4 5

F X I I a 感受性リンカー (プレカリクレインペプチド) :

S T R I V G G

シグナルペプチド

配列番号 4 6

アルファ接合因子 (P 0 1 1 4 9) :

M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S

40

配列番号 4 7

ヒトアルブミン分泌シグナルペプチド + プロペプチド (P 0 2 7 6 8) :

M K W V T F I S L L F L F S S A Y S R G V F R R

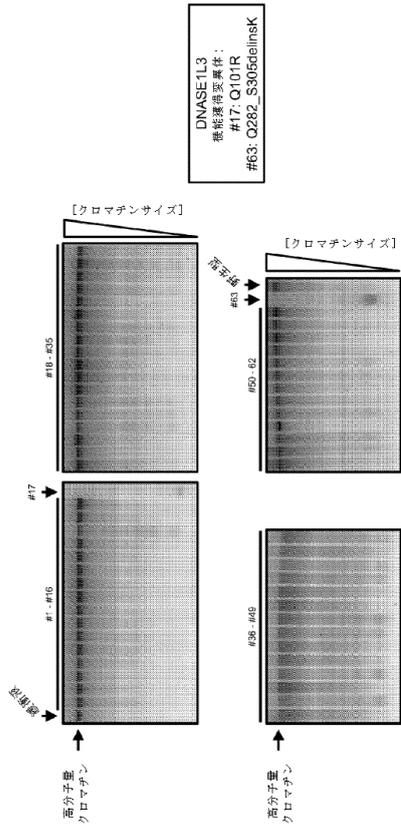
配列番号 4 8

ヒト D N A S E 1 L 3 シグナルペプチド (Q 1 3 6 0 9) :

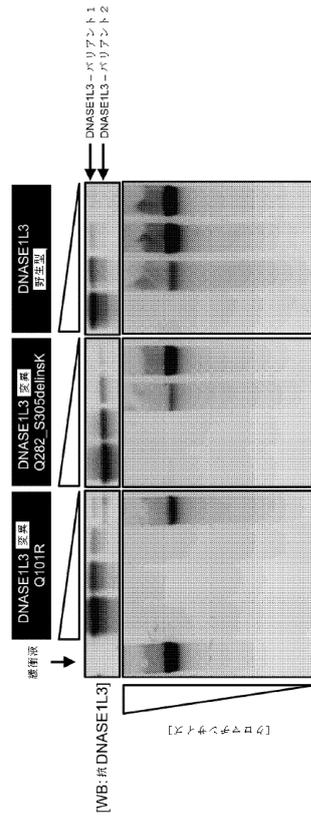
M S R E L A P L L L L L L S I H S A L A

50

【 図 面 】
【 図 1 】



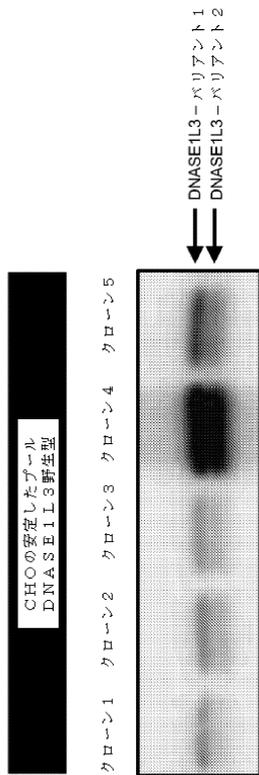
【 図 2 】



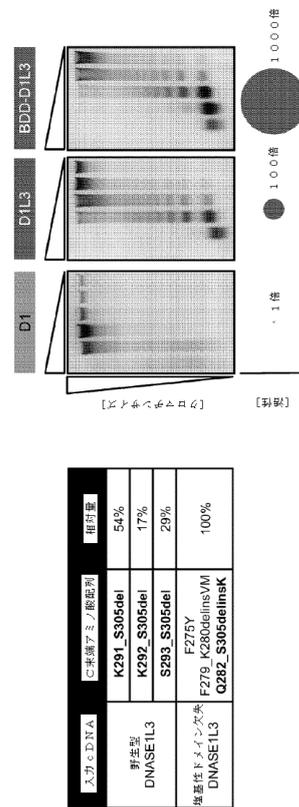
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

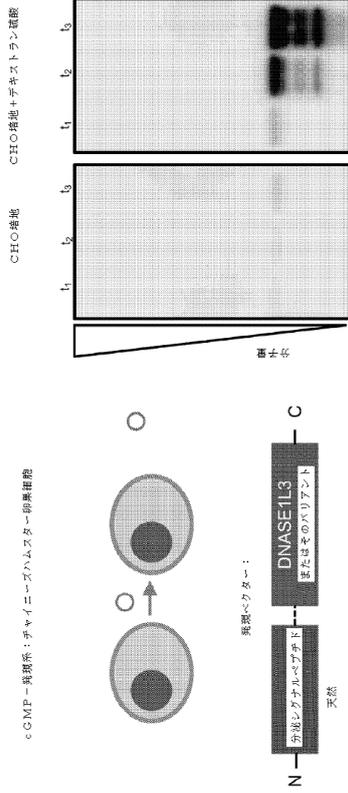


30

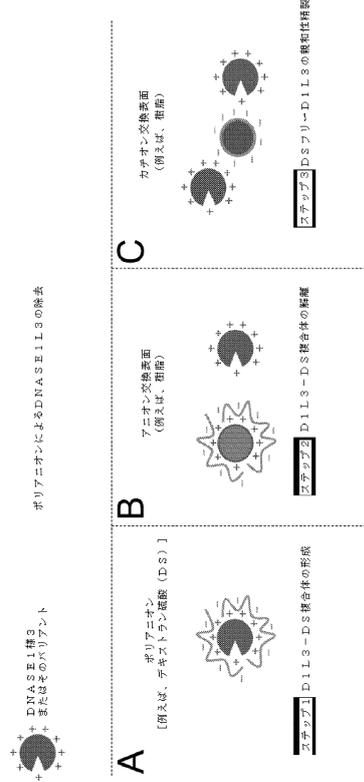
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

【 図 7 】

特定したトリプシン切断部位の変異

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|----------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|------------------|-------|------------------|---------------------|-------------|------------------|-------|
| R22 | R29AV/S, R29H/Q/E | R51 | R66AV/S, R66H/Q/E | R80 | R81AV/S, R81H/Q/E | R95 | R99AV/S, R99H/Q/E | R115 | R147 | K163 | K180 | R208AV/S, R208H/Q/E | R239 | K250 | K262G |
| M21_R22delnsLK | V28_S30delnsIQT | 該当なし (保存残基) | N64_I70delnsHLTAVGK | R77_I83delnsQDAPD | R77_I83delnsQDAPD | 該当なし (保存残基) | 該当なし (保存残基) | V113_R115delnsAVD | K147_D148delnsRE | K163A | K180_A181delnsGL | R208W | 該当なし (保存残基) | L238_R239delnsVA | K250D |

アミノ酸置換の選択:
ガラクトサムの距離

Arg (R) / His (H): 29
Arg (R) / Glu (E): 54
Arg (R) / Gln (Q): 53
Lys (K) / His (E): 32
Lys (K) / Gln (H): 54
Lys (K) / Glu (E): 56

【 図 8 】

| | | | | | | | | |
|--------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | MRSKMLLGLLALIAALDGGAVSIKIIAENIQTIFGETKMSNATLVSYIVQILLSRYDIAIQEVRDSHLTAVGKLLDNLNOD | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | SGRQITKANKVLSGSLGRNTYKQYAEIKELLSVYSVYAFDYQDGDADYLSRERFVVVFQFQCHAKDQFVILPILIT | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | FGDAVETDAIVYGVHIDVQEKQIEDVNLGGDFNARGSVYQGSNSIISWISFTFQWLLPFSADTFAIDTHCAVDSTLV | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | FLTSVTELELVWIDVKKHAKAENEFRGGFNAGGSVYKAAVNIKREKIDPQVFWLIGQOEDTIVYKKSINQAVDVIY | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | VAGMILSGAVVYDQSLPTFTEGAKNYSQDQALISBIVFVEMEK | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | LKGDIVSSVWPKNSVFDQWYKETEFEELDVSDHFPVEFKQSSKATINSSKKSIVLKKFKSKRS | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | シグナルペプチド | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | 保存アミノ酸 | | | | | | | |
| ヒト DNASE1 配列目盛り | アラミン感受性長尺残基 D1L3 における C 末端ドメイン | | | | | | | |

30

40

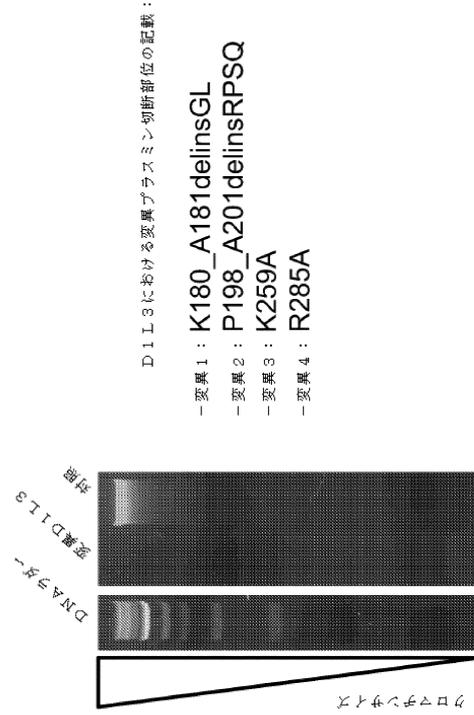
50

【 図 9 】

予測されるプラスミン切断部位の変異

| # | D1L3における A.A (配列番号 4) | アミノ酸置換 | D1 (配列番号 1) 構成要素変異 |
|---|--------------------------|------------------|-----------------------|
| 1 | K180 | K180A, K180H/Q/E | K180_A181delinsGL |
| 2 | K200 | K200A, K200H/Q/E | P198_A201delinsRPSQ |
| 3 | K259 | K259A, K259H/Q/E | A259A |
| 4 | R285 | R285A, R285H/Q/E | 該当なし (D1において欠如) |

【 図 10 】



10

20

【 図 11 】

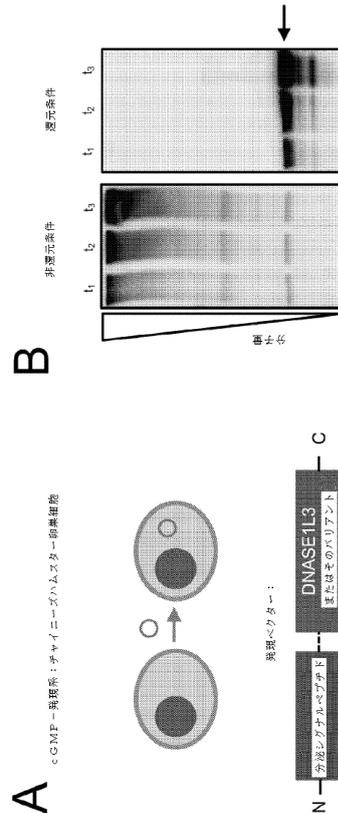
特定したプラスミン切断部位の変異

| # | D1L3における A.A (配列番号 4) | アミノ酸置換 | D1 (配列番号 1) 構成要素変異 |
|----|--------------------------|-----------|-----------------------|
| 1 | R22 | R22H/Q/E | M21_R22delinsLK |
| 2 | R29 | R29H/Q/E | V28_S30delinsQT |
| 3 | K45 | K45H/Q/E | 該当なし (保存残基) |
| 4 | K47 | K47H/Q/E | K47_K50delinsQILS |
| 5 | K74 | K74H/Q/E | M72_K74delinsLDN |
| 6 | R81 | R81H/Q/E | R77_I83delinsQDAPD |
| 7 | R92 | R92H/Q/E | S91_R92delinsEP |
| 8 | K107 | K107H/Q/E | K107_L110delinsRPDQ |
| 9 | K176 | K176H/Q/E | K176_R178delinsQEK |
| 10 | R212 | R212H/Q/E | R212T |
| 11 | K226 | R226H/Q/E | V225_S228delinsATP |
| 12 | K227 | K227H/Q/E | V225_S228delinsATP |
| 13 | K250 | K250H/Q/E | K250D |
| 14 | K259 | K259H/Q/E | K259A |
| 15 | K262 | K262H/Q/E | K262G |

アミノ酸置換の選択：
グラナサムとの距離

- Arg (R) / His (H): 29
- Arg (R) / Glu (E): 54
- Arg (R) / Gln (Q): 53
- Lys (K) / His (H): 32
- Lys (K) / Gln (H): 54
- Lys (K) / Glu (E): 56

【 図 12 】

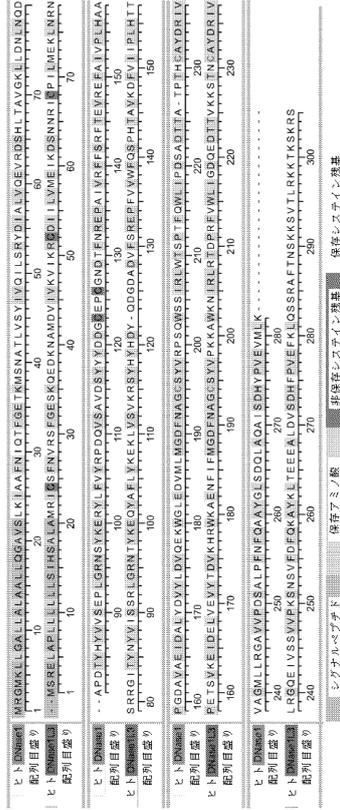


30

40

50

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

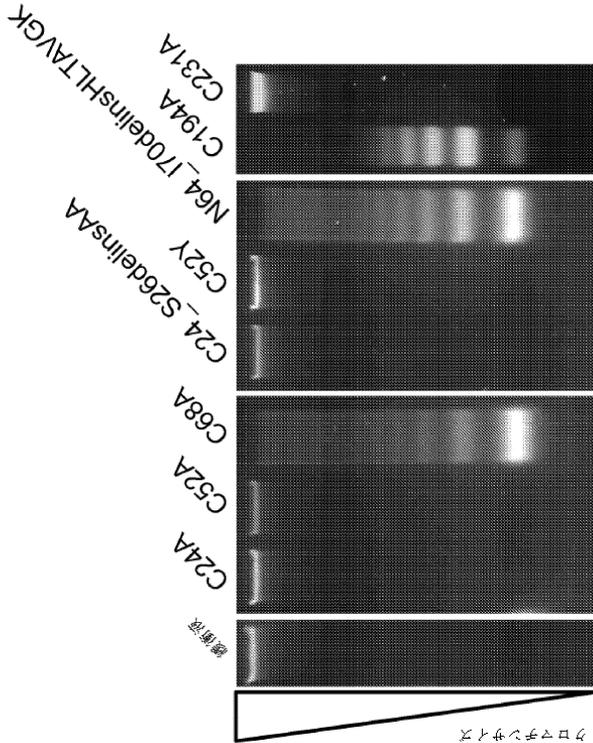
特定したプラスミン切断部位の変異

| # | DI13における AA (配列番号4) | アミノ酸置換 | DI1 (配列番号1) 構成要素変異 |
|---|------------------------|-----------|-----------------------|
| 1 | C24 | C24A/S/G | C24_S25delInsAA |
| 2 | C52 | C52A/S/G | C52Y |
| 3 | C68 | C68A/S/G | N64_I70delInsHLTAVGK |
| 4 | C194 | C194A/S/G | 該当なし (保存残基) |
| 5 | C231 | C231A/S/G | 該当なし (保存残基) |

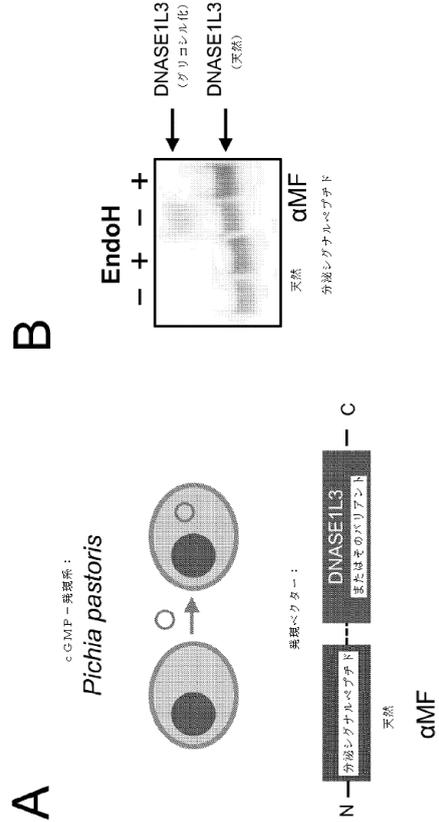
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

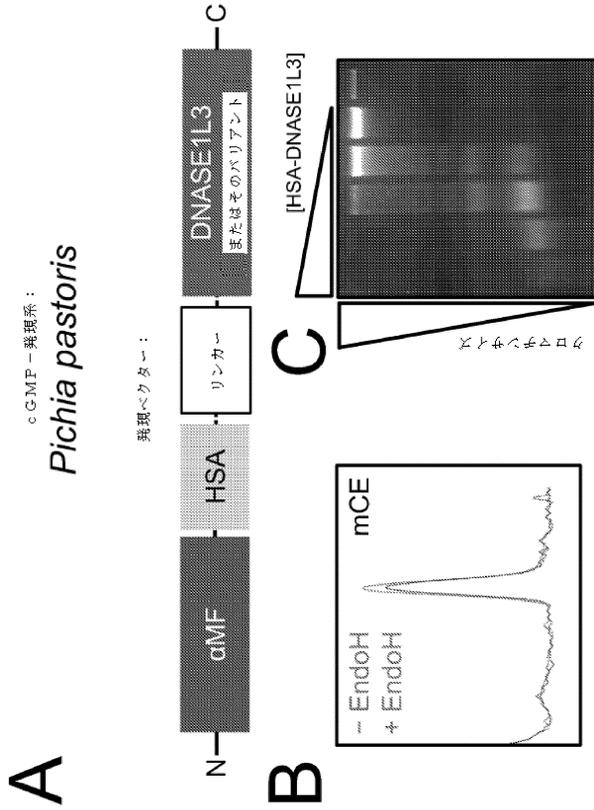


30

40

50

【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

| 配列番号 | リンカー | 配列 | 長さ | 発現レベル (相対単位) |
|----------|------|----|----|--------------|
| 配列番号 1 4 | HSA | - | | 4.3±0.5 |
| 配列番号 1 7 | HSA | L1 | | 4.3±0.4 |
| 配列番号 1 8 | HSA | L2 | | 12±1.9 |
| 配列番号 1 9 | HSA | L1 | | 32±3.2 |
| 配列番号 2 0 | HSA | L2 | | <1 |
| 配列番号 2 1 | HSA | L1 | | 1.8±0.2 |
| 配列番号 4 | HSA | L2 | | 1.1±0.1 |
| 配列番号 2 2 | HSA | L2 | | 22±1.3 |

| 配列番号 | リンカー | 配列 | 長さ |
|----------|------|---------------------|-------|
| 配列番号 3 1 | L1 | GGGG | 5 AA |
| 配列番号 3 2 | L2 | (GGGG) ₃ | 15 AA |

10

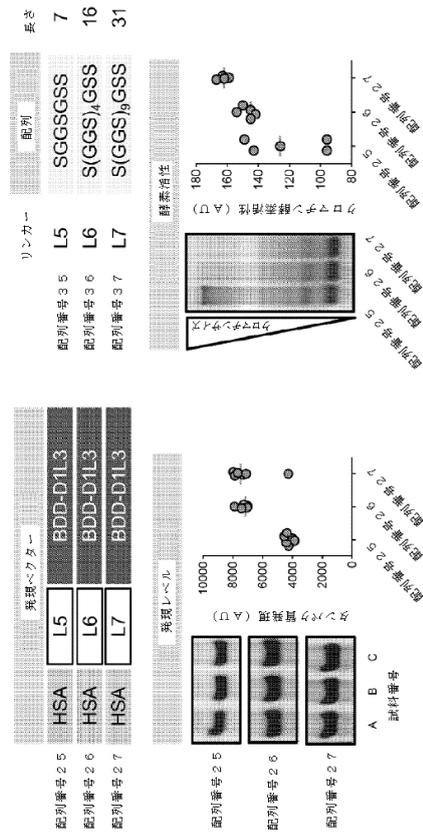
20

【 図 1 9 】

| 配列番号 | リンカー | 配列 | 長さ | 特性 |
|----------|------|----|------|--------|
| 配列番号 2 2 | HSA | L2 | D1L3 | |
| 配列番号 2 3 | HSA | L3 | D1L3 | 17±5.5 |
| 配列番号 2 4 | HSA | L4 | D1L3 | 22±6.9 |

| 配列番号 | リンカー | 配列 | 長さ | 特性 |
|----------|------|-------------------------|----|-----|
| 配列番号 3 2 | L2 | (GGGG) ₃ | 15 | 柔軟性 |
| 配列番号 3 3 | L3 | (AP) ₇ | 14 | 剛性 |
| 配列番号 3 4 | L4 | A(EAAAK) ₂ A | 12 | 剛性 |

【 図 2 0 】

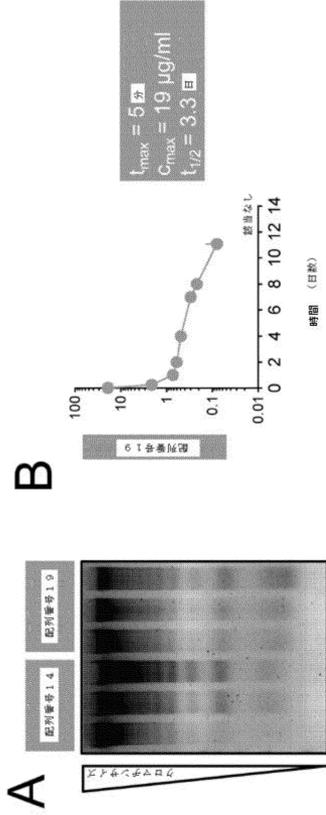


30

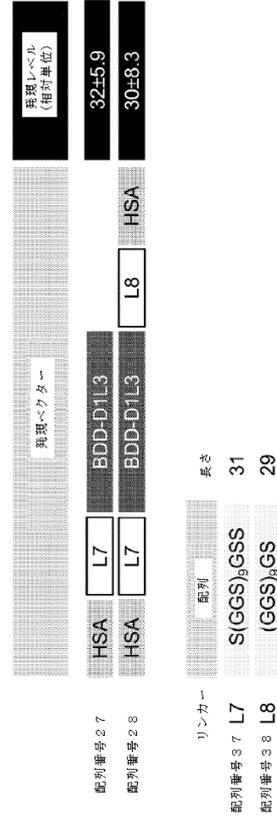
40

50

【 図 2 1 】



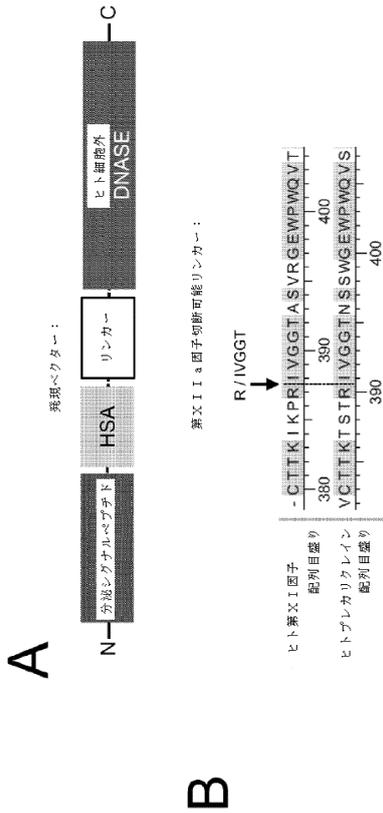
【 図 2 2 】



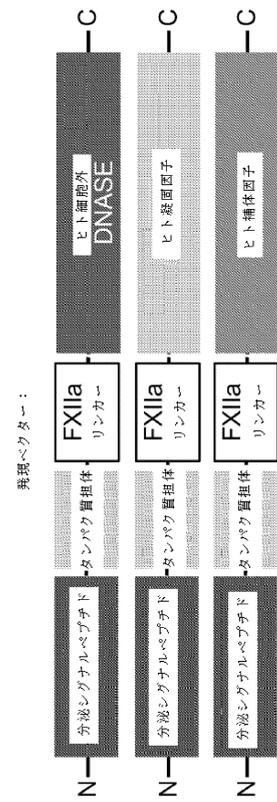
10

20

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



30

40

50

【配列表】

2022504400000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/55178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 9/22, 9/10, 9/00 (2020.01)

CPC - C12N 9/22, 9/13, 9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------------------|--|---|
| X --- Y --- A | US 2004/0138156 A1 (SCHNEIDER, MC, et al.) 15 July 2004; Paragraphs [0029], [0077], [0082]-[0084], [0090], [0170] | 84, 85, 86/84, 86/85 ----- 87/86/84, 87/86/85 ----- 1-7, 8/1-7, 9/8/1-7, 10, 11, 12/10, 12/11, 13/12/10, 13/12/11, 14, 15, 20, 21/1, 21/2, 22/21/1, 22/21/2, 23/22/21/1, 23/22/21/2, 24/22/21/1, 24/22/21/2, 25/21/1, 25/21/2, 26/25/21/1, 26/25/21/2, 27/25/21/1, 27/25/21/2, 28, 29 |
| Y | US 6,656,685 B2 (UTERMOHLEN, J. et al.) 02 December 2003; Abstract; Column 3, Lines 43-59; Column 7, Lines 8-10 | 87/86/84, 87/86/85 |
| A | JIMENEZ-ALCAZAR, M, et al. Host DNases Prevent Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps. Science. 01 December 2017, Vol. 358; Pages 1202-1206; http://science.sciencemag.org/ ; Page 1 of 5, Abstract; Page 4 of 5, Right Column, Second Paragraph. | 1-7, 8/1-7, 9/8/1-7, 10, 11, 12/10, 12/11, 13/12/10, 13/12/11, 14, 15, 20, 21/1, 21/2, 22/21/1, 22/21/2, 23/22/21/1, Next Page ... |

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 19 February 2020 (19.02.2020) | Date of mailing of the international search report 03 MAR 2020 |
|--|--|

40

| | |
|---|--|
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |
|---|--|

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/55178

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>---Continued from Previous Page---</p> <p>JIMENEZ-ALCAZAR, M, et al. Host DNases Prevent Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps. Science. 01 December 2017, Vol. 358; Pages 1202-1206; http://science.sciencemag.org/; Page 1 of 5, Abstract; Page 4 of 5, Right Column, Second Paragraph.</p> | <p>---Continued from Previous Page---</p> <p>... 23/22/21/2, 24/22/21/1, 24/22/21/2, 25/21/1, 25/21/2, 26/25/21/2, 26/25/21/2, 27/25/21/1, 27/25/21/2, 28, 29</p> |
| A | <p>WO 2018/134419 A1 (UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF) 26 July 2018; Page 3, Second Paragraph</p> | <p>1-7, 8/1-7, 9/8/1-7, 10, 11, 12/10, 12/11, 13/12/10, 13/12/11, 14, 15, 20, 21/1, 21/2, 22/21/1, 22/21/2, 23/22/21/1, 23/22/21/2, 24/22/21/1, 24/22/21/2, 25/21/1, 25/21/2, 26/25/21/2, 26/25/21/2, 27/25/21/1, 27/25/21/2, 28, 29</p> |
| A | <p>WO 2011/053982 A2 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) 05 May 2011; Paragraph [0009]; Page 91; SEQ ID NO: 148; Claims 1, 23, 26</p> | <p>1-7, 8/1-7, 9/8/1-7, 10, 11, 12/10, 12/11, 13/12/10, 13/12/11, 14, 15, 20, 21/1, 21/2, 22/21/1, 22/21/2, 23/22/21/1, 23/22/21/2, 24/22/21/1, 24/22/21/2, 25/21/1, 25/21/2, 26/25/21/2, 26/25/21/2, 27/25/21/1, 27/25/21/2, 28, 29</p> |

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/55178

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 16-19, 36-42, 48-50, 55-59, 61-83, 88-101
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Supplemental Page

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

Group I: Claims 1-15, 20-29, 84-87

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/55178

-----Continued from Box No. III: Unity of Invention is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-15, 20-29, and 84-87 (each in part) are directed toward a DNase1-like 3 (DIL3) variant.

Group II: Claims 30-35, 43, and 84-87 (each in part) are directed toward a DNase 1 (D1) variant.

Group III: Claims 44-47, 51, and 84-87 (each in part) are directed toward a DNase1-like 1 (D1L1) variant.

Group IV: Claims 52-54, 60, and 84-87 (each in part) are directed toward a DNase1-like 2 (D1L2) variant.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a DNase1-like 3 (DIL3) variant, not present in any of Groups II, III or IV; the special technical features of Group II include a DNase 1 (D1) variant, not present in any of Groups I, III or IV; the special technical features of Group III include a DNase1-like 1 (D1L1) variant, not present in any of Groups I, II, or IV; the special technical features of Group IV include a DNase1-like 2 (D1L2) variant, not present in any of Groups I, II, or III.

Groups I-IV share the technical features comprising: a DNase variant comprising an amino acid sequence.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2011/053982 A2 (UNIVERSITY OF WASHINGTON) (hereinafter "Washington").

Washington discloses a DNase variant comprising an amino acid sequence (claims 1-2, 26).

Groups II-IV share the technical features comprising: a DNase variant with one or more substituted or deleted cysteine residues.

These shared technical features are previously disclosed by Washington, as above.

Washington discloses a DNase variant (claims 1-2, 26) with one or more substituted or deleted cysteine residues (paragraph [0071]).

Since none of the special technical features of the Groups I-IV inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Washington reference, unity of invention is lacking.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 14/765 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 1/18 (2006.01)
 C 1 2 N 15/57 (2006.01)
 A 6 1 K 47/60 (2017.01)
 A 6 1 K 38/46 (2006.01)
 A 6 1 K 38/38 (2006.01)
 A 6 1 K 47/64 (2017.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/18 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)

F I

C 0 7 K 14/765
 C 1 2 N 15/63
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 1/18
 C 1 2 N 15/57
 A 6 1 K 47/60
 A 6 1 K 38/46
 A 6 1 K 38/38
 A 6 1 K 47/64
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 27/02

テーマコード (参考)

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

Z

(32)優先日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/775,563

(32)優先日 平成30年12月5日(2018.12.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/742,682

(32)優先日 平成30年10月8日(2018.10.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

トリート 7 0 0 シーノオー ニュートロリス インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B050 CC04 CC05 CC07 DD11 FF11C HH01 LL01

4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA77X AA79X AA87X AA90X AB01 AC14
 BA02 CA31 CA44

F ターム (参考)

4C076 AA12 AA93 AA94 BB01 BB02 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21
BB27 BB31 CC07 CC10 CC11 CC14 CC15 CC16 CC17 CC19 CC21
CC27 CC41 EE41 EE59 FF31 FF63

4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA41 BA44
DC01 DC22 MA17 MA52 MA55 MA56 MA58 MA63 MA65 MA66 NA03
NA05 NA12 NA14 ZA33 ZA36 ZA51 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89
ZB07 ZB11 ZB26 ZC21

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA17 MA52 MA55 MA56 MA58
MA63 MA65 MA66 NA03 NA05 NA12 NA14 ZA33 ZA36 ZA51 ZA59
ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZB07 ZB11 ZB26 ZC21

4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 MA17 MA52 MA55 MA56 MA58 MA63
MA65 MA66 NA03 NA05 NA12 NA14 ZA33 ZA36 ZA51 ZA59 ZA66
ZA75 ZA81 ZA89 ZB07 ZB11 ZB26 ZC21

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA70 DA89 EA20 FA74