

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 303**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C12N 15/62 | (2006.01) |
| C12N 15/55 | (2006.01) |
| C12N 9/22 | (2006.01) |
| C07K 19/00 | (2006.01) |
| A61K 47/50 | (2007.01) |
| A61K 38/46 | (2006.01) |
| C07K 16/44 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/US2012/035614**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149440**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12777116 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2704737**

54 Título: **Composiciones terapéuticas de nucleasa y métodos**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480961 P
29.03.2012 US 201261617241 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
UW Center for Commercialization, 4311 11th
Avenue N.E., Suite 500
Seattle, WA 98105-4608, US

72 Inventor/es:

LEDBETTER, JEFFREY A.;
HAYDEN-LEDBETTER, MARTHA;
ELKON, KEITH y
SUN, XIZHANG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 666 303 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones terapéuticas de nucleasa y métodos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/480.961, presentada el 29 de abril de 2011 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/617.241, presentada el 29 de marzo de 2012. Esta solicitud también se refiere a: solicitud de patente internacional n.º PCT/US2010/055131, presentada el 2 de noviembre de 2010; la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/257.458, presentada el 2 de noviembre de 2009; y la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/370.752, presentada el 4 de agosto de 2010.

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN O DESARROLLO CON FONDOS FEDERALES

15 Esta invención se realizó con el apoyo de los Institutos Nacionales de Salud (Subvenciones AI44257, NS065933 y AR048796), la Asociación para la Investigación del Lupus y el Fondo de Investigación de Ciencia Biomédica del Estado de Washington (2087750). El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

Antecedentes

20 La liberación excesiva de partículas (ribo)nucleoproteicas de células muertas y moribundas puede provocar patología lúpica por dos mecanismos: (i) La deposición o formación *in situ* de complejos de cromatina / anticromatina provoca nefritis y conduce a pérdida de la función renal; y (ii) las nucleoproteínas activan inmunidad innata a través de receptor de tipo toll (TLR) 7, 8 y 9 así como ruta o rutas independientes de TLR. La liberación de nucleoproteínas puede actuar como un antígeno potente para autoanticuerpos en LES, lo que proporciona amplificación de la activación de linfocitos B y CD mediante conexión conjunta de receptores de antígenos y TLR. De este modo, existe la necesidad de un medio para retirar los antígenos inductores y/o atenuar la estimulación inmunitaria, amplificación inmunitaria y enfermedad mediada por complejo inmunitario en sujetos que lo necesiten.

30 Sumario

Se desvela en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un primer dominio de nucleasa que comprende una RNasa humana y un dominio Fc modificado que comprende un dominio Fc de IgG1 humano en el que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S, en la que el primer dominio de nucleasa está acoplado operativamente al dominio Fc y en la que la molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96, 92, 62 o 78; o una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 94. El dominio Fc se modifica de modo que la molécula tenga citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tenga un dominio Fc no modificado. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida tiene un dominio Fc que se ha modificado para reducir la unión con receptores Fcγ, proteínas del complemento, o ambos. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida tiene citotoxicidad reducida al menos 1, 2, 3, 4 o 5 veces en comparación con una molécula de control, por ejemplo, una molécula de nucleasa híbrida sin un dominio Fc modificado.

45 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye además un primer dominio enlazador y el primer dominio de nucleasa está acoplado operativamente al dominio Fc modificado por el primer dominio enlazador.

Como se describe en el presente documento, una molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio Fc modificado que es un dominio Fc de IgG1 mutante. Un dominio Fc mutante comprende una o más mutaciones en los dominios bisagra, CH2 y/o CH3. El dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más de las mutaciones P238S, P331S, SCC, SSS (restos 220, 226 y 229), G236R, L328R, L234A y L235A. Como se describe en el presente documento, un dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S, y/o una o más mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S, y/o mutaciones en una de las tres cisteínas de bisagra (localizada en el resto 220 por numeración de EU) para SCC (en donde CCC se refiere a las tres cisteínas presentes en el dominio de bisagra de tipo silvestre). En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y/o mutaciones en las tres cisteínas de bisagra (localizadas en los restos 220, 226 y 229 por numeración de EU) para SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P238S y SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P238S y SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P331S y SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P331S y SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye una mutación en las tres cisteínas de bisagra para SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres

cisteínas de bisagra para SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye SSS.

Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:59. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:60. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:71. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:72. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:73. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:74. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:75. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:76. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:87. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:88. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:89. Se describe en el presente documento un dominio Fc mutante como se muestra en la SEQ ID NO:90.

En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S, o a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 61, 77 o 91. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida es como se muestra en las SEQ ID NO: 62, 78, 92, 94 o 96.

Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido mediante un dominio enlazador (Gly₄Ser)₄ a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S, o a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 63 o 79. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 64 o 79.

Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un dominio de DNasa1 humana G105R A114F unido mediante un dominio enlazador (Gly₄Ser)₄ a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un dominio de DNasa1 humana G105R A114F unido mediante un dominio enlazador (Gly₄Ser)₄ a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S, unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 65 u 81. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 66 u 82.

En otras realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 62, 78, 92 o 96. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 96. En otros aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 94 o 98. En otros aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98.

Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido mediante un dominio enlazador (Gly₄Ser)₄ a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido mediante un dominio enlazador (Gly₄Ser)₄ a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S, unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 67 u 83. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida como se muestra en las SEQ ID NO: 68 u 84.

En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO: 94 o 98.

En algunos aspectos, la citotoxicidad inducida por una molécula de nucleasa híbrida se reduce en comparación con una molécula de control. En algunos aspectos, la citotoxicidad inducida por una molécula de nucleasa híbrida se

reduce aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % en comparación con una molécula de control. En algunos aspectos, la molécula de nucleasa híbrida tiene citotoxicidad reducida aproximadamente 3-5 veces o al menos aproximadamente 3 veces en comparación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado (por ejemplo, un dominio Fc de tipo silvestre).

En algunos aspectos, la actividad de una molécula de nucleasa híbrida que tiene una DNasa no es menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o >30 veces menor que la actividad de una molécula de DNasa de control. En algunos aspectos, la actividad de una molécula de nucleasa híbrida que tiene una DNasa es aproximadamente igual a la actividad de una molécula de DNasa de control. En algunos aspectos, la actividad de una molécula de nucleasa híbrida que tiene una RNasa no es menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o >30 veces menor que la actividad de una molécula de RNasa de control. En algunos aspectos, la actividad de una molécula de nucleasa híbrida que tiene una RNasa es aproximadamente igual a la actividad de una molécula de RNasa de control.

En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida es un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del primer dominio de nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos de RNasa de tipo silvestre, humana, en el que el primer dominio enlazador es $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, donde n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, en el que la secuencia de aminoácidos del dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos de dominio Fc de IgG1 mutante, humano, y en el que el primer dominio enlazador se acopla al extremo C del primer dominio de nucleasa y el extremo N del dominio Fc.

Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende DNasa 1 humana, de tipo silvestre, unida a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende DNasa1 G105R A114F unida a un dominio Fc de IgG1 humano por un dominio enlazador $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ donde n=0, 1, 2, 3, 4 o 5. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende RNasa 1 humana, de tipo silvestre, unida a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante unido a DNasa1 humana, de tipo silvestre. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que comprende RNasa 1 humana, de tipo silvestre, unida a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante unido a DNasa1 humana G105R A114F. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que es un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del primer dominio de nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos de RNasa, en el que el primer dominio enlazador tiene entre 5 y 32 aminoácidos de longitud, en el que la secuencia de aminoácidos del dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos de dominio Fc, humano, y en el que el primer dominio enlazador se acopla al extremo C del primer dominio de nucleasa y el extremo N del dominio Fc. El dominio enlazador puede incluir $(\text{Gly}_4\text{Ser})_5$ y sitios de restricción BglII, AgeI y XhoI. Se describe en el presente documento una molécula de nucleasa híbrida que es un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del primer dominio de nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos de RNasa humana, en el que el primer dominio enlazador es un péptido de NLG de entre 5 y 32 aminoácidos de longitud, en el que la secuencia de aminoácidos del dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos de dominio Fc mutante, humano, y en el que el primer dominio enlazador se acopla al extremo C del primer dominio de nucleasa y el extremo N del dominio Fc.

En algunas realizaciones, el dominio Fc no se une sustancialmente a un receptor de Fc en una célula humana. En algunas realizaciones, el dominio Fc se modifica para reducir la unión con receptores Fcγ, proteínas del complemento, o ambos. En algunos aspectos la unión del receptor de Fc se reduce aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % en comparación con una molécula de control. En algunos aspectos, la molécula de nucleasa híbrida tiene unión del receptor de Fc reducida aproximadamente 3-5 veces o al menos aproximadamente 3 veces en comparación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado (por ejemplo, un dominio Fc de tipo silvestre).

En algunas realizaciones, la semivida en suero de la molécula es significativamente mayor que la semivida en suero del primer dominio de nucleasa solo. En algunas realizaciones, la actividad nucleasa del primer dominio de nucleasa de la molécula es igual o mayor que la del dominio de nucleasa solo. En algunas realizaciones, la administración de la molécula a un ratón aumenta la tasa de supervivencia del ratón como se mide por un ensayo de modelo de lupus de ratón. En algunos aspectos, la molécula de nucleasa híbrida degrada el ARN en circulación, el ADN o ambos. En otros aspectos, la molécula de nucleasa híbrida degrada el ARN, el ADN o ambos en complejos inmunitarios. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida inhibe la producción de interferón-α. En algunos aspectos la producción de interferón-α se reduce aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81,

82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % en comparación con una molécula de control.

5 En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye una secuencia líder. En algunas realizaciones, la secuencia líder es un péptido VK3LP humano de la familia de cadena ligera kappa humana y la secuencia líder se acopla al extremo N del primer dominio de nucleasa. En realizaciones, el VK3LP tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 100.

10 En algunas realizaciones, la molécula es un polipéptido. En algunas realizaciones, la molécula es un polinucleótido.

15 En algunas realizaciones, el primer dominio de nucleasa comprende una RNasa humana. En algunas realizaciones, la RNasa es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de RNasa expuesta en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la RNasa es un miembro de la familia de RNasa A humana. En algunas realizaciones, la RNasa es una RNasa 1 pancreática humana.

20 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida de acuerdo con la invención reivindicada comprende además una DNasa. En algunas realizaciones, la DNasa es una DNasa humana. En algunas realizaciones, la DNasa es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de DNasa expuesta en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la DNasa se selecciona entre el grupo que consiste en DNasa I humana, TREX1 DNasa 1L3 humana.

En algunas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humano y en el que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con un dominio Fc no modificado.

25 En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 31 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 32 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 18 aminoácidos. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador comprende un péptido gly/ser. En algunas realizaciones, el péptido gly/ser es de la fórmula $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, en la que n es un número entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En algunas realizaciones, el péptido gly/ser incluye $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. En algunas realizaciones, el péptido gly/ser incluye $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$. En algunas realizaciones, el péptido gly/ser incluye $(\text{Gly}_4\text{Ser})_5$. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador incluye al menos un sitio de restricción. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador incluye aproximadamente 12 o más nucleótidos incluyendo al menos un sitio de restricción. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador incluye dos o más sitios de restricción. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador incluye una pluralidad de sitios de restricción. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador comprende un péptido NLG. Los péptidos NLG contienen una secuencia consenso de glucosilación ligada a N. En realizaciones, el péptido NLG tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 99. En algunas realizaciones, el primer dominio enlazador comprende un sitio de glucosilación ligado a N.

45 En algunas realizaciones, el primer dominio de nucleasa está unido al extremo N del dominio Fc. En algunas realizaciones, el primer dominio de nucleasa está unido al extremo C del dominio Fc.

50 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye además un segundo dominio de nucleasa. En algunas realizaciones, los primer y segundo dominios de nucleasa son dominios de nucleasa distintos. En algunas realizaciones, los primer y segundo dominios de nucleasa son los mismos dominios de nucleasa. En algunas realizaciones, el segundo dominio de nucleasa está unido al extremo C del dominio Fc. En algunas realizaciones, el segundo dominio de nucleasa está unido al extremo N del dominio Fc. En algunas realizaciones, el segundo dominio de nucleasa está unido al extremo C del primer dominio de nucleasa. En algunas realizaciones, el segundo dominio de nucleasa está unido al extremo N del primer dominio de nucleasa.

55 También se desvela en el presente documento un polipéptido dimérico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende un primer dominio de nucleasa y un dominio Fc, en el que el primer dominio de nucleasa está acoplado operativamente con el dominio Fc. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es una segunda molécula de nucleasa híbrida que comprende un segundo dominio de nucleasa y un segundo dominio Fc, en el que el segundo dominio de nucleasa está acoplado operativamente con el segundo dominio Fc.

60 También se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de nucleasa híbrida y/o al menos un polipéptido dimérico como se describe en el presente documento, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

También se desvela en el presente documento una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida desvelada en el presente documento. También se desvela en el presente documento un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento. También se desvela en el presente documento una célula hospedadora transformada con un vector de expresión recombinante desvelado en el presente documento.

También se desvela en el presente documento un método para preparar una nucleasa híbrida desvelada en el presente documento, que comprende: proporcionar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de nucleasa híbrida; y mantener la célula hospedadora en condiciones en las que se expresa la molécula de nucleasa híbrida.

También se desvela en el presente documento un método para tratar y prevenir una afección asociada con una respuesta inmunitaria anómala, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una molécula de nucleasa híbrida aislada desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, la afección es una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, una forma experimental de uveorretinitis, tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, uveítis facogénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hbs negativa, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis, dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico (LES) y enfermedad del tejido conectivo. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es LES.

También se desvela en el presente documento un método para tratar LES que comprende administrar a un sujeto una composición que contiene nucleasa en una cantidad eficaz para degradar complejos inmunitarios que contienen ARN, ADN o tanto ARN como ADN. En algunos aspectos, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y una molécula de nucleasa híbrida como se describe en el presente documento. En otros aspectos, La composición incluye una molécula de nucleasa híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 62, 78, 92, 94, 96 o 98.

Breve descripción de algunas vistas de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, y dibujos adjuntos, donde:

La FIG. 1 muestra una estructura prototípica para crear diferentes realizaciones de moléculas de nucleasa híbridas.

La FIG. 2 muestra la concentración de RSLV-124 recuperado de suero de ratón después de una única inyección intravenosa.

La FIG. 3 muestra los resultados de un ensayo de actividad enzimática de RNasa en RLSV-124 recuperado de suero de ratón como se mide en unidades de fluorescencia relativas (UFR) a lo largo del tiempo.

La FIG. 4 muestra la concentración de RSLV-124 en suero de ratón como se extrapola a partir de la actividad enzimática de RNasa de la molécula.

La FIG. 5 muestra el análisis de difusión enzimática radial individual (DERI) de suero de dos ratones transgénicos (Tg) para RNasa en comparación con un ratón B6 normal.

La FIG. 6 muestra la concentración de RNasaA en ratones Tg y doble Tg (DTg) medida por ELISA. Cada punto representa la concentración medida en un ratón individual.

La FIG. 7 muestra la supervivencia de ratones Tg frente a DTg TLR7.1xRNasaA.

La FIG. 8 muestra PCR cuantitativa de IRG en bazo de ratones Tg frente a DTg.

La FIG. 9 muestra una transferencia de Western en sobrenadantes de transfección de COS de construcciones de RSLV 125-129 (SEQ ID NO 208-217).

La FIG. 10 muestra el análisis de DERI que compara alícuotas de proteínas purificadas por proteína A de sobrenadantes de COS transfectados por RSLV.

La FIG. 11a-c muestra los resultados de un ensayo de actividad nucleasa de DNasa realizado en proteína purificada por proteína A de sobrenadantes de COS7 transfectados con plásmidos de fusión de RSLV.

La FIG. 12 muestra las UFR (unidades de fluorescencia relativas) en función del tiempo para cada proteína.

La FIG. 13 muestra una representación de Lineweaver Burk de las diferentes moléculas ensayadas.

La FIG. 14 muestra datos de citotoxicidad que representan gráficamente el porcentaje de células muertas en función de la concentración de proteína de fusión para moléculas de RNasal_g con un dominio Fc de tipo silvestre o mutante.

La FIG. 15 muestra superposiciones de histogramas de células teñidas con THP-1 después de 72 horas.

La FIG. 16 muestra la capacidad de RSLV-132 para inhibir la producción de interferón-a inducida por complejos inmunitarios de enfermos de LES.

La FIG. 17 muestra la capacidad *in vivo* de RSLV-132 para inhibir la producción de interferón- α inducida por ARN.

La FIG. 18 muestra un ensayo de actividad enzimática RNasa de los dos lotes de producción de RSLV-132 que se han almacenado durante hasta 8 semanas a 4 C, en comparación con RNasa de tipo silvestre y RSLV-124.

La FIG. 19 muestra un ensayo de actividad enzimática de RNasa de RSLV-133, RSLV-123 y RSLV-124 en relación con RNasa A como se mide en UFR a lo largo del tiempo.

La FIG. 20 muestra un ensayo de actividad enzimática de DNasa de RSLV-133 y RSLV-123 en relación con DNasa 1 como se mide en UFR a lo largo del tiempo.

La FIG. 21 muestra los resultados de un experimento de digestión en gel que compara la capacidad de RSLV-133 para digerir ADN en relación con RSLV-123 y DNasa 1 de tipo silvestre.

La FIG. 22 muestra la unión de RSLV-124 y RSLV-132 con células THP1 que portan receptor de Fc mediante análisis de FACS midiendo la intensidad de fluorescencia media.

Descripción detallada

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria multisistémica caracterizada por la presencia de altos títulos de autoanticuerpos dirigidos contra nucleoproteínas propias. Hay fuertes pruebas de que una eliminación o un procesamiento defectuoso de células muertas y moribundas en LES conduce a enfermedad, predominantemente mediante la acumulación de ribo y desoxirribonucleoproteínas (nucleoproteínas abreviadas). Las nucleoproteínas provocan daño mediante tres mecanismos: i) activación del sistema inmunitario innato para producir citocinas inflamatorias; ii) actuación como antígenos para generar complejos inmunitarios en circulación; y iii) actuación como antígenos para generar formación de complejo *in situ* en sitios locales tales como el riñón. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la digestión de los ácidos nucleicos extracelulares tiene un efecto terapéutico *in vivo*.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para tratar enfermedades caracterizadas por eliminación o procesamiento defectuoso de células apoptóticas y residuos celulares, tales como LES, administrando una cantidad eficaz de una actividad nucleasa para degradar complejos que contienen ARN y ADN extracelular. Dicho tratamiento puede inhibir la producción de interferones (IFN) de tipo I que son citocinas prominentes en LES y están fuertemente correlacionados con la actividad de enfermedad y nefritis.

En una realización, se trata a un sujeto administrando una actividad nucleasa que es una actividad DNasa o una RNasa, preferentemente en forma de una molécula de nucleasa híbrida. En un aspecto, la actividad nucleasa es un primer dominio de nucleasa. En otro aspecto, el dominio de nucleasa se acopla a un dominio Fc modificado de modo que la molécula tenga citotoxicidad reducida. En un aspecto una molécula de nucleasa híbrida incluye un segundo dominio de nucleasa.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar LES en el que se administra una cantidad eficaz de una composición que contiene nucleasa a un sujeto. En un aspecto, el tratamiento da como resultado la degradación de complejos inmunitarios que contienen ARN, ADN o tanto ARN como ADN. En otro aspecto, el tratamiento da como resultado la inhibición de interferones de tipo I, tales como interferón- α en un sujeto. En un aspecto, un método para tratar a un sujeto comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de una molécula de nucleasa híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 62, 78, 92, 94, 96 o 98. En otro aspecto, la composición es una molécula de nucleasa híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96 o 98.

Los términos usados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen como se expone a continuación a no ser que se especifique otra cosa. En caso de conflicto directo con un término usado en una solicitud de patente provisional principal, regirá el término usado en la presente memoria descriptiva.

"Aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupo R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos miméticos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos se pueden citar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma análoga, se pueden citar por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

Una "sustitución de aminoácidos" se refiere al reemplazo de al menos un resto de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de partida) con un segundo resto de aminoácido de "reemplazo" diferente. Una "inserción de aminoácidos" se refiere a la incorporación de al menos un aminoácido adicional en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Aunque la inserción consistirá habitualmente en la inserción de uno o dos restos de aminoácidos, se pueden realizar las presentes "inserciones de péptidos" mayores, por ejemplo inserciones de aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez, quince o veinte restos de aminoácidos. El resto o los restos insertados pueden ser de origen natural o de origen no natural como se ha desvelado anteriormente. Una "supresión de aminoácidos" se refiere a la retirada de al menos un resto de aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como de polímeros de aminoácidos de origen natural y de polímeros de aminoácidos de origen no natural.

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma bien monocatenaria o bien bicatenaria. A no ser que esté limitada de forma específica, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degradados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, pueden realizarse sustituciones de codones degradados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985); y Cassol *et al.*, 1992; Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). Para arginina y leucina, las modificaciones en la segunda base también pueden ser conservativas. El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar compuestos por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, el polinucleótido puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido también puede contener una o más bases modificadas o cadenas principales de ADN o ARN modificadas para mayor estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco habituales tales como inosina. Puede realizarse una diversidad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de nucleasa híbrida" se refiere a polinucleótidos o polipéptidos que comprenden al menos un dominio de nucleasa y al menos un dominio Fc. Las moléculas de nucleasa híbridas también se denominan proteína o proteínas de fusión y gen o genes de fusión. Por ejemplo, en una realización, una molécula de nucleasa híbrida puede ser un polipéptido que comprende al menos un dominio Fc unido a un dominio de nucleasa tal como DNasa y/o RNasa. Como otro ejemplo, una molécula de nucleasa híbrida puede incluir un dominio de nucleasa RNasa, un dominio enlazador y un dominio Fc. Los ejemplos de moléculas de nucleasa híbrida incluyen SEQ ID NO:62, 64, 66, 68, 70, 78, 80, 82, 84, 86, 92, 94, 96 y 98. Otros ejemplos se describen con más detalle a continuación. En una realización una molécula de nucleasa híbrida de la invención puede incluir modificaciones adicionales. En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida puede modificarse para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, o un marcador).

Como se usa en el presente documento, una "molécula de nucleasa biespecífica híbrida", o una "molécula de binucleasa" se refiere a una molécula de nucleasa híbrida con 2 o más dominios de nucleasa, por ejemplo, un dominio de DNasa y un dominio de RNasa.

En determinados aspectos, las moléculas de nucleasa híbrida de la invención pueden emplear uno o más "dominios enlazadores", tales como enlazadores polipeptídicos. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio enlazador" se refiere a una secuencia que conecta dos o más dominios en una secuencia lineal. Como se usa en el presente documento, la expresión "enlazador polipeptídico" se refiere a una secuencia peptídica o polipeptídica (por ejemplo, una secuencia peptídica o polipeptídica sintética) que conecta dos o más dominios en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena polipeptídica. Por ejemplo, pueden usarse enlazadores polipeptídicos para conectar un dominio de nucleasa con un dominio Fc. Preferentemente, dichos enlazadores polipeptídicos pueden proporcionar flexibilidad a la molécula polipeptídica. En determinadas realizaciones el enlazador polipeptídico se usa para conectar (por ejemplo, fusionar genéticamente) uno o más dominios Fc y/o uno o más dominios de nucleasa. Una molécula de nucleasa híbrida de la invención puede comprender más de un dominio enlazador o enlazador peptídico.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "enlazador polipeptídico gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en restos de glicina y serina. Un enlazador polipeptídico gly/ser ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos Ser(Gly₄Ser)_n. En una realización, n=1. En una realización, n=2. En otra realización, n=3, es decir, Ser(Gly₄Ser)₃. En otra realización, n=4, es decir, Ser(Gly₄Ser)₄. En otra realización, n=5. En otra realización más, n=6. En otra realización, n=7. En otra realización más, n=8. En otra realización, n=9. En otra realización más, n=10. Otro enlazador polipeptídico gly/ser ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos Ser(Gly₄Ser)_n. En una realización, n=1. En una realización, n=2. En una realización preferida, n=3. En otra realización, n=4. En otra realización, n=5. En otra realización más, n=6.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "unido", "fusionado" o "fusión", se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes o dominios, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Se conocen en la técnica métodos de conjugación química (por ejemplo usando agentes de reticulación heterobifuncional).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "región Fc" se definirá como la parte de una inmunoglobulina nativa formada por los dominios Fc respectivos (o restos de Fc) de sus dos cadenas pesadas.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio Fc" se refiere a una parte de una única cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) en la que el dominio Fc no comprende un dominio Fv. Como tal, el dominio Fc también puede denominarse "Ig" o "IgG". En algunas realizaciones, un dominio Fc comienza en la región bisagra inmediatamente cadena arriba del sitio de escisión de papaina y termina en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En determinadas realizaciones, un dominio Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4 o una variante, parte o fragmento de los mismos. En otras realizaciones, un dominio Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En una realización, un dominio Fc comprende un dominio bisagra (o parte del mismo) fusionado con un dominio CH3 (o parte del mismo). En otra realización, un dominio Fc comprende un dominio CH2 (o parte del mismo) fusionado con un dominio CH3 (o parte del mismo). En otra realización, un dominio Fc consiste en un dominio CH3 o parte del mismo. En otra realización, un dominio Fc consiste en un dominio bisagra (o parte del mismo) y un dominio CH3 (o parte del mismo). En otra realización, un dominio Fc consiste en un dominio CH2 (o parte del mismo) y un dominio CH3. En otra realización, un dominio Fc consiste en un dominio bisagra (o parte del mismo) y un dominio CH2 (o parte del mismo). En una realización, un dominio Fc carece de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En una realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la parte de una molécula Fc que se sabe en la técnica que es necesaria para unión a FcRn. En otra realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la parte de una molécula Fc que se sabe en la técnica que es necesaria para unión a FcγR. En una realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la parte de una molécula Fc que se sabe en la técnica que es necesaria para unión a Proteína A. En una realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la parte de una molécula Fc que se sabe en la técnica que es necesaria para unión a Proteína G. Un dominio Fc en el presente documento se refiere en general a un polipéptido que comprende todo o parte del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Esto incluye, pero sin limitación, polipéptidos que comprenden los dominios CH1, bisagra, CH2 y/o CH3 completos así como fragmentos de dichos péptidos que comprenden solamente, por ejemplo, el dominio bisagra, CH2 y CH3. El dominio Fc puede obtenerse de una inmunoglobulina de cualquier especie y/o cualquier subtipo, incluyendo, pero sin limitación, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM humano. El dominio Fc abarca moléculas de Fc nativas y variantes de Fc. Como con variantes de Fc y Fc nativos, la expresión dominio Fc incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, bien digeridas a partir de anticuerpo completo o bien producidas por otros medios. La asignación de números de restos de aminoácidos a un dominio Fc está de acuerdo con las definiciones de Kabat. Véase, por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest (secciones de Tabla de contenidos, Introducción y Secuencias de región constante), 5ª edición, Bethesda, MD:NIH vol. 1:647-723 (1991); Kabat et al., "Introduction" Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, NIH, 5ª edición, Bethesda, MD vol. 1:xiii-xcvi (1991); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

55 Como se expone en el presente documento, un experto en la materia entenderá que puede modificarse cualquier dominio Fc de tal forma que varíe en cuanto a su secuencia de aminoácidos respecto del dominio Fc nativo de una molécula de inmunoglobulina de origen natural. En determinadas realizaciones ejemplares, el dominio Fc conserva una función efectora (por ejemplo, unión a FcγR).

60 Los dominios Fc de un polipéptido de la invención pueden obtenerse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 obtenido de una molécula de IgG1 y una región bisagra obtenida de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una región bisagra quimérica obtenida, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una bisagra quimérica obtenida, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

65

Una secuencia polipeptídica o de aminoácidos "obtenida de" un polipéptido o proteína designado se refiere al origen del polipéptido. Preferentemente, la secuencia polipeptídica o de aminoácidos que se obtiene de una secuencia particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a esa secuencia o una parte de la misma, en la que la parte consiste en al menos 10-20 aminoácidos, preferentemente al menos 20-30 aminoácidos, más preferentemente al menos 30-50 aminoácidos o que de otro modo un experto en la materia puede identificar que tiene su origen en la secuencia.

Los polipéptidos obtenidos de otro péptido pueden tener una o más mutaciones en relación con el polipéptido de partida, por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos que se han sustituido con otro resto de aminoácido o que tienen una o más inserciones o supresión de restos de aminoácidos.

Un polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que no es de origen natural. Dichas variantes tienen necesariamente menos de 100 % de identidad o similitud de secuencia con las moléculas de nucleasa híbrida de partida. En una realización preferida, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % a menos de 100 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida, más preferentemente de aproximadamente 80 % a menos de 100 %, más preferentemente de aproximadamente 85% a menos de 100 %, más preferentemente de aproximadamente 90% a menos de 100 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) y más preferentemente de aproximadamente 95 % a menos de 100 %, por ejemplo, sobre la longitud de la molécula variante.

En una realización, hay una diferencia de un aminoácido entre una secuencia polipeptídica de partida y la secuencia obtenida de la misma. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) a los restos de aminoácidos de partida, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia.

En una realización, un polipéptido de la invención consiste en, consiste esencialmente en o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la Tabla 1 y variantes funcionalmente activas de la misma. En una realización, un polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos expuesta en la Tabla 1. En una realización, un polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos contigua al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos contigua expuesta en la Tabla 1. En una realización, un polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 o 500 (o cualquier número entero dentro de estos números) aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos expuesta en la Tabla 1.

En una realización, los péptidos de la invención están codificados por una secuencia de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser útiles para varias aplicaciones, incluyendo: clonación, terapia génica, expresión y purificación de proteínas, introducción de mutaciones, vacunación de ADN de un hospedador que lo necesite, generación de anticuerpos para, por ejemplo, inmunización pasiva, PCR, generación de cebadores y sondas, diseño y generación de ARNip (véase, por ejemplo, el sitio web de Dharmacon siDesign), y similares. En una realización, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende, consiste en o consiste esencialmente en, una secuencia de nucleótidos seleccionada de la Tabla 1. En una realización, una secuencia de nucleótidos incluye una secuencia de nucleótidos al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos expuesta en la Tabla 1. En una realización, una secuencia de nucleótidos incluye una secuencia de nucleótidos contigua al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos contigua expuesta en la Tabla 1. En una realización, una secuencia de nucleótidos incluye una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 o 500 (o cualquier número entero dentro de estos números) nucleótidos contiguos de una secuencia de aminoácidos expuesta en la Tabla 1.

Las moléculas de nucleasa híbridas preferidas de la invención comprenden un dominio Fc de IgG1 humano mutante, en el que la RNasa humana está acoplada operativamente al dominio Fc y en el que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado. Sin embargo, las secuencias pueden comprender una o más secuencias de otra especie de mamífero. Por ejemplo, un dominio Fc o dominio de nucleasa de primate puede incluirse en la secuencia objeto. Como alternativa, pueden estar presentes uno o más aminoácidos murinos en un polipéptido. En algunas realizaciones, las secuencias polipeptídicas de la invención no son inmunogénicas y/o tienen inmunogenicidad reducida.

Un experto en la materia también entenderá que las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden alterarse de tal forma que varíen en cuanto a su secuencia con respecto a las secuencias de origen natural o nativas de las que proceden, conservando al mismo tiempo la actividad deseable de las secuencias nativas. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que conducen a sustituciones conservativas o

cambios en restos de aminoácidos "no esenciales". Puede crearse una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de una molécula de nucleasa híbrida obtenida de una inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio Fc) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por la PCR.

Las moléculas de nucleasa híbridas peptídicas de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo, en restos de aminoácidos esenciales o no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, se reemplaza preferentemente un resto de aminoácido no esencial en un polipéptido de unión por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, puede reemplazarse una serie de aminoácidos por una serie estructuralmente similar que difiere en cuanto a su orden y/o composición de miembros de la familia de cadena lateral. Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden incorporarse en polipéptidos de unión de la invención y explorarse con respecto a su capacidad para unirse con la diana deseada.

El término "aliviar" se refiere a cualquier resultado terapéuticamente beneficioso en el tratamiento de una patología, por ejemplo, una patología autoinmunitaria (por ejemplo, LES), incluyendo profilaxis, reducción de la gravedad o progresión, remisión o cura de la misma.

La expresión "*in situ*" se refiere a procesos que se producen en una célula viva que crece separada de un organismo vivo, por ejemplo, que crece en cultivo tisular.

La expresión "*in vivo*" se refiere a procesos que se producen en un organismo vivo.

El término "mamífero" o "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento incluye tanto seres humanos como no humanos e incluye pero sin limitación seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

La expresión porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o restos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los expertos) o por inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir sobre una región de la secuencia que se compara, por ejemplo, sobre un dominio funcional o, como alternativa, existir sobre la longitud completa de las dos secuencias para comparar.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o por inspección visual (véase en general Ausubel et al., mencionado posteriormente).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

La expresión "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para modular la agregación de proteínas en una célula.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es eficaz para aliviar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "cantidad profilácticamente eficaz" ya que la profilaxis puede considerarse terapia.

- 5 Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Composiciones

10 Moléculas de nucleasa híbridas

En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye una molécula de nucleasa híbrida que comprende una RNasa humana y un dominio Fc de IgG1 humano mutante, en la que la RNasa humana está acoplada operativamente al dominio Fc y en la que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado, y en la que la molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96, 92, 62 o 78; o una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 94. En algunas realizaciones la molécula de nucleasa híbrida es una proteína de nucleasa. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida es un polinucleótido de nucleasa.

20 En algunas realizaciones, el dominio de nucleasa se une al dominio Fc mediante un dominio enlazador. En algunas realizaciones, el dominio enlazador es un péptido enlazador. En algunas realizaciones, el dominio enlazador es un nucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye una molécula líder, por ejemplo, un péptido líder. En algunas realizaciones, la molécula líder es un péptido líder situado en el extremo N del dominio de nucleasa. En realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende un péptido líder en el extremo N de la molécula, en el que el péptido líder se escinde después de la molécula de nucleasa híbrida. Se conocen bien en la técnica métodos para generar secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido líder fusionado con una proteína recombinante. En realizaciones, cualquiera de las moléculas de nucleasa híbridas de la presente invención puede expresarse con o sin un líder fusionado con su extremo N. Un experto en la materia puede predecir y/o deducir la secuencia proteica de una molécula de nucleasa híbrida de la presente invención después de escisión de un péptido líder fusionado. Se exponen ejemplos de moléculas de nucleasa híbridas de la presente invención que incluyen adicionalmente un péptido líder de VK3 (VK3LP), en las que el péptido líder se fusiona con el extremo N de la molécula de nucleasa híbrida, en las SEQ ID NO: 92 (RSLV-132) y 94 (RSLV-133). Las secuencias de nucleótidos correspondientes se exponen en las SEQ ID NO: 91 y 93, respectivamente. En realizaciones, después de escisión del líder de VK3, estas moléculas de nucleasa híbridas tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 96 (RSLV-132) y 98 (RSLV-133), respectivamente. Las secuencias de nucleótidos correspondientes se exponen en las SEQ ID NO: 95 y 97, respectivamente. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de la presente invención se expresa sin un péptido líder fusionado con su extremo N y la molécula de nucleasa híbrida resultante tiene una metionina N terminal.

40 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluirá un codón de terminación. En algunas realizaciones, el codón de terminación estará en el extremo C del dominio Fc.

45 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye además un segundo dominio de nucleasa. En algunas realizaciones, el segundo dominio de nucleasa se une al dominio Fc mediante un segundo dominio enlazador. En algunas realizaciones, el segundo dominio enlazador estará en el extremo C del dominio Fc. La Figura 1 muestra al menos una realización de una molécula de nucleasa híbrida. Como se describe en el presente documento, una molécula de nucleasa híbrida puede incluir una secuencia mostrada en la Tabla 1.

50 En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida es una molécula de RNasa o una molécula multienzimática (por ejemplo tanto RNasa como DNasa o dos ARN nucleasas con diferente especificidad por el sustrato) unidas con un dominio Fc de IgG1 humano mutante, en la que la RNasa humana está acoplada operativamente al dominio Fc y en la que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado y en la que la molécula de nucleasa híbrida comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96, 92, 62 o 78; o una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 94 que se une específicamente con complejos inmunitarios extracelulares. En algunas realizaciones, el dominio Fc no se une eficazmente con receptores Fcγ. En un aspecto, la molécula de nucleasa híbrida no se une eficazmente con C1q. En otros aspectos, la molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio Fc en fase de IgG1. En otros aspectos, la molécula de nucleasa híbrida comprende además mutaciones en los dominios bisagra, CH2 y/o CH3. En otros aspectos, las mutaciones son P238S, P331S o N297S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos de dichos aspectos, las mutaciones en una o más de tres cisteínas de bisagra pueden ser SCC o SSS. En otros aspectos, las moléculas contienen la bisagra SCC, pero por lo demás son de tipo silvestre para los dominios Fc, CH2 y CH3 de IgG1 humano y se unen eficazmente a receptores de Fc, facilitando la captación de la molécula de nucleasa híbrida en el compartimento endocítico de células con las que se unen. En otros aspectos, la molécula tiene actividad contra sustratos de ARN mono y/o bicatenario.

En algunos aspectos, un dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y/o una o más mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y/o mutaciones en las tres cisteínas de bisagra para SSS o en una cisteína de bisagra para SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SCC o SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P238S SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P331S y SCC o SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres cisteínas de bisagra para SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en una de las tres cisteínas de bisagra para SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye SCC o SSS. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida es como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO 62, 78, 92, 94, 96 o 98. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S, o un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida es como se muestra en las SEQ ID NO: 61, 77 o 91. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO: 62, 78, 92 o 96.

En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SCC, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio de RNasa1 humana, de tipo silvestre, unido a un dominio Fc de IgG1 humano, mutante, que comprende SSS, P238S y P331S unido mediante un dominio enlazador NLG a un dominio de DNasa1 humana G105R A114F. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO: o 93. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO: 94 o 98.

En algunos aspectos, la actividad de la molécula de nucleasa híbrida es detectable *in vitro* y/o *in vivo*. En algunos aspectos, la molécula de nucleasa híbrida se une con una célula, una célula maligna o una célula cancerosa e interfiere con su actividad biológica.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de RNasa multifuncional que está unida a otra enzima o anticuerpo que tiene especificidad de unión, tal como un scFv dirigido a ARN o un segundo dominio de nucleasa con las mismas o diferentes especificidades que el primer dominio.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de DNasa multifuncional que está unida a otra enzima o anticuerpo que tiene especificidad de unión, tal como un scFv dirigido a ADN o un segundo dominio de nucleasa con las mismas o diferentes especificidades que el primer dominio.

En otro aspecto, una molécula de nucleasa híbrida se adapta para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero administrando una molécula de nucleasa híbrida unida a una región Fc, en una cantidad terapéuticamente eficaz al mamífero que lo necesite, en el que la enfermedad se previene o se trata. En otros aspectos, la enfermedad o el trastorno es una enfermedad autoinmunitaria o cáncer. En algunos de dichos aspectos, la enfermedad autoinmunitaria es diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, una forma experimental de uveorretinitis, tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, pénfigoide, oftalmia del simpático, uveítis facogénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hbs negativa, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis, dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico o enfermedad del tejido conectivo.

En algunas realizaciones, las dianas de la actividad enzimática RNasa de moléculas de nucleasa híbridas de RNasa son principalmente extracelulares, que consisten en, por ejemplo, ARN contenido en complejos inmunitarios con autoanticuerpo anti RNP y ARN expresado en la superficie de células que experimentan apoptosis. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida de RNasa está activa en el ambiente ácido de las vesículas endocíticas. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de RNasa incluye un dominio Fc de tipo silvestre (wt) para, por ejemplo, permitir que la molécula se una con FcR y entre en el compartimento endocítico a través de la ruta de entrada usada por complejos inmunitarios. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de RNasa que incluye un dominio Fc wt se adapta para ser activa tanto extracelularmente como en el ambiente endocítico (en el que puede expresarse TLR7). En algunos aspectos, esto permite que una molécula de nucleasa híbrida de RNasa que incluye un dominio Fc wt detenga la señalización de TLR7 a través de complejos inmunitarios previamente introducidos o por ARN que activan TLR7 después de infección vírica. En algunas realizaciones, la RNasa wt de una molécula de nucleasa híbrida de RNasa no es resistente a la inhibición por un

inhibidor citoplasmático de RNasa. En algunas realizaciones, la RNasa wt de una molécula de nucleasa híbrida de RNasa no está activa en el citoplasma de una célula.

5 En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida que incluye un dominio Fc wt se usa para terapia de una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, LES.

10 En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc con un receptor de Fc (FcR) aumenta, por ejemplo, mediante alteraciones de la glucosilación y/o cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida tiene una o más alteraciones de Fc que aumentan la unión a FcR.

15 Se prevén modos alternativos de construcción de una molécula de nucleasa híbrida unida a un dominio Fc. En algunas realizaciones, la orientación del dominio puede alterarse para construir una molécula de Ig-RNasa o una molécula de Ig-DNasa o una molécula de RNasa-Ig o una molécula de RNasa-Ig que conserva la unión a FcR y tiene dominios de nucleasa activos.

20 En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de DNasa incluyen un dominio Fc wt que puede permitir, por ejemplo, que las moléculas experimenten endocitosis después de unirse con FcR. En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de DNasa pueden ser activas para complejos inmunitarios extracelulares que contienen ADN, por ejemplo, en forma soluble o depositadas como complejos insolubles.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas incluyen tanto DNasa como RNasa. En algunas realizaciones, estas moléculas de nucleasa híbridas pueden mejorar la terapia de LES porque pueden, por ejemplo, digerir complejos inmunitarios que contienen ARN, ADN o una combinación de tanto ARN como ADN; y cuando incluyen además un dominio Fc wt, están activan tanto extracelularmente como en el compartimento endocítico en el que pueden localizarse TLR7 y TLR9.

30 En algunas realizaciones, los dominios enlazadores incluyen variantes de (gly4ser) 3, 4 o 5 que alteran la longitud del enlazador en 5 progresiones de aminoácidos. En otra realización, un dominio enlazador tiene una longitud de aproximadamente 18 aminoácidos e incluye un sitio de glucosilación ligado a N, que puede ser sensible a escisión por proteasa *in vivo*. En algunas realizaciones, un sitio de glucosilación ligado a N puede proteger las moléculas de nucleasa híbridas de la escisión en su dominio enlazador. En algunas realizaciones, un sitio de glucosilación ligado a N puede ayudar a separar el plegamiento de dominios funcionales independientes separados por el dominio enlazador.

35 En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas pueden incluir dominios Fc de IgG1 humano tanto mutantes como de tipo silvestre. En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas pueden expresarse a partir de transfecciones tanto transitorias de COS como estables de CHO. En algunas realizaciones, se conservan tanto la unión de CD80/86 como la actividad RNasa en una molécula de nucleasa híbrida. En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas incluyen construcciones de DNasa1L3-Ig-enlazador-RNasa. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye una construcción de DNasa1-Ig-enlazador-RNasa o una construcción de RNasa-Ig-enlazador-DNasa. En algunas realizaciones, se optimizan los puntos de fusión entre dominios enzimáticos y los otros dominios de la molécula de nucleasa híbrida.

45 En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas incluyen moléculas de nucleasa híbridas de DNasa-Ig y/o moléculas de nucleasa híbridas de DNasa-RNasa.

50 En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye TREX1. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida TREX1 puede digerir cromatina. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida TREX1 es expresada por una célula. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida expresada incluye TREX-1 murina y un dominio Fc murino (wt o mutante). En algunas realizaciones, un dominio enlazador de 20-25 aminoácidos (aa) entre TREX1 y la bisagra de IgG pueden ser necesarios para permitir la actividad DNasa. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida con un dominio enlazador de 15 aa no es activa. En algunas realizaciones, el uso de los dominios enlazadores de 20 y 25 aminoácidos (más 2 o más aminoácidos para incorporar sitios de restricción) da como resultado actividad funcional como se mide por digestión de cromatina. En algunas realizaciones, una región hidrófoba de aproximadamente 72 aa puede retirarse del extremo COOH de TREX-1 antes de la fusión con el dominio Fc mediante el dominio enlazador. En algunas realizaciones, una versión de dominio enlazador de 20 aminoácidos de la molécula de nucleasa híbrida muestra niveles de alta expresión en comparación con controles y/u otras moléculas de nucleasa híbridas. En algunas realizaciones, se usan ensayos cinéticos de enzima para comparar la actividad enzimática de moléculas de nucleasa híbridas y controles de una manera cuantitativa.

60 En algunas realizaciones, puede usarse optimización adicional del punto de fusión elegido para truncamiento de una enzima TREX1 para mejorar la expresión de las moléculas de nucleasa híbridas.

65 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye una molécula de nucleasa híbrida de TREX1-enlazador-dominio Fc de Ig con dominios enlazadores de 20 y/o 25 aa. En algunas realizaciones, el dominio o los

dominios enlazadores son variantes de un casete de (gly4ser)⁴ o (gly4ser)⁵ con uno o más sitios de restricción unidos para incorporación en la construcción de moléculas de nucleasa híbridas. En algunas realizaciones, debido a la dimerización de cabeza a cola útil para la actividad enzimática de TREX1; puede usarse un dominio enlazador más largo, flexible, para facilitar el plegamiento apropiado.

5 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida es una molécula de nucleasa híbrida de tándem de TREX1. En algunas realizaciones, un método alternativo para facilitar el plegamiento de cabeza a cola de TREX1 es generar una molécula de nucleasa híbrida de TREX1-TREX1-Ig que incorpora dos dominios TREX1 en tándem, seguido de un dominio enlazador y un dominio Fc de Ig. En algunas realizaciones, la situación de casetes TREX1 en una posición de cabeza a cola puede corregirse para plegamiento de cabeza a cola en una de las ramas de la inmunoenzima e introducir un único dominio funcional TREX1 en cada rama de la molécula. En algunas realizaciones, cada inmunoenzima de una molécula de nucleasa híbrida tiene dos enzimas TREX1 funcionales unidas a un único dominio Fc de Ig.

15 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye TREX1-enlazador1-Ig-enlazador2-RNasa.

En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye RNasa-Ig-enlazador-TREX1. En algunas realizaciones, se obtienen casetes para fusión tanto amino como carboxilo de cada enzima para incorporación en moléculas de nucleasa híbridas en las que la configuración enzimática se invierte. En algunas realizaciones, la enzima RNasa muestra actividad funcional comparable independientemente de su posición en las moléculas de nucleasa híbridas. En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas pueden diseñarse para ensayar si una configuración particular demuestra expresión y/o función mejorada de los componentes de moléculas de nucleasa híbridas.

25 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye 1L3-Ig. En algunas realizaciones, la DNasa 1L3 se construye a partir de una secuencia murina y se expresa. En algunas realizaciones, la enzima es activa. En algunas realizaciones, se construye y se expresa una nucleasa híbrida de DNasa-Ig-RNasa 1L3 murina. En algunas realizaciones, la molécula incluye 1L3-Ig humana, 1L3-Ig-RNasa humana y/o RNasa-Ig-1L3 humana.

30 En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida incluye DNasa1-Ig. En algunas realizaciones, un alelo variante de origen natural, A114F, que muestra sensibilidad reducida a actina se incluye en una molécula de nucleasa híbrida DNasa1-Ig. En algunas realizaciones, esta mutación se introduce en una molécula de nucleasa híbrida para generar un derivado más estable de DNasa 1 humana. En algunas realizaciones, se prepara una DNasa1-enlazador-Ig que contiene un dominio enlazador de 20 a 25 aa. En algunas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas incluyen RNasa-Ig-enlazador-DNasa1 donde el dominio de DNasa1 se localiza en el lado COOH del dominio Fc de Ig. En algunas realizaciones, se preparan moléculas de nucleasa híbridas que incorporan DNasa1 e incluyen: DNasa 1-enlazador-Ig-enlazador2-RNasa y/o RNasa-Ig-enlazador-DNasal.

Otro aspecto de la presente invención es usar métodos de terapia génica para tratar o prevenir trastornos, enfermedades y afecciones con una o más moléculas de nucleasa híbridas. Los métodos de terapia génica se refieren a la introducción de secuencias de ácido nucleico de moléculas de nucleasa híbridas (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) en un animal para conseguir expresión del polipéptido o polipéptidos de la presente invención. Este método puede incluir introducción de uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido de molécula de nucleasa híbrida de la presente invención unido operativamente con un promotor y cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido diana.

En aplicaciones de terapia génica, se introducen genes de moléculas de nucleasa híbridas en células para conseguir síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz. "Terapia génica" incluye tanto terapias génicas convencionales en las que se consigue un efecto duradero por un único tratamiento como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiésteres con carga negativa por grupos sin carga.

Dominios Fc

55 En la invención reivindicada, una molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio Fc de IgG1 humano mutante, en el que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado. El dominio Fc no contiene una región variable que se une con antígeno. En realizaciones, el dominio Fc no contiene una región variable. Los dominios Fc útiles para producir las moléculas de nucleasa híbridas descritas en el presente documento pueden obtenerse a partir de varias fuentes diferentes. Como se describe en el presente documento, un dominio Fc de la molécula de nucleasa híbrida se obtiene de una inmunoglobulina humana. Se entiende, sin embargo, que el dominio Fc puede obtenerse de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, incluyendo, por ejemplo, una especie de roedor (por ejemplo un ratón, rata, conejo, cobaya) o primate no humano (por ejemplo chimpancé, macaco). Además, el dominio Fc de molécula de nucleasa híbrida o parte del mismo puede obtenerse de cualquier clase de

inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización preferida, se usa el IgG1 de isotipo humano.

5 En la invención reivindicada, una molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio Fc mutante, en el que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende una o más mutaciones en los dominios bisagra, CH2 y/o CH3. En algunos aspectos, un dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y/o una o más mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S, y/o mutaciones en una cisteína de bisagra para SCC o en las tres cisteínas de bisagra para SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y mutaciones en al menos una de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P238S y SCC o SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye P331S y SCC o SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en una de las tres cisteínas de bisagra para SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye SCC. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye mutaciones en las tres cisteínas de bisagra para SSS. En algunos aspectos, un dominio Fc mutante incluye SSS. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de nucleasa híbrida es como se muestra en las SEQ ID NO 61, 77, 91, 93, 95 o 97. En algunos aspectos, una molécula de nucleasa híbrida es como se muestra en las SEQ ID NO 62, 78, 92, 94, 96 o 98.

25 Está disponible una diversidad de secuencias génicas de dominios Fc (por ejemplo, secuencias génicas de región constante humana) en forma de depósitos públicamente disponibles. Pueden seleccionarse dominios de región constante que comprenden una secuencia de dominio Fc que tiene una función efectora particular (o que carece de una función efectora particular) con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes codificantes de anticuerpos y pueden obtenerse secuencias de dominio Fc adecuadas (por ejemplo secuencias de bisagra, CH2 y/o CH3, o partes de las mismas) de estas secuencias usando técnicas reconocidas en este campo. El material genético obtenido usando cualquiera de los métodos anteriores puede alterarse o sintetizarse después para obtener polipéptidos de la presente invención. Se apreciará además que el alcance de la presente invención abarca alelos, variantes y mutaciones de secuencias de ADN de región constante.

35 Las secuencias de dominios Fc pueden clonarse, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa y cebadores que se seleccionan para amplificar el dominio de interés. Para clonar una secuencia de dominio Fc de un anticuerpo, puede aislarse ARNm de hibridoma, bazo o células linfoides, transcribirse de forma inversa a ADN y genes de anticuerpos amplificados por PCR. Se describen métodos de amplificación de PCR en detalle en las patentes de Estados Unidos N.º 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; y en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270). La PCR puede iniciarse mediante cebadores de región constante consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias de ADN y de aminoácidos de cadena pesada y ligera publicadas. Como se ha analizado anteriormente, la PCR también puede usarse para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, pueden explorarse las bibliotecas mediante cebadores consenso o sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón. Se conocen en la técnica numerosos conjuntos de cebadores adecuados para amplificación de genes de anticuerpos (por ejemplo, cebadores 5' basados en la secuencia N terminal de anticuerpos purificados (Benhar y Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); amplificación rápida de extremos de ADNc (Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); secuencias líderes de anticuerpos (Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250). La clonación de secuencias de anticuerpos se describe además en Newman et al., Patente de los Estados Unidos n.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995.

55 Las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden comprender uno o más dominios Fc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios Fc). En una realización, los dominios Fc pueden ser de diferentes tipos. En una realización, al menos un dominio Fc presente en la molécula de nucleasa híbrida comprende un dominio bisagra o parte del mismo. En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio CH2 o parte del mismo. En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio CH3 o parte del mismo. En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio CH4 o parte del mismo. En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio bisagra o parte del mismo y al menos un dominio CH2 o parte del mismo (por ejemplo, en la orientación bisagra-CH2). En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio CH2 o parte del mismo y al menos un dominio CH3 o parte del mismo (por ejemplo, en la orientación CH2-CH3). En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un

dominio Fc que comprende al menos un dominio de bisagra o parte del mismo, al menos un dominio CH2 o parte del mismo, y al menos un dominio CH3 o parte del mismo, por ejemplo en la orientación bisagra-CH2-CH3, bisagra-CH3-CH2 o CH2-CH3-bisagra.

5 En determinadas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida comprende al menos una región Fc completa obtenida de una o más cadenas pesadas de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio Fc que incluye dominios bisagra, CH2 y CH3, aunque no es necesario que estos se obtengan del mismo anticuerpo). En otras realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida comprende al menos dos dominios Fc completos obtenidos de una o más cadenas pesadas de inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, el dominio Fc completo se obtiene de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG humana (por ejemplo, IgG1 humano).

10 En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende un dominio CH3 completo. En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende un dominio CH2 completo. En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende al menos un dominio CH3 y al menos uno de una región bisagra y un dominio CH2. En una realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende un dominio bisagra y un CH3. En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que comprende un dominio bisagra, un CH2 y un CH3. En realizaciones preferidas, el dominio Fc se obtiene de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG humana (por ejemplo, IgG1 humano).

15 Los dominios de región constante o partes de los mismos que componen un dominio Fc de una molécula de nucleasa híbrida de la invención pueden obtenerse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede comprender un dominio CH2 o parte del mismo obtenido de una molécula de IgG1 y una región CH3 o parte de la misma obtenida de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una molécula de nucleasa híbrida puede comprender un dominio Fc que comprende un dominio bisagra obtenido, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. Como se expone en el presente documento, un experto en la materia entenderá que puede alterarse un dominio Fc de tal forma que varíe en cuanto a su secuencia de aminoácidos respecto de una molécula de anticuerpo de origen natural.

20 En otra realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende uno o más dominios Fc truncados que son no obstante suficientes para conferir al receptor de Fc (FcR) propiedades de unión a la región Fc. De este modo, un dominio Fc de una molécula de nucleasa híbrida de la invención puede comprender o consistir en una parte de unión a FcRn. Las partes de unión a FcRn pueden obtenerse de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se usa una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del IgG1 de isotipo humano. En otra realización, se usa una parte de unión a FcRn de un anticuerpo del IgG4 de isotipo humano.

25 En una realización, una molécula de nucleasa híbrida de la invención carece de uno o más dominios de región constante de una región Fc completa, es decir, están parcial o completamente suprimidos. En determinadas realizaciones moléculas de nucleasa híbridas de la invención carecerán de un dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). Los expertos en la materia apreciarán que dichas construcciones pueden preferirse debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en la tasa catabólica del anticuerpo. En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención comprenden regiones Fc con el dominio CH2 suprimido obtenidas de un vector (por ejemplo, de IDEC Pharmaceuticals, San Diego) que codifica un dominio de región constante humana de IgG1 (véase, por ejemplo, documentos WO 02/060955A2 y WO02/096948A2). Este vector ejemplar se modifica técnicamente para suprimir el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG1 con dominio suprimido. Se observará que estas construcciones ejemplares preferentemente se modifican técnicamente para fusionar un dominio CH3 de unión directamente con una región bisagra del dominio Fc respectivo.

30 En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre uno o más dominios Fc constituyentes. Por ejemplo, puede colocarse un espaciador peptídico entre una región bisagra y un dominio CH2 y/o entre un dominio CH2 y un CH3. Por ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en las que el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 restante (sintético o no sintético) se une con la región bisagra con un espaciador peptídico de 1-20, 1-10 o 1-5 aminoácidos. Dicho espaciador peptídico puede añadirse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio de región constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Preferentemente, cualquier péptido enlazador compatible con la presente invención será relativamente no inmunogénico y no evitará el plegamiento apropiado del Fc.

60 Cambios en los aminoácidos de Fc

En determinadas realizaciones, un dominio Fc empleado en una molécula de nucleasa híbrida de la invención se altera o se modifica, por ejemplo, por mutación de aminoácidos (por ejemplo, adición, supresión o sustitución). Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de dominio Fc" se refiere a un dominio Fc que tiene al menos una modificación de aminoácidos, tal como una sustitución de aminoácidos, en comparación con el Fc de tipo

silvestre del que se obtiene el dominio Fc. Por ejemplo, donde el dominio Fc se obtiene de un anticuerpo IgG1 humano, una variante comprende al menos una mutación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución) en comparación con un aminoácido de tipo silvestre en la posición correspondiente de la región Fc de IgG1 humano.

- 5 La sustitución o las sustituciones de aminoácidos de una variante de Fc pueden localizarse en una posición dentro del dominio Fc denominada según el número de parte que se daría a ese resto en una región Fc en un anticuerpo.

En una realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido localizada en un dominio bisagra o parte del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido localizada en un dominio CH2 o parte del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido localizada en un dominio CH3 o parte del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido localizada en un dominio CH4 o parte del mismo.

15 En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención comprenden una variante de Fc que comprende más de una sustitución de aminoácidos. Las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden comprender, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos se sitúan espacialmente entre sí a un intervalo de al menos 1 posición de aminoácido o más, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de aminoácidos o más. Más preferentemente, los aminoácidos modificados técnicamente se sitúan espacialmente separados entre sí por un intervalo de al menos 5, 10, 15, 20 o 25 posiciones de aminoácidos o más.

En determinadas realizaciones, la variante de Fc confiere una mejora en al menos una función efectora transmitida por un dominio Fc que comprende dicho dominio Fc de tipo silvestre (por ejemplo, una mejora en la capacidad del dominio Fc para unirse con receptores de Fc (por ejemplo FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas del complemento (por ejemplo C1q), o para desencadenar citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento (CDCC)). En otras realizaciones, la variante de Fc proporciona un resto de cisteína modificado técnicamente.

30 En algunos aspectos, un dominio Fc incluye cambios en la región entre los aminoácidos 234-238, incluyendo la secuencia LLGGP al comienzo del dominio CH2. En algunos aspectos, una variante de Fc altera la función efectora mediada por Fc, particularmente ADCC, y/o reduce la avidéz de unión por receptores de Fc. En algunos aspectos, los cambios de secuencia más cerca del punto de unión CH2-CH3, en posiciones tales como K322 o P331 pueden eliminar la citotoxicidad mediada por complemento y/o alterar la avidéz por unión a FcR. En algunos aspectos, un dominio Fc incorpora cambios en los restos P238 y P331, por ejemplo, cambio de las prolinas de tipo silvestre en estas posiciones a serina. En algunos aspectos, las alteraciones en la región bisagra en una o más de las tres cisteínas de bisagra, para codificar CCC, SCC, SSC, SCS o SSS en estos restos también pueden afectar a la unión a FcR y la homogeneidad molecular, por ejemplo, por eliminación de cisteínas desapareadas que pueden desestabilizar la proteína plegada.

40 Las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden emplear variantes de Fc reconocidas en la técnica que se sabe que transmiten una mejora en la función efectora y/o la unión a FcR. Específicamente, una molécula de nucleasa híbrida de la invención pueden incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas en las publicaciones de PCT internacional WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351 A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 y WO06/085967A2; publicaciones de patente de Estados Unidos N.º US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056; o patentes de Estados Unidos N.º 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; y 7.317.091. En una realización, el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos desvelados en la técnica) puede realizarse en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas. En otra realización, puede realizarse un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos desveladas (por ejemplo, la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos desveladas en la técnica).

60 Otras mutaciones de aminoácidos en el dominio Fc se contemplan para reducir la unión con el receptor de Fc gamma y subtipos de receptor de Fc gamma. Por ejemplo, las mutaciones en las posiciones 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 322, 324, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 356, 360, 373, 376, 378, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc pueden alterar la unión como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.737.056, expedida el 18 de mayo de 2004. Esta patente indicó que el cambio de Pro331 en IgG3 a Ser dio como resultado una afinidad seis veces menor en comparación con IgG3 no mutado, lo que indica la implicación de Pro331 en la unión con Fc gamma RI. Además, se desvela que

las modificaciones de aminoácidos en las posiciones 234, 235, 236 y 237, 297, 318, 320 y 322 potencialmente alteran la afinidad de unión con el receptor en el documento U.S. 5.624.821, expedido el 29 de abril de 1997.

5 Las mutaciones adicionales contempladas para su uso incluyen, por ejemplo, las descritas en la Publicación Patente de Estados Unidos n.º 2006/0235208, publicada el 19 de octubre de 2006. Estas publicaciones describen variantes de Fc que muestran unión reducida con receptores de Fc gamma, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o citotoxicidad dependiente del complemento reducido, que comprenden al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc, incluyendo 232G, 234G, 234H, 235D, 235G, 235H, 236I, 236N, 236P, 236R, 237K, 237L, 237N, 237P, 238K, 239R, 265G, 267R, 269R, 270H, 297S, 299A, 299I, 299V, 325A, 325L, 327R, 328R, 329K, 10 330I, 330L, 330N, 330P, 330R y 331L (la numeración es según el índice de EU), así como dobles mutantes 236R/237K, 236R/325L, 236R/328R, 237K/325L, 237K/328R, 325L/328R, 235G/236R, 267R/269R, 234G/235G, 236R/237K/325L, 236R/325L/328R, 235G/236R/237K y 237K/325L/328R. Otras mutaciones contempladas para su uso como se describe en esta publicación incluyen 227G, 234D, 234E, 234G, 234I, 234Y, 235D, 235I, 235S, 236S, 239D, 246H, 255Y, 258H, 260H, 264I, 267D, 267E, 268D, 268E, 272H, 272I, 272R, 281D, 282G, 283H, 284E, 15 293R, 295E, 304T, 324G, 324I, 327D, 327A, 328A, 328D, 328E, 328F, 328I, 328M, 328N, 328Q, 328T, 328V, 328Y, 330I, 330L, 330Y, 332D, 332E, 335D, una inserción de G entre las posiciones 235 y 236, una inserción de A entre las posiciones 235 y 236, una inserción de S entre las posiciones 235 y 236, una inserción de T entre las posiciones 235 y 236, una inserción de N entre las posiciones 235 y 236, una inserción de D entre las posiciones 235 y 236, una inserción de V entre las posiciones 235 y 236, una inserción de L entre las posiciones 235 y 236, una inserción de G 20 entre las posiciones 235 y 236, una inserción de A entre las posiciones 235 y 236, una inserción de S entre las posiciones 235 y 236, una inserción de T entre las posiciones 235 y 236, una inserción de N entre las posiciones 235 y 236, una inserción de D entre las posiciones 235 y 236, una inserción de V entre las posiciones 235 y 236, una inserción de L entre las posiciones 235 y 236, una inserción de G entre las posiciones 297 y 298, una inserción de A entre las posiciones 297 y 298, una inserción de S entre las posiciones 297 y 298, una inserción de D entre las 25 posiciones 297 y 298, una inserción de G entre las posiciones 326 y 327, una inserción de A entre las posiciones 326 y 327, una inserción de T entre las posiciones 326 y 327, una inserción de D entre las posiciones 326 y 327 y una inserción de E entre las posiciones 326 y 327 (la numeración es de acuerdo con el índice de EU). De manera adicional, las mutaciones descritas en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2006/0235208 incluyendo 227G/332E, 234D/332E, 234E/332E, 234Y/332E, 234I/332E, 234G/332E, 235I/332E, 235S/332E, 30 235D/332E, 235E/332E, 236S/332E, 236A/332E, 236S/332D, 236A/332D, 239D/268E, 246H/332E, 255Y/332E, 258H/332E, 260H/332E, 264I/332E, 267E/332E, 267D/332E, 268D/332D, 268E/332D, 268E/332E, 268D/332E, 268E/330Y, 268D/330Y, 272R/332E, 272H/332E, 283H/332E, 284E/332E, 293R/332E, 295E/332E, 304T/332E, 324I/332E, 324G/332E, 324I/332D, 324G/332D, 327D/332E, 328A/332E, 328T/332E, 328V/332E, 328I/332E, 328F/332E, 328Y/332E, 328M/332E, 328D/332E, 328E/332E, 328N/332E, 328Q/332E, 328A/332D, 328T/332D, 35 328V/332D, 328I/332D, 328F/332D, 328Y/332D, 328M/332D, 328D/332D, 328E/332D, 328N/332D, 328Q/332D, 330L/332E, 330Y/332E, 330I/332E, 332D/330Y, 335D/332E, 239D/332E, 239D/332E/330Y, 239D/332E/330L, 239D/332E/330I, 239D/332E/268E, 239D/332E/268D, 239D/332E/327D, 239D/332E/284E, 239D/268E/330Y, 239D/332E/268E/330Y, 239D/332E/327A, 239D/332E/268E/327A, 239D/332E/330Y/327A, 332E/330Y/268 E/327A, 239D/332E/268E/330Y/327A, Inserción de G>297-298/332E, Inserción de A>297-298/332E, Inserción de S>297- 40 298/332E, Inserción de D>297-298/332E, Inserción de G>326-327/332E, Inserción de A>326-327/332E, Inserción de T>326-327/332E, Inserción de D>326-327/332E, Inserción de E>326-327/332E, Inserción de G>235-236/332E, Inserción de A>235-236/332E, Inserción de S>235-236/332E, Inserción de T>235-236/332E, Inserción de N>235- 236/332E, Inserción de D>235-236/332E, Inserción de V>235-236/332E, Inserción de L>235-236/332E, Inserción de G>235-236/332D, Inserción de A>235-236/332D, Inserción de S>235-236/332D, Inserción de T>235-236/332D, 45 Inserción de N>235-236/332D, Inserción de D>235-236/332D, Inserción de V>235-236/332D e Inserción de Inserción de L>235-236/332D (numeración de acuerdo con el índice de EU) se contemplan para su uso. El mutante L234A/L235A se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0108548, publicada el 12 de junio de 2003. En realizaciones, las modificaciones descritas se incluyen individualmente o en combinación.

50 En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende una sustitución de aminoácidos para un dominio Fc que altera las funciones efectoras independientes de antígeno del anticuerpo, en particular la semivida en circulación del anticuerpo. Dichas moléculas de nucleasa híbridas muestran unión aumentada o reducida a FcRn en comparación con moléculas de nucleasa híbridas que carecen de estas 55 sustituciones y, por lo tanto, tienen una semivida aumentada o reducida en suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tendrán semividas en suero más largas y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desee semivida larga del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o un trastorno crónico. Por el contrario, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn reducida tengan semividas más cortas y dichas moléculas 60 también son útiles, por ejemplo, para administración a un mamífero cuando pueda ser ventajoso un tiempo de circulación acortado, por ejemplo para captura de imágenes de diagnóstico in vivo o en situaciones en las que el polipéptido de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando están presentes en la circulación durante periodos prolongados. Es menos probable que las variantes de Fc con afinidad de unión por FcRn reducida crucen la placenta y, por tanto, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, 65 otras aplicaciones en las que puede desearse la afinidad de unión a FcRn reducida incluyen las aplicaciones en las que se desea la localización en el cerebro, el riñón y/o el hígado. En una realización ejemplar, las moléculas de

nucleasa híbridas de la invención muestran transporte reducido a través del epitelio de glomérulos renales desde la vasculatura. En otra realización, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención muestran transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BHE) del cerebro, en el espacio vascular. En una realización, una molécula de nucleasa híbrida con unión a FcRn alterada comprende al menos un dominio Fc (por ejemplo, uno o dos dominios Fc) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. Se desvelan sustituciones de aminoácidos ejemplares que alteraron la actividad de unión a FcRn en la publicación de PCT internacional N.º WO05/047327.

En otras realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera las funciones efectoras dependientes de antígeno del polipéptido, en particular ADCC o activación del complemento, por ejemplo, en comparación con una región Fc de tipo silvestre. En una realización ejemplar, dichas moléculas de nucleasa híbridas muestran unión alterada con un receptor de Fc gamma (por ejemplo, CD16). Dichas moléculas de nucleasa híbridas muestran unión aumentada o reducida con FcR gamma en comparación con polipéptidos de tipo silvestre y, por lo tanto, median en la función efectora potenciada o reducida, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcγRn potenciarán la función efectora y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desee destrucción de la molécula diana. Por el contrario, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión a FcγRn reducida reduzcan la función efectora y dichas moléculas también son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de afecciones en las que no es deseable la destrucción de la célula diana, por ejemplo, en las que células normales pueden expresar moléculas diana o en las que la administración crónica del polipéptido podría dar como resultado activación del sistema inmunitario no deseada. En una realización, el polipéptido que comprende un Fc muestra al menos una función efectora dependiente de antígeno alterada seleccionada del grupo que consiste en opsonización, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC) o modulación de células efectoras en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc de tipo silvestre.

En una realización la molécula de nucleasa híbrida muestra unión alterada a un FcγR activador (por ejemplo Fcγ1, Fcγ11a o FcγRIIIa). En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida muestra afinidad de unión alterada a un FcγR inhibitorio (por ejemplo FcγRIIb). Se desvelan sustituciones de aminoácidos ejemplares que alteraron la actividad de unión a FcR o el complemento en la publicación de PCT internacional N.º WO05/063815.

Una molécula de nucleasa híbrida de la invención también puede comprender una sustitución de aminoácidos que altera la glucosilación de la molécula de nucleasa híbrida. Por ejemplo, el dominio Fc de la molécula de nucleasa híbrida puede comprender un dominio Fc que tiene una mutación que conduce a glucosilación reducida (por ejemplo, glucosilación ligada a N u O) o puede comprender una glucoforma alterada del dominio Fc de tipo silvestre (por ejemplo, un glucano bajo en fucosa o sin fucosa). En otra realización, la molécula de nucleasa híbrida tiene una sustitución de aminoácidos cerca o dentro de un motivo de glucosilación, por ejemplo, un motivo de glucosilación ligado a N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. Se desvelan sustituciones de aminoácidos ejemplares que reducen o alteran la glucosilación en la publicación de PCT internacional N.º WO05/018572 y publicación de patente de Estados Unidos N.º 2007/0111281.

En otras realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida de la invención comprende al menos un dominio Fc que tiene un resto de cisteína modificado técnicamente o análogo del mismo que se localiza en la superficie expuesta al disolvente. Preferentemente el resto de cisteína modificado técnicamente o análogo del mismo no interfiere con una función efectora conferida por el Fc. Más preferentemente, la alteración no interfiere con la capacidad del Fc para unirse con receptores de Fc (por ejemplo FcγRI, FcγRII o FcγRIII) o proteínas del complemento (por ejemplo C1q), o para desencadenar función efectora inmunitaria (por ejemplo, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento (CDCC)). En realizaciones preferidas, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención comprenden un dominio Fc que comprende al menos un resto de cisteína libre modificado técnicamente o análogo del mismo que está sustancialmente sin enlaces disulfuro con un segundo resto de cisteína. Cualquiera de los restos de cisteína modificados técnicamente anteriores o análogos de los mismos puede conjugarse posteriormente con un dominio funcional usando técnicas reconocidas en este campo (por ejemplo conjugarse con un enlazador heterobifuncional reactivo a tioles).

En una realización, la molécula de nucleasa híbrida de la invención puede comprender un dominio Fc fusionado genéticamente que tiene dos o más de sus dominios Fc constituyentes seleccionados de forma independiente de los dominios Fc descritos en el presente documento. En una realización, los dominios Fc son iguales. En otra realización, al menos dos de los dominios Fc son diferentes. Por ejemplo, los dominios Fc de las moléculas de nucleasa híbridas de la invención comprenden el mismo número de restos de aminoácidos o pueden diferir en su longitud en uno o más restos de aminoácidos (por ejemplo, en aproximadamente 5 restos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácidos), aproximadamente 10 restos, aproximadamente 15 restos, aproximadamente 20 restos, aproximadamente 30 restos, aproximadamente 40 restos o aproximadamente 50 restos). En otras realizaciones más, los dominios Fc de las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden diferir en su secuencia en una o más posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, al menos dos de los dominios Fc pueden diferir en aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de

aminoácidos), aproximadamente 10 posiciones, aproximadamente 15 posiciones, aproximadamente 20 posiciones, aproximadamente 30 posiciones, aproximadamente 40 posiciones o aproximadamente 50 posiciones).

Dominios enlazadores

5 En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio enlazador. En algunas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida incluye una pluralidad de dominios enlazadores. En algunas realizaciones, el dominio enlazador es un enlazador polipeptídico. En determinados aspectos, es deseable emplear un enlazador polipeptídico para fusionar uno o más dominios Fc con uno o más dominios de nucleasa para formar una molécula de nucleasa híbrida.

15 En una realización, el enlazador polipeptídico es sintético. Como se usa en el presente documento el término "sintético" con respecto a un enlazador polipeptídico incluye péptidos (o polipéptidos) que comprenden una secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) que está unida en una secuencia lineal de aminoácidos a una secuencia (que puede ser de origen natural o no) (por ejemplo, una secuencia de dominio Fc) a la que no está unida de forma natural en la naturaleza. Por ejemplo, el enlazador polipeptídico puede comprender polipéptidos de origen no natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (por ejemplo, que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o supresión) o que comprenden una primera secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no). Los enlazadores polipeptídicos de la invención pueden emplearse, por ejemplo, para asegurar que los dominios Fc estén yuxtapuestos para asegurar el plegamiento apropiado y la formación de un dominio Fc funcional. Preferentemente, un enlazador polipeptídico compatible con la presente invención será relativamente no inmunogénico y no inhibirá ninguna asociación no covalente entre subunidades monoméricas de una proteína de unión.

25 En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención emplean un enlazador polipeptídico para unir dos o más dominios cualesquiera en fase en una única cadena polipeptídica. En una realización, los dos o más dominios pueden seleccionarse de forma independiente de cualquiera de los dominios Fc o dominios de nucleasa analizados en el presente documento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un enlazador polipeptídico puede usarse para fusionar dominios Fc idénticos, formando de este modo una región Fc homomérica. En otras realizaciones, puede usarse un enlazador polipeptídico para fusionar diferentes dominios Fc (por ejemplo un dominio Fc de tipo silvestre y una variante de dominio Fc), formando de este modo una región Fc heteromérica. En otras realizaciones, un enlazador polipeptídico de la invención puede usarse para fusionar genéticamente el extremo C de un primer dominio Fc (por ejemplo un dominio bisagra o parte del mismo, un dominio CH2 o parte del mismo, un dominio CH3 completo o parte del mismo, una parte de unión a FcRn, una parte de unión a FcγR, una parte de unión al complemento o parte del mismo) con el extremo N de un segundo dominio Fc (por ejemplo, un dominio Fc completo).

35 En una realización, un enlazador polipeptídico comprende una parte de un dominio Fc. Por ejemplo, en una realización, un enlazador polipeptídico puede comprender un dominio bisagra de inmunoglobulina de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. En otra realización, un enlazador polipeptídico puede comprender un dominio CH2 de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. En otras realizaciones, un enlazador polipeptídico puede comprender un dominio CH3 de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. También pueden usarse otras partes de una inmunoglobulina (por ejemplo una inmunoglobulina humana). Por ejemplo, un enlazador polipeptídico puede comprender un dominio CH1 o parte del mismo, un dominio CL o parte del mismo, un dominio VH o parte del mismo o un dominio VL o parte del mismo. Dichas partes pueden obtenerse de cualquier inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4.

45 En realizaciones ejemplares, un enlazador polipeptídico puede comprender al menos una parte de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización, un enlazador polipeptídico comprende un dominio bisagra superior (por ejemplo, un dominio bisagra superior de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En otra realización, un enlazador polipeptídico comprende un dominio bisagra medio (por ejemplo, un dominio bisagra medio de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En otra realización, un enlazador polipeptídico comprende un dominio bisagra inferior (por ejemplo, un dominio bisagra inferior de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

55 En otras realizaciones, pueden construirse enlazadores peptídicos que combinan elementos bisagra obtenidos del mismo o diferentes isotipos de anticuerpos. En una realización, el enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG1 y al menos una parte de una región bisagra de IgG2. En una realización, el enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG1 y al menos una parte de una región bisagra de IgG3. En otra realización, un enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG1 y al menos una parte de una región bisagra de IgG4. En una realización, el enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG2 y al menos una parte de una región bisagra de IgG3. En una realización, el enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG2 y al menos una parte de una región bisagra de IgG4. En una realización, el enlazador polipeptídico comprende una bisagra quimérica que comprende al menos una parte de una región bisagra de IgG1, al menos una parte de una región bisagra de IgG2 y

al menos una parte de una región bisagra de IgG4. En otra realización, un enlazador polipeptídico puede comprender una bisagra superior y media de IgG1 y un único motivo de repetición de bisagra media de IgG3. En otra realización, un enlazador polipeptídico puede comprender una bisagra superior de IgG4, una bisagra media de IgG1 y una bisagra inferior de IgG2.

En otra realización, un enlazador polipeptídico comprende o consiste en un enlazador gly-ser. Como se usa en el presente documento, la expresión "enlazador gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en restos de glicina y serina. Un enlazador gly-ser ejemplar comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula $(Gly_4Ser)_n$, en la que n es un número entero positivo (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5). Un enlazador gly/ser preferido es $(Gly_4Ser)_4$. Otro enlazador gly/ser preferido es $(Gly_4Ser)_3$. Otro enlazador gly/ser preferido es $(Gly_4Ser)_5$. En determinadas realizaciones, el enlazador gly-ser puede insertarse entre otras dos secuencias del enlazador polipeptídico (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de enlazadores polipeptídicos descritas en el presente documento). En otras realizaciones, un enlazador gly-ser se une en uno o ambos extremos de otra secuencia del enlazador polipeptídico (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de enlazadores polipeptídicos descritas en el presente documento). En otras realizaciones más, se incorporan dos o más enlazadores gly-ser en serie en un enlazador polipeptídico. En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención comprende al menos una parte de una región bisagra superior (obtenida de una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), al menos una parte de una región bisagra media (por ejemplo, obtenida de una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y una serie de restos de aminoácidos gly/ser (por ejemplo, un enlazador gly/ser tal como $(Gly_4Ser)_n$).

En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención comprende un dominio de región bisagra de inmunoglobulina de origen no natural, por ejemplo, un dominio de región bisagra que no se encuentra de forma natural en el polipéptido que comprende el dominio de región bisagra y/o un dominio de región bisagra que se ha alterado de modo que difiera en su secuencia de aminoácidos de un dominio de región bisagra de inmunoglobulina de origen natural. En una realización, pueden realizarse mutaciones en dominios de región bisagra para preparar un enlazador polipeptídico de la invención. En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención comprende un dominio bisagra que no comprende un número de cisteínas de origen natural, es decir, el enlazador polipeptídico comprende menos cisteínas o un mayor número de cisteínas que una molécula bisagra de origen natural.

En otras realizaciones, un enlazador polipeptídico comprende una secuencia peptídica biológicamente relevante o una parte de secuencia de la misma. Por ejemplo, una secuencia peptídica biológicamente relevante puede incluir, pero sin limitación, secuencias obtenidas de un péptido antirrechazo o antiinflamatorio. Dichos péptidos antirrechazo o antiinflamatorios pueden seleccionarse del grupo que consiste en un péptido inhibidor de citocina, un péptido inhibidor de la adhesión celular, un péptido inhibidor de trombina y un péptido inhibidor de plaquetas. En una realización preferida, un enlazador polipeptídico comprende una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en una secuencia peptídica inhibidora o antagonista de IL-1, una secuencia peptídica mimética de eritropoyetina (EPO), una secuencia peptídica mimética de trombopoyetina (TPO), secuencia peptídica mimética de G-CSF, una secuencia peptídica antagonista de TNF, una secuencia peptídica de unión a integrina, una secuencia peptídica antagonista de selectina, una secuencia peptídica antipatógena, una secuencia peptídica mimética del péptido vasoactivo intestinal (VIP), una secuencia peptídica antagonista de calmodulina, un antagonista de mastocitos, una secuencia peptídica antagonista de SH3, una secuencia peptídica antagonista del receptor de uroquinasa (UKR), una secuencia peptídica mimética de somatostatina o cortistatina y una secuencia peptídica inhibidora de macrófagos y/o linfocitos T. Se desvelan secuencias peptídicas ejemplares, una cualquiera de las cuales puede emplearse como un enlazador polipeptídico, en la patente de Estados Unidos n.º 6.660.843.

Se entenderá que pueden crearse formas variantes de estos enlazadores polipeptídicos ejemplares introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de nucleótidos que codifica un enlazador polipeptídico de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en el enlazador polipeptídico. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por la PCR.

Los enlazadores polipeptídicos de la invención son de al menos un aminoácido de longitud y pueden ser de diversas longitudes. En una realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente" indica +/- dos restos de aminoácidos. Ya que la longitud del enlazador debe ser un número entero positivo, la longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, significa una longitud de 1 a 48-52 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 10-20 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud.

En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En otra realización, un enlazador polipeptídico de la invención es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más aminoácidos de longitud.

Pueden introducirse enlazadores polipeptídicos en secuencias polipeptídicas usando técnicas conocidas en este campo. Las modificaciones pueden confirmarse por análisis de secuencia de ADN. Puede usarse ADN plasmídico para transformar células hospedadoras para producción estable de los polipéptidos producidos.

5 Dominios de nucleasa

En determinados aspectos, una molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio de nucleasa que comprende una RNasa humana. Por consiguiente, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención típicamente comprenden al menos un dominio de nucleasa y al menos un dominio Fc unido. En determinados aspectos, una molécula de nucleasa híbrida incluye una pluralidad de dominios de nucleasa.

En algunas realizaciones, un dominio de nucleasa también comprende sustancialmente toda o al menos un fragmento enzimáticamente activo de una DNasa. En algunas realizaciones, la DNasa es una DNasa secretada de Tipo I, preferentemente una DNasa humana tal como DNasa 1. Se exponen dominios de DNasa 1 ejemplares en las SEQ ID NO: 48-53 y 102. Se describe una DNasa 1 humana ejemplar en la entrada de UniProtKB P24855 (SEQ ID NO:49 y 102). En algunas realizaciones, la DNasa es DNasa 1 y/o una enzima de tipo DNasa 1 (DNasaL), 1-3. Una enzima de tipo DNasa 1 humana ejemplar, 1-3 se describe en la entrada de UniProtKB Q13609 (SEQ ID NO:57 y 103). En algunas realizaciones, la DNasa es TREX1 (exonucleasa de reparación tres prima 1). Se describe una TREX1 humana ejemplar en la entrada de UniProtKB Q9NSU2 (SEQ ID NO:104). Preferentemente la TREX1 humana es una TREX1 humana troncada en el extremo C que carece de secuencias de dirección nuclear intracelular, por ejemplo, una TREX1 humana que carece de 72 aminoácidos C terminales como se expone en la SEQ ID NO:105.

En algunas realizaciones, un dominio de nucleasa es sustancialmente toda o al menos un fragmento enzimáticamente activo de una RNasa humana. En algunas realizaciones, la RNasa es una RNasa extracelular o secretora de la superfamilia de RNasa A, por ejemplo, RNasa A, preferentemente una RNasa pancreática humana. Se describe una RNasa humana ejemplar en la entrada de UniProtKB P07998 (SEQ ID NO:58 y 101).

En una realización, el dominio de nucleasa está unido operativamente (por ejemplo, conjugado químicamente o fusionado genéticamente (por ejemplo, directamente o mediante un enlazador polipeptídico)) con el extremo N de un dominio Fc. En otra realización, el dominio de nucleasa está unido operativamente (por ejemplo, conjugado químicamente o fusionado genéticamente (por ejemplo, directamente o mediante un enlazador polipeptídico)) con el extremo C de un dominio Fc. En otras realizaciones, un dominio de nucleasa se une operativamente (por ejemplo, conjugado químicamente o fusionado genéticamente (por ejemplo, directamente o mediante un enlazador polipeptídico)) mediante una cadena lateral de aminoácidos de un dominio Fc. En determinadas realizaciones ejemplares, el dominio de nucleasa se fusiona con un dominio Fc mediante un dominio bisagra de inmunoglobulina humana o parte del mismo.

En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención comprenden dos o más dominios de nucleasa y al menos un dominio Fc. Por ejemplo, los dominios de nucleasa pueden unirse operativamente tanto al extremo N como al extremo C de un dominio Fc. En otras realizaciones ejemplares, los dominios de nucleasa pueden unirse operativamente a los extremos tanto N como C terminales de múltiples dominios Fc (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más dominios Fc) que se unen entre sí en serie para formar una matriz en tándem de dominios Fc.

En otras realizaciones, dos o más dominios de nucleasa se unen entre sí (por ejemplo, mediante un enlazador polipeptídico) en serie, y la matriz en tándem de dominios de nucleasa se une operativamente (por ejemplo, conjugado químicamente o fusionado genéticamente (por ejemplo, directamente o mediante un enlazador polipeptídico)) con el extremo C o el extremo N de un dominio Fc o una matriz en tándem de dominios Fc. En otras realizaciones, la matriz en tándem de dominios de nucleasa se une operativamente tanto con el extremo C como con el extremo N de un dominio Fc o una matriz en tándem de dominios Fc.

En otras realizaciones, pueden insertarse uno más dominios de nucleasa entre dos dominios Fc. Por ejemplo, uno o más dominios de nucleasa pueden formar todo o parte de un enlazador polipeptídico de una molécula de nucleasa híbrida de la invención.

Las moléculas de nucleasa híbridas preferidas de la invención comprenden al menos un dominios de nucleasa (por ejemplo, RNasa), al menos un dominio enlazador y al menos un dominio Fc.

En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención tienen al menos un dominio de nucleasa específico para una molécula diana que media en un efecto biológico. En otra realización, la unión de las moléculas de nucleasa híbridas de la invención con una molécula diana (por ejemplo ARN) da como resultado la reducción o eliminación de la molécula diana, por ejemplo, de una célula, un tejido o de la circulación.

En determinadas realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden comprender dos o más dominios de nucleasa. En una realización, los dominios de nucleasa son idénticos, por ejemplo, RNasa y RNasa. En otra realización, los dominios de nucleasa son diferentes, por ejemplo, DNasa y RNasa.

- 5 En otras realizaciones, las moléculas de nucleasa híbridas de la invención pueden ensamblarse entre sí o con otros polipéptidos para formar proteínas de unión que tienen dos o más polipéptidos ("multímeros"), en los que al menos un polipéptido del multímero es una molécula de nucleasa híbrida de la invención. Las formas multiméricas
 10 ejemplares incluyen proteínas de unión alterada diméricas, triméricas, tetraméricas y hexaméricas y similares. En una realización, los polipéptidos del multímero son iguales (es decir proteínas de unión alterada monoméricas, por ejemplo homodímeros, homotetrámeros). En otra realización, los polipéptidos del multímeros son diferentes (por ejemplo heteroméricos).

Métodos para preparar moléculas de nucleasa híbridas

- 15 Las moléculas de nucleasa híbridas de la presente invención pueden prepararse en gran medida en células hospedadoras transformadas usando técnicas de ADN recombinantes. Para hacerlo, se prepara una molécula de ADN recombinante que codifica el péptido. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar dichas moléculas de ADN. Por ejemplo, las secuencias que codifican los péptidos podrían escindirarse del ADN usando enzimas de restricción adecuadas. Como alternativa, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis
 20 química, tales como el método de fosforamidato. Asimismo, podría usarse una combinación de estas técnicas.

- La invención también incluye un vector capaz de expresar los péptidos en un hospedador apropiado. El vector comprende la molécula de ADN que codifica los péptidos unidos operativamente con secuencias de control de la expresión apropiadas. Se conocen bien métodos para efectuar esta unión operativa, bien antes o bien después de insertarse la molécula de ADN en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, dominios de nucleasa ribosómica, señales de inicio, señales de terminación, señales de recubrimiento terminal, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de transcripción o traducción.
 25

- 30 El vector resultante que tiene la molécula de ADN en el mismo se usa para transformar un hospedador apropiado. Esta transformación puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

- Puede usarse cualquiera de varias células hospedadoras disponibles y bien conocidas en la práctica de esta invención. La selección de un hospedador particular depende de varios factores reconocidos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión elegido, toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, tasa de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, bioseguridad y costes. Puede conseguirse un equilibrio de estos factores con el entendimiento de que no todos los hospedadores pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas directrices generales, los hospedadores microbianos útiles incluyen bacterias (tales como *E. coli* sp.), levadura (tales como *Saccharomyces* sp.) y otros hongos, insectos, plantas, células de mamífero (incluyendo ser humano) en cultivo, u otros hospedadores conocidos en la técnica.
 35
 40

- A continuación, el hospedador transformado se cultiva y se purifica. Las células hospedadoras pueden cultivarse en condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen los compuestos deseados. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Finalmente, los péptidos se purifican a partir de cultivo por métodos bien conocidos en la técnica.
 45

- Los compuestos también pueden prepararse por métodos sintéticos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de síntesis de fase sólida. Se conocen bien en este campo técnicas adecuadas e incluyen las descritas en Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pág. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; patente de Estados Unidos N.º 3.941.763; Finn et al. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson et al. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis de fase sólida es la técnica preferida de preparación de péptidos individuales ya que es el método más rentable para preparar péptidos pequeños. Pueden sintetizarse compuestos que contienen péptidos derivatizados o que contienen grupos no peptídicos por técnicas de química orgánica bien conocidas.
 50
 55

Otros métodos de expresión/síntesis de moléculas son conocidos en general por los expertos en la materia.

Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos de uso

- En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida se administra sola. En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida se administra antes de la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida se administra simultáneamente con la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida se administra después de la administración de al menos otro agente terapéutico. En otras realizaciones, una
 60
 65

molécula de nucleasa híbrida se administra antes de la administración de al menos otro agente terapéutico. Como apreciará un experto en la técnica, en algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida se combina con el otro agente/compuesto. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida y otro agente se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la molécula de nucleasa híbrida y otro agente no se administran simultáneamente, administrándose la molécula de nucleasa híbrida antes o después de administrarse el agente. En algunas realizaciones, el sujeto recibe tanto la molécula de nucleasa híbrida como el otro agente durante un mismo periodo de prevención, aparición de un trastorno y/o periodo de tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. En determinadas realizaciones, la terapia de combinación comprende molécula de nucleasa, en combinación con al menos otro agente. Los agentes incluyen, pero sin limitación, composiciones químicas preparadas sintéticamente *in vitro*, anticuerpos, regiones de unión a antígeno y combinaciones y conjugados de los mismos. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar como un agonista, antagonista, modulador alostérico o toxina.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de nucleasa híbrida junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de nucleasa híbrida y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables son preferentemente no tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. En algunas realizaciones, el material o los materiales de formulación son para administración s.c. y/o i.v. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. En determinadas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno sulfito sódico); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro sódico o potásico, manitol sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995). En algunas realizaciones, la formulación comprende PBS; NaOAC 20 mM, pH 5,2, NaCl 50 mM; y/o NAOAC 10 mM, pH 5,2, sacarosa 9 %.

En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida y/o una molécula terapéutica se une con un vehículo extensor de la semivida conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol, glucógeno (por ejemplo, glucosilación de la molécula de nucleasa híbrida) y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 09/428.082, ahora patente de Estados Unidos N.º 6.660.843 y solicitud de PCT publicada N.º WO 99/25044.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la materia dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de suministro y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente. En determinadas realizaciones, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de eliminación *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En determinadas realizaciones, el vehículo o excipiente primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el vehículo o excipiente adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales habituales en composiciones para administración parenteral. En algunas

realizaciones, la solución salina comprende solución salina tamponada con fosfato isotónica. En determinadas realizaciones, la solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinadas realizaciones, una composición que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede prepararse para almacenamiento mezclado la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente) en forma de una pastilla liofilizada o una solución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, una composición que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede seleccionarse para suministro parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para suministro a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la capacidad de un experto en la materia.

En determinadas realizaciones, los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

En determinadas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, sin pirógenos, que comprende una molécula de nucleasa híbrida deseada, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para inyección es agua destilada estéril en la que una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se formula como una solución isotónica estéril, conservada de forma apropiada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que después puede suministrarse mediante una inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos de suministro farmacológico implantables para introducir la molécula deseada.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse como un polvo seco para inhalación. En determinadas realizaciones, una solución de inhalación que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse con un propulsor para suministro en aerosol. En determinadas realizaciones, las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar se describe además en la solicitud de PCT n.º PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

En determinadas realizaciones, se contempla que las formulaciones pueden administrarse una por vía oral. En determinadas realizaciones, una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se administra de esta manera puede formularse con o sin los vehículos usados habitualmente en la preparación de compuestos de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. En determinadas realizaciones, puede incluirse al menos un agente adicional para facilitar la absorción de una molécula de nucleasa híbrida y/o cualquier agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, también pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En determinadas realizaciones, disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que implican una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente o agentes terapéuticos adicionales, en formulaciones de liberación sostenida o controlada. En determinadas realizaciones, los expertos en la materia también conocen técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales

como vehículos liposómicos, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, solicitud de PCT N.º PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919 y documento EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato gamma (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), acetato de etilenvinilo (Langer et al., mencionado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En determinadas realizaciones, las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La composición farmacéutica que se va a usar para la administración *in vivo* es típicamente estéril. En determinadas realizaciones, esto se puede conseguir mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En determinadas realizaciones, cuando la composición se liofiliza, puede realizarse esterilización usando este método antes o después de la liofilización y reconstitución. En determinadas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En determinadas realizaciones, las composiciones parenterales se colocan en general en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

En determinadas realizaciones, se proporcionan kits para producir una unidad de administración de una única dosis. En determinadas realizaciones, el kit puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas individuales y multicámara (por ejemplo, jeringas líquidas y Lyosyringes).

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para tratamiento, de acuerdo con determinadas realizaciones, variarán por lo tanto dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la que se usa una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o la condición (la edad y salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el especialista clínico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En determinadas realizaciones, una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/g}$ a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/g}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o 5 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg .

En determinadas realizaciones, la frecuencia de dosificación tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos de una molécula de nucleasa híbrida y/o cualquier agente terapéutico adicional en la formulación usada. En determinadas realizaciones, un especialista clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse por lo tanto como una única dosis, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implantación o catéter. Los expertos en la materia realizarán refinamiento adicional de la dosificación apropiada de forma rutinaria y este está dentro del ámbito de las tareas realizadas de forma rutinaria por ellos. En determinadas realizaciones, las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a dosis apropiados.

En determinadas realizaciones, la vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, subcutánea, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida o por dispositivos de implantación. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse por inyección de embolada o continuamente por infusión o por dispositivo de implantación.

En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse por vía local mediante implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado en el que la molécula deseada se haya absorbido o encapsulado. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en

cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser mediante difusión, embolada de liberación temporalizada o administración continua.

5 En determinadas realizaciones, puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, de una manera *ex vivo*. En dichos casos, las células, los tejidos y/o los órganos que se han retirado del paciente se exponen a una composición farmacéutica que comprende una molécula de nucleasa híbrida, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, después de lo cual las células, los tejidos y/o los órganos se implantan posteriormente en el paciente.

10 En determinadas realizaciones, puede suministrarse una molécula de nucleasa híbrida y/o cualquier agente terapéutico adicional implantando determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar los polipéptidos. En determinadas realizaciones, dichas células pueden ser células animales o humanas y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden immortalizarse. En determinadas realizaciones, para reducir la probabilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En determinadas realizaciones, los materiales de encapsulación son típicamente recintos o membranas poliméricos semipermeables, biocompatibles, que permiten la liberación del producto o los productos proteicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

20 Las moléculas de nucleasa híbridas de la presente invención son particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios o respuestas inmunitarias anómalas. A este respecto, se apreciará que las moléculas de nucleasa híbridas de la presente invención pueden usarse para controlar, suprimir, modular, tratar o eliminar respuestas inmunitarias no deseadas tanto a antígenos externos como a autoantígenos. En otras realizaciones más los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para tratar trastornos inmunitarios que incluyen, pero sin limitación, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, una forma experimental de uveorretinitis, tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, uveítis facogénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hbs negativa, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis, dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico o enfermedad del tejido conectivo.

35 Kits

Un kit puede incluir una molécula de nucleasa híbrida desvelada en el presente documento e instrucciones para su uso. Los kits pueden comprender, en un recipiente adecuado, una molécula de nucleasa híbrida desvelada en el presente documento, uno o más controles y diversos tampones, reactivos, enzimas y otros ingredientes convencionales bien conocidos en la técnica.

45 El recipiente puede incluir al menos un vial, pocillo, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otros recipientes, en los que puede colocarse una molécula de nucleasa híbrida y, en algunos casos, introducirse en alícuotas de forma adecuada. Cuando se proporcione un componente adicional, el kit puede contener recipientes adicionales en los que puede colocarse este componente. Los kits también pueden incluir un medio para contener la molécula de nucleasa híbrida y cualquier otro recipiente de reactivo en confinamiento estrecho para venta comercial. Dichos recipiente pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conservan los viales deseados. Los recipientes y/o kits pueden incluir etiquetado con instrucciones para su uso y/o advertencias.

50 **Ejemplos**

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en forma alguna. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debería tenerse en cuenta, por supuesto, algo de error y desviación experimental.

60 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3ª Ed. (Plenum Press) Vols A y B(1992).

Ejemplo 1. Enfoque general para generar moléculas de nucleasa híbridas.

Las moléculas de nucleasa híbridas se diseñaron para incorporar estructuras deseadas y actividad funcional de estructuras de enzima individual o multienzimáticas como casetes modulares con sitios de enzimas de restricción compatibles para transporte e intercambio de dominio. La estructura esquemática de diferentes realizaciones de moléculas de nucleasa híbridas se ilustra en la Figura 1. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de moléculas de nucleasa híbridas representativas se muestran en la Tabla 1.

Se aislaron ADNc humanos de ARN de páncreas humano (Ambion) o ARN de PBMC humano de linfocitos de sangre periférica humana normales (aproximadamente 5×10^6) usando kits QIAgen RNAeasy (Valencia, CA) y kits QIAshredder para homogeneizar lisados celulares (Qiagen, Valencia, CA). Se aislaron PBMC humanos de sangre humana heparinizada diluida 1:1 en D-PBS y se estratificó sobre gradientes de Ficoll de medio de separación de linfocitos LSM (MP Biomedicals, Irvine, CA).

Se aisló ARN de bazo de ratón usando kits QIAgen RNAeasy (Valencia, CA) de aproximadamente 5×10^6 esplenocitos. Las células se sedimentaron por centrifugación del medio de cultivo y se usaron 5×10^6 células para preparar ARN. Se aisló ARN de las células usando el kit de aislamiento de ARN total kit QIAGEN RNAeasy (Valencia, Calif.) y QIAGEN QIAshredder de acuerdo con las instrucciones del fabricante que acompañan al kit. Se usaron de uno a dos microgramos (1-2 μg) de ARN total como molde para preparar ADNc por transcripción inversa. El ARN, 300 ng de cebadores aleatorios y 500 ng de Oligo dT (12-18), y 1 μl de dNTP 25 mM se combinaron y se desnaturalizaron a 80 °C durante 5 minutos antes de la adición de enzima. Se añadió transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Life Technologies) a la mezcla de ARN más cebador en un volumen total de 25 μl en presencia de tampón de segunda cadena 5X y DTT 0,1 M proporcionado con la enzima. Se permitió que la reacción de transcripción inversa continuara a 50 °C durante una hora.

Se usaron entre 10-100 ng de ADNc en reacciones de amplificación por PCR usando cebadores específicos para el gen de nucleasa de interés (RNasaA, RNasa1, DNasa1, Trex1, DNasa1L3, etc.) Para las reacciones de clonación iniciales, los cebadores se diseñaron para aislar el ADNc de longitud completa o los productos de truncamiento que codifican el gen de interés. Se aislaron fragmentos de PCR de longitud completa o acortados mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando columnas Qiagen QIAquick para retirar nucleótidos, cebadores y productos amplificados no deseados. Se clonaron fragmentos purificados en vectores de clonación pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en bacterias TOP 10 competentes. Se pasaron colonias aisladas a medio de caldo de cultivo Luria que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ y se cultivaron durante una noche para aislar plásmidos. Se exploraron clones de TOPO con respecto a insertos del tamaño correcto por digestión con enzimas de restricción EcoRI (NEB, Ipswich, MA) y electroforesis en gel de agarosa de fragmentos digeridos. Se realizó análisis de secuencia de ADN de clones positivos con mezcla de reacción ABI Ready v 3.1 y se analizó usando un secuenciador de ADN ABI 3730 XL. Una vez que se obtuvieron los clones correctos, se diseñaron modificaciones de secuencia adicionales y se realizaron reacciones de PCR para generar los alelos o casetes de expresión deseados. Se generaron productos de truncamiento y alelos por mutagénesis de PCR usando cebadores solapantes para la introducción de mutaciones en posiciones específicas en los genes. Se sintetizaron enlazadores por PCR solapante usando cebadores solapantes internos y ciclos sucesivos de PCR para unir una secuencia adicional a cada extremo. Las moléculas de nucleasa híbridas se ensamblaron como una fila de varios casetes intercambiables. Las moléculas de la realización preferida contienen un péptido líder fijo, un casete de nucleasa, un casete opcional que codifica una opción de varios enlazadores polipeptídicos diferentes, un casete de dominio Fc de Ig con un codón de terminación o un enlazador en el extremo carboxilo del dominio CH3 y para moléculas de tipo resolvicasa, un segundo casete de enlazador, seguido de un segundo casete de nucleasa. La Figura 1 ilustra la estructura de tipo casete de estas moléculas de nucleasa híbridas y ejemplos de secuencias potenciales insertadas en cada posición. Una vez que se ensamblaron moléculas de nucleasa híbridas, se transformaron en un plásmido de expresión de mamífero pDG apropiado para expresión transitoria en COS7 u otras células y expresión estable en células CHO DG44 usando selección de DHFR con metotrexato.

Expresión transitoria de moléculas de nucleasa híbridas

Se transfectaron de forma transitoria células COS-7 con el vector de expresión pDG que contenía insertos de genes de moléculas de nucleasa híbridas. El día antes de la transfección, se sembraron células a 4×10^5 células por placa de 60 mm en 4 ml de DMEM (ThermoFisher/Mediatech cell gro) + medio de cultivo tisular FBS 10%. El medio DMEM basal se complementó con glucosa 4,5 g/l, piruvato sódico, L-glutamina 4 mM y aminoácidos no esenciales. Se añadió suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT ThermoFisher Scientific) al medio a 10 % del volumen final. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % durante una noche y fueron confluentes a aproximadamente 40-80 % el día de la transfección. Se preparó ADN plasmídico usando kits de miniprep Qiagen (Valencia, CA) QIAprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyó en 50 μl de tampón de EB. Las concentraciones de ADN se midieron usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington DE). Se transfectó ADN plasmídico usando reactivo de transfección Polyfect (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando 2,5 μg de ADN plasmídico por placa de 60 mm y 15 μl de reactivo polyfect en 150 μl de cócteles de transfección de DMEM sin suero. Después de la formación del complejo, las reacciones se diluyeron en 1 ml de medio de cultivo celular que contenía suero y todos los suplementos y se añadieron en gotas a las placas que

contenían 3 ml de medio de cultivo completo DMEM nuevo. Se incubaron transfecciones transitoria durante 48-72 horas antes de recoger sobrenadante de cultivo para análisis adicional.

Generación de transfectantes de CHO DG44 estables que expresan las moléculas de nucleasa híbridas de interés

5 Se consiguió producción estable de las moléculas de nucleasa híbridas por electroporación de un plásmido amplificable, seleccionable, pDG, que contiene el ADNc de nucleasa-Ig bajo el control del promotor de CMV, en células de ovario de hámster chino (CHO). El vector pDG es una versión modificada de pcDNA3 que codifica el
10 marcador seleccionable de DHFR con un promotor atenuado para aumentar la presión de selección para el plásmido. Se preparó ADN plasmídico usando kits de maxiprep Qiagen y el plásmido purificado se linealizó en un sitio Ascl único antes de extracción con fenol y precipitación con etanol. Se añadió ADN de esperma de salmón (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) como ADN transportador y se usaron 100 µg de cada plásmido y ADN transportador para transfectar 10⁷ células CHO DG44 por electroporación. Las células se cultivaron hasta fase logarítmica en medio Excell 302 (JRH Biosciences) que contenía glutamina (4 mM), piruvato, insulina recombinante, penicilina-
15 estreptomycin y aminoácidos no esenciales DMEM 2x (todos de Life Technologies, Gaithersburg, Md.), denominado en lo sucesivo en el presente documento medio "Excell 302 completo". Los medios para células no transfectadas también contenían HT (diluido de una solución 100x de hipoxantina y timidina) (Invitrogen/Life Technologies). Los medios para transfecciones en selección contenían diversos niveles de metotrexato (Sigma-Aldrich) como agente selectivo, que variaban de 50 nM a 1 µM. Se realizaron electroporaciones a 280 voltios, 950 microfaradios. Se permitió que las células transfectadas se recuperaran durante una noche en medio no selectivo antes de la siembra selectiva en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar) a diversas diluciones en serie que variaron de 125 células/pocillo a 2000 células/pocillo. El medio de cultivo para clonación celular fue Excell 302 completo, que contenía metotrexato 50 nM. Un crecimiento clonal fue suficiente, se exploraron diluciones en serie de sobrenadantes de cultivo de pocillos maestros con respecto a expresión de moléculas de nucleasa híbridas
20 mediante el uso de un ELISA de tipo sándwich de IgG. Brevemente, Se recubrieron placas NUNC immulon II durante una noche a 4 °C con 7,5 microgramos/ml de IgG F(ab'2) de cabra anti-ratón (KPL Labs, Gaithersburg, MD) o 2 µg/ml de IgG de cabra anti-humano o anti-ratón (Jackson Immunoresearch, West Grove PA) en PBS. Las placas se bloquearon en PBS/BSA 2-3 % y diluciones en serie de sobrenadantes de cultivo incubados a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Las placas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 0,05 % y se incubaron con IgG2a F(ab'2) de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico (Southern Biotechnologies) e IgG de cabra anti-ratón (KPL) mezclados entre sí, cada uno a 1:3500 en PBS/BSA 1,0 % o en IgG1a F(ab'2) de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano rústico (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) a 1:2500 durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces en PBS/Tween 20 0,05 % y la unión se detectó con sustrato de TMB, SureBlue Reserve (KPL Labs, Gaithersburg, MD). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de un volumen igual de IN HCl y las placas se leyeron a 450 nM en un lector de placas Spectramax Pro (Microdevices, Sunnyvale CA). Los clones con la mayor producción de la molécula de nucleasa híbrida se expandieron en matraces T25 y después T75 para proporcionar números adecuados de células para congelar y para aumentar la escala de producción de la proteína de fusión. Los niveles de producción se aumentaron adicionalmente en cultivos de los cuatro mejores clones por amplificación progresiva en medio que contiene metotrexato. En cada
30 pase sucesivo de células, el medio Excell 302 completo contenía una concentración aumentada de metotrexato, de modo que solo pudieron sobrevivir las células que amplificaron el plásmido DHFR.

Se recogieron los sobrenadantes de células CHO que expresaban la molécula de nucleasa híbrida, se filtraron a través de filtros PES express de 0,2 µm (Nalgene, Rochester, N.Y.) y se pasaron sobre una columna de proteína A-agarosa (agarosa reticulada IPA 300) (Repligen, Needham, Mass.). La columna se lavó con tampón de lavado de columna (Tris-base 90 mM, NaCl 150 mM, azida sódica 0,05 %, pH 8,7) y la proteína unida se eluyó usando tampón de citrato 0,1 M, pH 3,0. Se recogieron fracciones y se determinó la concentración de proteína a 280 nM usando un espectrofotómetro de micromuestras Nanodrop (Wilmington DE) y determinación del blanco usando tampón de citrato 0,1 M, pH 3,0. Se agruparon fracciones que contenían moléculas de nucleasa híbridas y se realizó intercambio de tampón por centrifugaciones en serie en PBS usando concentradores centricon seguido de filtración a través de dispositivos de filtro de 0,2 µm, para reducir la posibilidad de contaminación por endotoxinas.

Ejemplo 2: Construcción de genes de fusión de RNasa-Ig.

55 Se amplificó RNasa 1 murina como un ADNc de longitud completa de una biblioteca de EST (del Dr. C. Raine, Albert Einstein School of Medicine, Bronx, NY) que envió el clon al laboratorio de los inventores sin un MTA. Los cebadores 5' y 3' específicos de secuencia usados fueron de las secuencias publicadas. La secuencia del clon se verificó por análisis de secuenciación. El número de referencia de Genbank es NCBI genID 19752. Se aisló RNasa 1 humana de longitud completa de ADN con cebadores aleatorios y ADNc con cebadores de oligo dT obtenido de ARN total de páncreas humano (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX).

Una vez que se hubo aislado un clon de longitud completa, se diseñaron cebadores para crear un gen de fusión con los dominios Fc de IgG2a de ratón o IgG1 humano (SEQ ID NO:40). Se diseñaron dos cebadores diferentes para la secuencia 5' fusionada en el extremo amino terminal de la cola de Fc; el primero incorporó el péptido líder nativo de RNasa de ratón (o ser humano), mientras que el segundo unió un sitio de Agel con el extremo amino de RNasa en el
65

sitio de escisión de péptido señal para fusionar la RNasa con un péptido líder VKIII humano que ya se han clonado y usado para otros estudios de expresión. Para la RNasa murina, la secuencia del primer cebador es:

mribNL5' 30mero (RNasa 5' con líder nativo y HindIII+Kozak)

5 gTT AAg CTT gCC ACC ATg ggT CTg gAg AAg TCC CTC ATT CTg-3' (SEQ ID NO:1)
El segundo cebador crea un punto de unión de fusión génica entre una secuencia líder existente y la secuencia madura en el extremo 5' de la RNasa, en o cerca del sitio de escisión de péptido líder predicho.

10 27mero (secuencia madura de RNasa 5' (sin líder, con sitio de Agel)

5'-gAT ACC ACC ggT Agg gAA TCT gCA gCA CAg AAg TTT CAg-3' (SEQ ID NO:2)

15 La secuencia del cebador 3' para fusión con IgG2a murino en el extremo carboxilo de RNasa y el extremo amino de la cola de Fc es de la siguiente manera:

mrib3NH2 28mero (extremo 3' de RNasa con sitio de XhoI para fusión con mlgG2a).

20 5'-ggC TCg AgC ACA gTA gCA TCA AAg tGG ACT ggT ACg TAG g-3' (SEQ ID NO:3)
Se diseñaron dos oligos más para crear un gen de fusión de -Ig-RNasa, donde la cola de -Ig está en dirección amino terminal del dominio de enzima RNasa.

mrib5X Extremo 5' de RNasa de 36mero con aa enlazadores y sitio de XbaI para fusión con el extremo carboxilo del dominio Fc.

25 5'-AAA TCT AgA CCT CAA CCA ggT Agg gAA TCT gCA gCA CAg AAg TTT CAg-3' (SEQ ID NO:4) mrib3X
Extremo 3' de RNasa de 31mero con dos codones de terminación y sitio de XbaI para fusión con el extremo carboxilo del dominio Fc.

5'-TCT AgA CTA TCA CAC AgT AgC ATC AAA gTg gAC Tgg TAC gTA g-3' (SEQ ID NO:5)

30 Ejemplo 3: Aislamiento de dominios -Fc de ser humano y ratón e introducción de mutación en la secuencia codificante.

35 Para aislamiento de dominios -Fc de ratón y ser humano (SEQ ID NO:40), se obtuvo ARN de tejido de ratón o ser humano de la siguiente manera. Se generó una suspensión de células individuales de bazo de ratón en medio de cultivo RPMI. Como alternativa, se aislaron PBMC humanas de sangre completa, nueva, usando medio de separación de linfocitos (LSM) Organon Teknika (Durham, NC), capas leucocíticas recogidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante y células lavadas tres veces en PBS antes de su uso. Las células se sedimentaron por centrifugación del medio de cultivo y se usaron 2×10^7 células para preparar ARN. Se aisló ARN de las células usando el kit de aislamiento de ARN total kit QIAGEN RNeasy (Valencia, Calif.) y columnas QIAGEN QIAshredder de acuerdo con las instrucciones del fabricante que acompañan a los kits. Se usó un microgramo (4 µg) de ARN total como molde para preparar ADNc por transcripción inversa. El ARN, 300 ng de cebadores aleatorios y 500 ng de Oligo dT (12-18), y 1 µl de dNTP 25 mM se combinaron y se desnaturalizaron a 80 °C durante 5 minutos antes de la adición de enzima. Se añadió transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Life Technologies) a la mezcla de ARN más cebador en un volumen total de 25 µl en presencia de tampón de segunda cadena y DTT 0,1 M proporcionado con la enzima. Se permitió que la reacción de transcripción inversa continuara a 50 °C durante una hora. Se purificó ADNc usando columnas de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con instrucciones del fabricante y se eluyó en 40 microlitros de tampón de EB antes de su uso en reacciones de PCR.

50 Se aislaron dominios -Fc de ratón y ser humano de tipo silvestre por amplificación por PCR usando el ADNc descrito anteriormente como molde. Los siguientes cebadores se usaron para amplificación inicial de secuencias de tipo silvestre, pero incorporaron los cambios mutacionales deseados en el dominio bisagra:

mahlg1CH2M: 47mero

55 5'-tgtccaccgtgtccagcacctgaactcctgggtgatcgctcagcttcc-3' (SEQ ID NO:6)

hlgG1-5scc: 49mero

5'-agatctcgagcccaaatctctgacaaaactcacatgtccaccgtgt-3' (SEQ ID NO:7)

mahlg1S: 51mero

5'-tctagattatcatttaccggagacagagaggctcttctgctgtagt-3' (SEQ ID NO:8)

mulgG2aCH2: 58mero

60 5'-cctccatgcaaatgccagcacctaacctctgggtgatcatccttcttcc-3' (SEQ ID NO:9)

mlgG2a-5scc: 47mero

5'-gaagatctcgagccagagggtccacaatcaagccctctcctcca-3' (SEQ ID NO: 10)

mlgG2a3S: 48mero

5'-gtttctagattatcatttaccggagtcgagagaagctcttagtct-3' (SEQ ID NO:11)

65

Se realizaron reacciones de PCR usando un termociclador C1000 (BioRad, Hercules CA) o un termociclador Eppendorf (ThermoFisher Scientific, Houston TX). Las reacciones incluían una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 34 ciclos con una desnaturalización a 94 °C, durante 30 segundos, hibridación a 50 °C, durante 30 segundos y etapa de extensión a 72 °C, durante 1 minuto, seguido de una extensión de 4 minutos final a 72 °C. Una vez que se aislaron las colas de tipo silvestre, los fragmentos se clonaron por TOPO en vectores pCR2.1, se preparó ADN usando los kits de miniprep de plásmidos de centrifugación QIAGEN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los clones se secuenciaron usando reacciones de secuenciación ABI Dye Terminator v3.1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usaron ADN de los clones correctos como moldes en PCR de extensión solapantes para introducir mutaciones en las posiciones deseadas en la secuencia codificante de IgG2a de ratón o -IgG1 humano. Se prepararon reacciones de PCR usando los clones de tipo silvestre de longitud completa como molde (1 microlitro), 50 pmol de cebadores 5' y 3' para PCR de cada parte del dominio -Fc hasta e incluyendo el sitio de mutación deseado de cada dirección, y Supermix de alta fidelidad de PCR (Invitrogen, Carlsbad CA), en volúmenes de reacción de 50 microlitros usando un ciclo de amplificación corto. Como ejemplo de la mutagénesis de PCR solapante, la combinación de cebadores usada para introducir la mutación P331S en -IgG1 humano, fue de la siguiente manera:

Se amplificó un subfragmento 5' usando el clon de tipo silvestre de longitud completa como molde y el cebador 5' fue hlgG1-5scc: 5'-agatctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgt-3' (SEQ ID NO:12), mientras que el cebador 3' usando el clon de tipo silvestre de longitud completa como molde y el cebador 3' fue P331AS: 5'-gtttctcgatggaggctggaggcttggtagacc-3' (SEQ ID NO:13). Se amplificó un subfragmento 3' usando el clon de tipo silvestre de longitud completa como molde y el cebador 5' fue P331S: 5'aaggtctccaacaaagccctccagcctccatcgagaaaacaatctcc-3' (SEQ ID NO:14), mientras que el cebador 3' fue mahlgG1S: 5'-tctgattatcatttaccggagacagagaggctcttctgctgtagt-3' (SEQ ID NO:15).

Una vez que los subfragmentos se hubieron amplificado y aislado por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron por columnas de purificación en gel QIAquick y se eluyeron en 30 microlitros de tampón de EB según las instrucciones del fabricante. Después se realizaron dos ciclos de PCR con los dos subfragmentos como moldes solapantes en nuevas reacciones. El ciclador se pausó y se añadieron cebadores flanqueantes 5' (hlgG1-5scc, véase anteriormente) y 3' (mahlgG1S, véase anteriormente) a las reacciones (50 pmol cada una). Después se llevaron a cabo amplificaciones por PCR para 34 ciclos en las condiciones descritas para las moléculas de tipo silvestre anteriores. Los fragmentos de longitud completa se aislaron por electroforesis en gel y se clonaron por TOPO en vectores pCR2.1 para análisis de secuencia. Después se subclonaron fragmentos de clones con la secuencia correcta en vectores de expresión para la creación de las diferentes moléculas de nucleasa híbridas descritas en el presente documento.

Ejemplo 4: Cuantificación de proteína RSLV-124 y actividad de enzima RNasa en sueros de ratón.

Análisis de estabilidad de ratón *in vivo* de construcción RSLV-124 (SEQ ID NO:106).

Se inyectó en cuatro ratones (C220, C221, C222, C223) por vía intravenosa una única inyección de RSLV-124 en el tiempo cero. En diversos momentos después de la inyección se recogieron muestras de sangre y se analizaron con respecto a la presencia de proteína RSLV-124 (una RNasa de tipo silvestre humana unida a un dominio Fc de IgG1 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:106)) y actividad de enzima RNasa. Para detectar el compuesto RSLV-124 en suero de ratón, se desarrolló un ELISA que captura el Fc humano del suero de ratón seguido de detección de la RNasa humana. Cuando el ELISA se procesa en las muestras de sangre de los cuatro ratones la presencia de proteína RSLV-124 se detectó a los cinco minutos después de una única inyección intravenosa de 150 µg, a entre 38 µg/ml y 55 µg/ml (Figura 2). Un día después de la inyección la concentración de RSLV-124 se redujo rápidamente e entre 8 µg/ml y 12 µg/ml. La concentración en sangre del fármaco permaneció relativamente estable durante el transcurso del análisis hasta siete días cuando los niveles del fármaco en sangre fueron de aproximadamente 5 µg/ml. Las mismas muestras de sangre usadas para medir la proteína RSLV-124 por ELISA se usaron para cuantificar la actividad enzimática RNasa del fármaco. Se usó el sistema RNaseAlert QC de Ambion (Cat n.º AM1966) para medir la cinética enzimática de la proteína RSLV-124 en muestras de sangre de ratón con algunas modificaciones. El compuesto farmacológico se capturó de suero de ratón en la placa de ensayo RNaseAlert usando un anticuerpo monoclonal humano anti-Fc y se cuantificó por medición de fluorescencia según las instrucciones del kit de Ambion. El análisis de las unidades fluorescentes relativas (UFR) de la molécula RSLV-124 mostró entre 80.000 y 140.000 UFR a los cinco minutos después de la inyección (Figura 3). Las UFR se redujeron rápidamente en paralelo con la concentración de proteína, permaneciendo relativamente estables a entre 18.000 y 40.000 UFR hasta el día siete. Se usó el sistema RNaseAlert QC para desarrollar una curva patrón usando cantidades conocidas de la proteína, a partir de esta curva patrón las UFR de la RSLV-124 en las muestras de sangre se usaron para extrapolar la concentración de proteína de RSLV-124. A partir de este análisis se determinó que la concentración de proteína presente en la sangre de ratón durante el experimento de siete días como se calculó usando el ensayo de actividad enzimática de RNasa fue muy similar a los valores que se midieron usando el ELISA (Figura 4). A partir de estos experimentos se concluyó que el compuesto RSLV-124 es estable *in vivo* en circulación en ratón durante siete días y conserva su actividad enzimática, lo que sugiere que el compuesto no es susceptible de degradación *in vivo* en el ratón ya que casi el 100 % de la actividad enzimática se conserva durante siete días en la circulación del ratón. Ya

que las proteínas de fusión de Fc son con frecuencia susceptibles de degradación en la circulación este hallazgo confirma adicionalmente el uso de las proteínas de fusión de RNasa-Fc como fármacos valiosos.

Ejemplo 5: Fenotipo de ratones dobles transgénicos TLR7.1xRNasaA.

Se crearon ratones que sobreexpresan RNasa (RNasa Tg). Esta nucleasa se expresa a altos niveles en ratones RNasa Tg. Los inventores han desarrollado tanto un método de difusión radial individual (DERI) (Figura 5) como un ELISA mucho más cuantitativo para cuantificar RNasa en el suero (Figura 6). Ambos ensayos muestran un aumento significativo de la actividad RNasa en los RNasa Tg. La cuantificación del nivel de RNasa en la Figura 6 comparado con ratones B6 de tipo silvestre mostró que hubo un aumento de aproximadamente 10 veces en RNasa en los RNasa Tg. Se cruzaron ratones RNasa Tg con TLR7.1 para crear los doble Tg (DTg). Los ratones TLR7.1 tienen 8-16 copias de TLR7 y desarrollan una enfermedad de tipo lupus, muy agresiva, de rápida progresión, y empiezan a morir a los 3 meses de edad con una mediana de la supervivencia de 6 meses. En un análisis preliminar, se tomaron muestras de sangre de DTg y compañeros de camada de control a los 3 meses de edad para ver si los ratones DTg mostraban señales de mejora. Como se muestra en la Fig. 5, los ratones DTg tenían niveles muy altos de RNasa en su suero (equivalentes a >13 U/ml de RNasa basándose en el patrón de los inventores con actividad específica de 993 U/mg). También se midió la concentración de RNasaA en ratones Tg y DTg mediante ensayo ELISA como se muestra en la Fig. 6. Los ratones RNasa A Tg y TLR7. 1xRNasaA Dtg tienen concentraciones en suero de RNasa A entre 1 y 2 ng/ml.

Método detallado para ELISA de RNasa A

1. Revestir la placa con Ab anti-RNasaA Abcam (ab6610): 2,5-10 µg/ml durante una noche en 4C.
2. Lavar la placa 3 veces con Tween 0,05 %/PBS 1X
3. Bloquear con BSA 1 % en PBS durante al menos 1 hora
4. Lavar la placa 3 veces con Tween 0,05 %/PBS 1X
5. Cargar muestras. Tomar muestras de diluciones a 1:50
6. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas
7. Lavar la placa 3 veces con Tween 0,05 %/PBS 1X
8. Preparar dilución de Ab anti RNasa marcado con biotina a una dilución de 1:4500 (2,2 µg/ml). Dejar a TA durante 1 hora (Rockland 200-4688: 10 mg/ml).
9. Lavar la placa 3 veces
10. Diluir StrepAV HRP (Biolegend 405210) 1:2500. Cubrir con papel de aluminio y dejar a TA durante 25-30 min.
11. Lavar 6 veces, dejar el líquido reposar en pocillos durante al menos 30 segundos entre lavados.
12. Añadir sustrato de BD OptEIA A+B 1:1. Esperar hasta que el color cambie 5-10 min como máximo. No dejar que el patrón del pocillo superior pase de 1,0. Añadir 80 µl. (Cat N.º: 51-2606KC; ReactivoA, 51-2607KC; ReactivoB)
13. Añadir 40 µl de ácido sulfúrico 1 M para detener la reacción

Información de producto/reactivo:

- Ab de RNasaA: ab6610 (90 mg/ml)
- Tampón de ELISA: BSA 1 % en PBS
- Tampón de lavado de ELISA: Tween 0,05 %/PBS 1X
- Ab anti RNasa A conjugado con biotina: Rockland: 200-4688 (10 mg/ml)
- Strep AV HRP: Biolegend 405210
- BD OptEIA reactivo A y B: 51-2606KC y 51-2607KC

Ejemplo 6. Curvas de supervivencia para cepas de ratón transgénico TLR7.1.

Hubo una diferencia altamente significativa entre los DTg y los controles compañeros de camada TLR7.1 en la supervivencia. Como se muestra en la Figura 7, a los 10 meses, 61 % de los ratones TLR7.1 habían muerto, mientras que 31 % de los ratones DTg habían muerto. Estos datos muestran que la sobreexpresión de RNasaA ejerció un fuerte efecto terapéutico. Las razones por las que los ratones TLR7.1 mueren prematuramente no están del todo clara, aunque la anemia grave, trombocitopenia y glomerulonefritis podrían desempeñar un papel. Para determinar si los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas fueron influidos positivamente por la expresión de RNasaA en los ratones DTg, se realizaron recuentos sanguíneos pero no se encontraron diferencias entre los ratones TLR7.1 y DTg. Por el contrario, Hubo una mejora significativa en la histopatología de riñón en los ratones DTg. Se observó deposición reducida de IgG y C3 en ratones DTg. La tinción con PAS, que refleja la inflamación en el mesangio también se redujo en ratones DTg en comparación con controles compañeros de camada TLR7.1. Cuando se ha comparado ahora la infiltración de macrófagos de los riñones usando anticuerpo anti-MAC-2 (galectina3) (Lyoda et al. Nephrol Dial Transplant 22: 3451, 2007), hubo muchas menos células mac-2 positivas en los glomérulos de los ratones DTg. Los resultados del recuento de 20 glomérulos por ratón en 5 ratones en cada grupo reveló la media +/- ET de 3,8+/-1,1 y 1,4+/-0,2 para individuales frente a DTg respectivamente, p=0,05. Además, se cuantificó el tamaño del penacho glomerular y se observó una reducción significativa del tamaño del penacho glomerular en los ratones DTg (179+/-41 frente a 128+/-16,8 µm² en individual frente a DTg respectivamente, p=0,037). En resumen, los

ratones TLR7.1XRNasaA DTg sobreviven más tiempo que sus compañeros de camada Tg TLR7.1 individuales y tienen menos inflamación y lesión en sus riñones. Este hallazgo indica que la retirada de complejos inmunitarios de ARN en este modelo de ratón mejoró significativamente la mortalidad general y redujo el daño renal y la inflamación general asociada con esta patología de tipo lupus.

5

Ejemplo 7. Análisis de IRG en bazos de ratones TLR Tg.

El análisis de genes de respuesta a interferón (IRG) en los bazos de ratones TLR7.1 Tg y TLR7.1 X RNasaA DTg mostró que la expresión del gen de IRF7 (factor regulador de interferón 7 (UniProtKB P70434)) era significativamente menor en los ratones DTg ($p=0,03$). Algunos otros IRG incluyendo MX1 (proteína de unión a GTP inducida por interferón Mx1 (UniProtKB P09922)) y VIG1 (proteína que contiene dominio de S-adenosil metionina radical 2 (UniProtKB Q8CBB9)) fueron menores en ratones DTg en comparación con ratones Tg, pero las diferencias no fueron significativas. (Figura 8). Se realizó PCR cuantitativa de la siguiente manera: se aisló ARN total de bazos de ratón usando el mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), DNasa tratada usando Turbo DNA-free (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) y se produjo ADNc de primera cadena con el kit de ARN a ADNc (Applied Biosystems) usando cebadores aleatorios. La 260/280 fue entre 1,7 y 2,0 para ARN aislado medido con un NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Se diluyó ADNc hasta un equivalente de 1 ng/ μ l de ARN total y se usaron 8 μ l por reacción. Los cebadores para el gen de referencia (18s) y genes de interés (GOI) se sintetizaron (IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos) y se diluyeron a las concentraciones apropiadas para qPCR usando agua de uso molecular. Los resultados de BLAST de los cebadores muestran homología de secuencia específica solamente con el gen de referencia o GOI. Se procesaron reacciones por duplicado (20 μ l) en un sistema ABI Fast 7500 usando una mezcla 1:1 de molde y cebador para mezcla maestra de SYBR bajo-ROX SensiMix (Bioline, Londres, Reino Unido). Se calculó la cuantificación relativa usando el método de 2^{-ddCT} con ratones B6 de tipo silvestre de la misma edad como línea basal para determinar los factores de cambio para cada GOI. Las curvas de disociación para las reacciones muestran un único pico de fusión para cada gen. La curva patrón mostró eficacias de amplificación similares para cada gen y que las concentraciones de molde estaban dentro del intervalo dinámico lineal para cada uno del conjunto de cebadores.

10

15

20

25

30

Ejemplo 8: Construcción y expresión de moléculas de nucleasa híbridas de enzimas individuales y dobles DNasa1-Ig.

Se han presentado alelos de origen natural de DNasa1 humana o moléculas de tipo DNasa1. Se ha indicado previamente que la mutación A114F aparece en variantes naturales de tipo DNasa1 humana y que da como resultado resistencia a actina de las enzimas que contienen este cambio de secuencia. Véase Pan, CQ, Dodge TH, Baker DL, Prince WE, Sinicropi DV y Lazarus RA. J Biol Chem 273: 18374-18381, (1998); Zhen A, Parmelee D, Hyaw H, Coleman TA, Su K, Zhang J, Gentz R, Ruben S, Rosen C y Li Y. Biochem and Biophys Res Comm 231: 499-504 (1997); y Rodriguez AM, Rodin D, Nomura H, Morton CC, Weremowicz S y Schneider MC. Genomics 42: 507-513 (1997).

35

De manera similar, la mutación G105R se ha presentado recientemente como un polimorfismo de un único nucleótido en el gen que codifica DNasa 1 humana que es polimórfico en algunas o todas las poblaciones y que es relevante para la autoinmunidad. (Véase Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Lida R, Tsubota E, Soejima M, Koda Y, Dato H, Panduro A. Int J Biochem Cell Biol 42(7): 1216-1225 (2010)). Las variantes alélicas en esta posición dieron como resultado isoformas de DNasa 1 que albergan alta actividad en relación con el tipo silvestre. También se ha indicado que otra mutación polimórfica, de origen natural (R21S) confiere alta actividad. (Véase Yasuda, mencionado anteriormente)

40

45

Se ha indicado que enfermos de LES tienen niveles significativamente reducidos de actividad DNasa1 (véase Martínez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Bujan-Rivas S, Sellas-Fernandez A, Vilardell-Tarres M. Lupus 18(5): 418-423 (2009)).

50

Las variantes enzimáticas de origen natural pueden ser por lo tanto menos inmunogénicas cuando se administran a pacientes, ya que estas isoformas aparecen en la población humana. Los inventores han razonado que la combinación de las propiedades resistentes a actina de alelos similares a A114F con la actividad enzimática aumentada de alelos como G105R generaría variantes alélicas nuevas de DNasa1 humana que podrían mostrar actividad clínica mejorada *in vitro* e *in vivo*. Según el conocimiento de los inventores, el suyo es el primer informe de esta nueva forma mutante de DNasa1 generada a partir de una combinación de dos variantes de origen natural G105R y A114F.

55

Se aisló DNasa 1 humana como se ha descrito previamente de ARN de páncreas humano (Ambio), mediante ADNc de cebadores aleatorios y PCR usando los siguientes conjuntos de cebadores:

60

5'hDNasa1-age: GTT ACC GGT CTG AAG ATC GCA GCC TTC AAC ATC CAG (SEQ ID NO:16)

5'hDNasa1-bx: GTT CTC GAG ATC TTT CAG CAT CAC CTC CAC TGG ATA GTG (SEQ ID NO:17)

65

Como alternativa, los casetes de DNasa 3' se amplificaron por PCR usando el siguiente par de cebadores.

3'hDNasa1-RV: GTT GAT ATC CTG AAG ATC GCA GCC TTC AAC ATC CAG (SEQ ID NO:18)

3'hDNasa1-terminación: GTT TCT AGA TTA TCA CTT CAG CAT CAC CTC CAC TGG ATA GTG (SEQ ID NO:19)

5 Las reacciones de PCR se realizaron usando 50 pmol de cada cebador, ADNc 2 µl, en un volumen total de 50 µl usando Platinum PCR Supermix como se ha descrito previamente. El perfil de amplificación fue 94 C 30 s; 55 C 30 s; 68 C 90 s durante 35 ciclos.

10 Una vez que se amplificó el gen de tipo silvestre por PCR, los fragmentos se sometieron a electroforesis en gel y se purificaron fragmentos de 850 pb por purificación en columna QIAquick. Los fragmentos se clonaron en pCR2.1, se transformaron por clonación de TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante como se ha descrito para las otras construcciones. Una vez que se verificó la secuencia, los cebadores de PCR se usaron para generar subfragmentos que contenían alelos de origen natural para DNasa1 que se ha indicado que mejoran la actividad específica y mejoran la resistencia a la actividad inhibidora de actina. Estos subfragmentos contenían secuencia solapante, lo que permite la amplificación de subclones de DNasa1 completos que contienen las variaciones alélicas deseadas. Se transfectaron de forma transitoria células COS 7 en placas de 60 mm usando reactivo de transfección Polyfect (Qiagen, Valencia, CA). Se preparó ADN plasmídico usando los kits de miniprep Qiagen QIAprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se eluyeron en 50 µl de tampón de EB. Se midió la concentración de ADN usando el Nanodrop y se usó una alícuota equivalente a 2,5 µg de ADN plasmídico para cada reacción de transfección. Cada casete de expresión de DNasalg o RNasa-Ig-DNasa se insertó en el vector de expresión de mamífero pDG, un derivado de pcDNA3.1. Las células transfectadas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO₂ 5 % antes de la recogida de sobrenadantes de cultivo para análisis adicional. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo, se centrifugaron las células residuales de la solución y se transfirió el líquido a tubos nuevos.

25 Las células COS-7 se transfectaron de forma transitoria con plásmidos que contenían DNasa1 humana de tipo silvestre o alelos mutantes de DNasa 1 de origen natural (G105R y/o A114F) fusionados con el dominio Fc de IgG1 humano de tipo silvestre. Este casete de bisagra-CH2-CH3 contiene una única mutación C→S en la región bisagra para eliminar la primera cisteína en este dominio ya que está desapareada debido a la ausencia de su compañero de emparejamiento presente en la cadena ligera del anticuerpo. Además, también se expresaron proteínas de fusión multinucleasa más complejas a partir de transfecciones transitorias de células COS.

30 Ejemplo 9: Aislamiento de colas de Ig humano, introducción de mutaciones en la secuencia codificante y construcción de nucleasas mutantes

35 Para aislamiento de dominios Fc de Ig humanos mutantes, se obtuvo ARN de PBMC humanas aisladas de sangre completa, nueva, usando medio de separación de linfocitos (LSM) Organon Teknika (Durham, NC), capas leucocíticas recogidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante y células lavadas tres veces en PBS antes de su uso. Las células se sedimentaron por centrifugación del medio de cultivo y se usaron 2x10⁷ células para preparar ARN. Se aisló ARN de las células usando el kit de aislamiento de ARN total kit QIAGEN RNAeasy (Valencia, Calif.) y columnas QIAGEN QIAshredder de acuerdo con las instrucciones del fabricante que acompañan a los kits. Se usó un microgramo (4 µg) de ARN total como molde para preparar ADNc por transcripción inversa. El ARN, 300 ng de cebadores aleatorios y 500 ng de Oligo dT (12-18), y 1 µl de dNTP 25 mM se combinaron y se desnaturalizaron a 80 °C durante 5 minutos antes de la adición de enzima. Se añadió transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Life Technologies) a la mezcla de ARN más cebador en un volumen total de 25 µl en presencia de tampón de segunda cadena y DTT 0,1 M proporcionado con la enzima. Se permitió que la reacción de transcripción inversa continuara a 45 50 °C durante una hora. Se purificó ADNc usando columnas de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con instrucciones del fabricante y se eluyó en 40 microlitros de tampón de EB antes de su uso en reacciones de PCR.

50 Se aislaron dominios Fc de -Ig humanos de tipo silvestre por amplificación por PCR usando el ADNc descrito anteriormente como molde. Los fragmentos de -Ig mutantes se aislaron mediante mutagénesis dirigida por PCR, usando cebadores de PCR apropiados que contienen las mutaciones deseadas y los casetes de tipo silvestre como molde. Se realizaron reacciones de PCR usando un termociclador C1000 (BioRad, Hercules CA). Las reacciones incluían una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 34 ciclos con una desnaturalización a 94 °C, durante 30 segundos, segunda hibridación a 55 °C, durante 30 segundos y etapa de extensión a 72 °C, durante 1 minuto, seguido de una extensión de 4 minutos final a 72 °C. Una vez que se aislaron las colas mutantes de longitud completa, los fragmentos se clonaron por TOPO en vectores pCR2.1, se preparó ADN usando los kits de miniprep de plásmidos de centrifugación QIAGEN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los clones se secuenciaron usando reacciones de secuenciación ABI Dye Terminator v3.1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60 Se generaron moléculas recombinantes mediante mutagénesis por PCR usando PCR de extensión solapante con oligonucleótidos mutados.

65 Los siguientes oligonucleótidos se usaron para obtener estas moléculas.

CS-P238S 5-1: TCT CCA CCG AGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGA GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC
CCC C (58mero) (SEQ ID NO: 20)

SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC
T (58mero) (SEQ ID NO: 21)

5 P331S-S: GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC A (46mero) (SEQ ID
NO: 22)

P331S-AS: TGG AGA TGG TTT TCT CGA TGG GGG CTG GGA GGG CTT TGT TGG AGA CC (47mero) (SEQ
ID NO: 23)

10 hlgG1-3'WTnugt: TCT AGA TTA TCA TTT TCC CGG AGA GAG AGA GAG GCT CTT CTG CGT GTA GTG
(51mero) (SEQ ID NO: 24)

15 La mutación P238S y sustituciones de SCC por SSS se introdujeron por mutagénesis por PCR usando dos oligos 5'
solapantes en reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción de PCR incluyó el siguiente cebador 5' que
incorpora la mutación P238S dentro de su secuencia: CS-P238S 5-1: TCT CCA CCG AGC CCA GCA CCT GAA
CTC CTG GGA GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC C (58mero). (SEQ ID NO: 25)

20 La segunda reacción de PCR incluyó el siguiente cebador 5' que solapaba con el primer cebador y añadió los restos
de bisagra mutados restos al mutante P238S: SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA
CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC T (58mero). (SEQ ID NO: 26)

25 Se usó ADN de los clones correctos como molde en PCR de extensión solapantes para introducir mutaciones en las
posiciones deseadas en la secuencia codificante de -IgG1 humano. Se prepararon reacciones de PCR usando los
clones de longitud completa como molde (1 microlitro), 50 pmol de cebadores 5' y 3' para PCR de cada parte de la
cola de -Ig hasta e incluyendo el sitio de mutación deseado de cada dirección, y Supermix de alta fidelidad de PCR
(Invitrogen, Carlsbad CA), en volúmenes de reacción de 50 microlitros usando un ciclo de amplificación corto. Como
ejemplo de la mutagénesis de PCR solapante, la combinación de cebadores usada para introducir la mutación
P331S en el -IgG1 humano con la mutación P238S introducida fue la siguiente:

30 Se amplificó un subfragmento 5' usando el clon de tipo silvestre de longitud completa como molde y el cebador 5' fue
SSSH-5-2: AGA TCT CGA GCC CAA ATC TTC TGA CAA AAC TCA CAC ATC TCC ACC GAG CCC AGC ACC T
(58mero), mientras que el cebador 3' fue P331S-AS: TGG AGA TGG TTT TCT CGA TGG GGG CTG GGA GGG
CTT TGT TGG AGA CC (47mero). (SEQ ID NO: 27)

35 Se amplificó un subfragmento 3' usando el clon de tipo silvestre de longitud completa como molde y el cebador 5':
P331S-S: GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC A (46mero), mientras que
el cebador 3' fue hlgG1-3'WTnugt: TCT AGA TTA TCA TTT TCC CGG AGA GAG AGA GAG GCT CTT CTG CGT
GTA GTG (51mero). (SEQ ID NO: 28)

40 Una vez que los subfragmentos se hubieron amplificado y aislado por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron
por columnas de purificación en gel QIAquick y se eluyeron en 30 microlitros de tampón de EB según las
instrucciones del fabricante. Después se realizaron dos ciclos de PCR con los dos subfragmentos como moldes
solapantes en nuevas reacciones. El ciclador se pausó y se añadieron cebadores flanqueantes 5' y 3' a las
reacciones (50 pmol cada una). Después se llevaron a cabo amplificaciones por PCR para 34 ciclos en las
condiciones descritas para las moléculas de tipo silvestre anteriores. Los fragmentos de longitud completa se
45 aislaron por electroforesis en gel y se clonaron por TOPO en vectores pCR2.1 para análisis de secuencia. Después
se subclonaron fragmentos de clones con la secuencia correcta en vectores de expresión para la creación de las
diferentes moléculas de nucleasa descritas en el presente documento.

50 Para moléculas de nucleasa multiespecíficas, se realizaron reacciones de PCR usando un cebador alternativo para
el extremo 3' del dominio Fc, retirando el codón de terminación y añadiendo el enlazador de NLG y el sitio de
restricción de EcoRV a las moléculas para facilitar la fusión con el resto de los casetes. La secuencia de cebadores
se enumera a continuación: 5' GAT ATC CTG CAC GCT AGG GCT GCT CAC ATT 3'. (SEQ ID NO: 29)

55 Se construyeron nucleasas mutantes de RSLV fusionando las colas de -Ig humanos mutados con el dominio de
RNasa de tipo silvestre con o sin un enlazador que separaba los dos dominios. RSLV 125 y RSLV126 fusionan
RNasa humana con el dominio bisagra mutante y Fc de IgG1. RSLV125 no contiene ningún enlazador, mientras que
RSLV 126 contiene el enlazador (gly4ser)4 como un fragmento (BgIII-XhoI) entre el dominio de nucleasa y regiones
bisagra. RSLV-125 incorpora un casete de RNasa de tipo silvestre fusionado directamente con una versión SSS (en
60 lugar de CCC o de tipo silvestre) de la bisagra de IgG1 humano y un dominio Fc de IgG1 humano mutante P238S,
P331S (SEQ ID NO:61-62).

RSLV 126 incorpora un casete fusionado con un dominio enlazador (gly4ser)4, seguido de la bisagra mutante SSS y
un dominio Fc doble mutante P238S-P331S (SEQ ID NO:63-64).

65 RSLV-127 es una construcción de fusión multinucleasa que incorpora una DNasa humana terminal (G105R/A114F)
fusionada con un dominio enlazador (gly4ser)4, seguido de una bisagra mutante SSS y dominio Fc doble mutante

P238S-P331S fusionado con un dominio enlazador NLG y seguido de un dominio de RNasa de tipo silvestre C terminal (SEQ ID NO:65-66).

5 RSLV-128 es una construcción de fusión multinucleasa que incorpora un dominio de RNasa humana de tipo silvestre amino terminal, fusionado con un dominio enlazador (gly4ser)⁴, seguido de una bisagra mutante SSS y dominio Fc doble mutante P238S-P331S fusionado con un dominio enlazador NLG y seguido de un dominio de DNasa mutante C terminal (G105R/A114F) (SEQ ID NO:67-68).

10 RSLV-129 es una construcción de fusión multiespecífica que incorpora un dominio de RNasa humana de tipo silvestre amino terminal, fusionado con una bisagra mutante SSS y dominio Fc doble mutante P238S-P331S fusionado con un dominio enlazador NLG y seguido de un dominio de DNasa mutante C terminal (G105R/A114F) (SEQ ID NO:69-70).

15 RSLV-132 incorpora un casete de RNasa de tipo silvestre fusionado directamente con una versión de SCC de la bisagra de IgG1 humano y un dominio Fc de IgG1 humano mutante P238S, P331S (SEQ ID NO: 91-92 y 95-96).

20 RSLV-133 es una construcción de fusión multiespecífica que incorpora un dominio de RNasa humana de tipo silvestre amino terminal, fusionado con una bisagra mutante SCC y dominio Fc doble mutante P238S-P331S fusionado con un dominio enlazador NLG y seguido de un dominio de DNasa mutante C terminal (G105R/A114F) (SEQ ID NOS: 93-94 y 97-98).

25 Se muestran versiones adicionales de RSLV-125-RSLV-129 con una bisagra SCC en la Tabla 1 como RSLV-125-2 (SEQ ID NO:77-78), RSLV-126-2 (SEQ ID NO:79-80), RSLV-127-2 (SEQ ID NO:81-82), RSLV-128-2 (SEQ ID NO:83-84) y RSLV-129-2 (SEQ ID NO:85-86).

Ejemplo 10: Transferencia de Western en proteínas de fusión de RSLV 125-129 expresadas a partir de transfecciones de COS7

30 La Figura 9 muestra una transferencia de Western en sobrenadantes de transfección de COS de construcciones de RSLV 125-129. Se transfectaron plásmidos de expresión que contenían RSLV 125, 126, 127, 128 o 129 en células COS7 usando reactivo de transfección Polyfect y los sobrenadantes se recogieron después de 48 horas. Además de las moléculas de nucleasa individuales contenidas en RSLV 125 y 126, también se expresaron proteínas de fusión multinucleasa más complejas a partir de transfecciones transitorias de células COS, codificadas por RSLV 127, 128 y 129. Se realizó análisis de transferencia de Western en sobrenadantes de transfectantes transitorios. Las moléculas mostradas en la Figura 9 contienen RNasa1 humana fusionada con la bisagra de IgG1 SSS humana y dominio Fc de IgG1 P238S-P331S o incluyen RNasa1 (tipo silvestre) fusionada con el dominio Fc de bisagra SSS- (P238S-331S) CH2-CH3 de IgG1 humano, seguido de un enlazador nuevo que contiene un sitio de glucosilación ligado a N para proteger en dominio enlazador de la escisión por proteasa, y la forma de alelo mutante G105R-A114F de DNasa1 humana en el extremo carboxilo de la molécula. Además, RSLV 127 codifica la DNasa1 humana mutante anterior en el extremo amino y la RNasa 1 WT en el extremo carboxilo de la cola de -Ig mutante. Se recogieron sobrenadantes de COS después de 72 horas y se inmunoprecipitaron muestras de 0,5 ml durante una noche a 4 °C con 100 µl de perlas de proteína A-agarosa. Las perlas de proteína A se centrifugaron y se lavaron dos veces en PBS antes de resuspender en tampón de carga de SDS-PAGE, para tampón de muestras de LDS reductor o no reductor de geles NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras se calentaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las perlas de proteína A se centrifugaron para formar sedimento y el tampón de muestra se cargó en geles de gradiente de NuPAGE 5-12 %. Las muestras se sometieron a electroforesis a 150 voltios durante 1,5-2 horas y los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 30 mAmp durante 1 hora. Las transferencias de Western se bloquearon en TBS/leche desgrasada 5 % durante una noche. Las manchas de transferencia se incubaron con IgG de cabra antihumano conjugado con HRP (peroxidasa de rábano rusticano) 1:2500 (específico de Fc, Jackson Immunoresearch) durante 1,5 horas a temperatura ambiente, se lavaron en PBS/Tween20 0,5 % cinco o más veces y las manchas de transferencia se revelaron usando reactivo ECL. Los resultados demuestran que la construcción de las proteínas de fusión de Fc y nucleasa tuvo éxito y las proteínas se expresan fácilmente a partir de células COS. El análisis adicional de los perfiles reductores y no reductores para estas proteínas de fusión de Fc y nucleasa confirma que las construcciones de ADN codifican proteínas del peso molecular apropiado. El patrón en SDS-PAGE no reductor confirma que las propiedades de formación de enlaces disulfuro de las proteínas son coherentes con el comportamiento esperado de las construcciones.

Ejemplo 11: Análisis de DERI de proteínas purificadas por afinidad de transfectantes de COS7

60 La Figura 10 muestra el análisis de DERI que compara alícuotas de proteínas purificadas por proteína A de sobrenadantes de COS transfectados por RSLV del Ejemplo 10. Se preparó un gel de agarosa 2 % con agua destilada. Se disolvió Poli-IC (Sigma) en agua destilada a 3 mg/ml. La placa de gel se preparó de la siguiente manera: 1,5 ml de tampón de reacción (Tris-HCl 0,2 M pH 7,0, EDTA 40 mM y bromuro de etidio 0,1 mg/ml), 1 ml de Poli-IC y 0,5 ml de agua se colocaron en el tubo y se mantuvieron a 50 °C durante 5 min. Se añadieron 3 ml de la agarosa (mantenida a 50 °C) al tubo. La mezcla se vertió inmediatamente en una placa de vidrio. Se perforaron pocillos de muestreo en el gel. Se cargaron 2 µl de cada muestra de suero, de control, o proteínas RSLV purificadas

por afinidad, en pocillos y el gel se incubó a 37 °C durante 4 horas en la cámara húmeda. Después el gel se incubó en un tampón (acetato sódico 20 mM pH 5,2, bromuro de etidio 20 mg/ml) en hielo durante 30 min y se leyó en UV. Los geles se fotografiaron en un transiluminador UV usando un sistema de cámara digital Kodak DC290 equipado con filtros de bromuro de etidio y se analizaron usando software de captura de imágenes moleculares de Kodak. Los resultados del ensayo de actividad enzimática de RNasa indican que todas las construcciones contienen restos de RNasa catalíticamente activas.

Ejemplo 12: Actividad DNasa en gel de moléculas de nucleasa de RSLV

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de actividad nucleasa de DNasa realizado en proteína purificada por proteína A de sobrenadantes de COS7 transfectados con los plásmidos de fusión de RSLV en el Ejemplo 10. La Figura 11 muestra cinco paneles (11a, 11b, 11c), mostrando cada panel del gel el patrón de digestión con cantidades decrecientes de la proteína de fusión indicada y 1 microgramo de ADN plasmídico. Cada proteína se diluyó en serie en incrementos dobles en agua sin nucleasa de 500 ng a 4 ng de enzima. A cada muestra, se añadió 1 µg de ADN plasmídico de PDG, se incubó durante 30 minutos a 37 grados. Una mitad de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa durante 30 minutos a 100 voltios usando geles de agarosa TAE 1,2 %. La Figura 11c muestra los resultados de un ensayo de actividad enzimática de DNasa en gel usando DNasa 1 disponible en el mercado (Biolabs, Inc.). El carril más a la derecha es un control negativo con el ADN solo y sin enzima, el carril a la izquierda de ese es otro control negativo, este es una molécula de RNasa-Ig que tiene actividad RNasa pero no actividad DNasa, como se esperaba el ADN plasmídico permanece intacto y no se digiere en ambos casos. Los resultados demuestran que la enzima DNasa 1 disponible en el mercado es altamente activa y digiere todo el ADN a la mayoría de las concentraciones ensayadas. Los resultados en las Figuras 11a y 11b muestran la actividad DNasa de cuatro construcciones de fusión de Fc y nucleasa diferentes. El panel superior en la Figura 11a muestra la capacidad de una proteína de fusión de DNasa-Ig para digerir el ADN plasmídico, como resulta evidente a partir del gel, esta enzima que digiere todo el ADN a todas las concentraciones ensayadas es tan activa o más activa que DNasa 1 disponible en el mercado. En el panel inferior de la Figura 11a es una proteína de fusión de Fc y nucleasa biespecífica con la DNasa en el extremo amino terminal del Fc (SEQ ID 65-66) y también tiene actividad enzimática de DNasa robusta, pero un poco menor que la DNasa-Ig en el panel superior de la Figura 11a. El panel superior de la Figura 11b muestra la actividad enzimática de DNasa de otra nucleasa biespecífica, esta proteína de fusión de Fc tiene la DNasa en el extremo C del Fc conectada con el Fc mediante un enlazador NLG modificado técnicamente de forma expresa (SEQ ID 67-68). Como resulta evidente por los datos esta enzima también tiene actividad enzimática de DNasa robusta y parece ser más activa que las otras nucleasas biespecíficas examinadas aquí. El panel inferior de la Figura 11b muestra la actividad enzimática de DNasa de otra molécula de nucleasa biespecífica que carece del enlazador (G4S)₄ que conecta el módulo de RNasa con el Fc (SEQ ID 69-70). Esta nucleasa biespecífica también tiene buena actividad DNasa pero parece ser algo menor que las otras dos proteínas de fusión de Fc y nucleasa biespecíficas mostradas en este experimento. Estos datos sugieren que todas las nucleasas biespecíficas tienen buena actividad DNasa, lo que es inesperado dado los intentos pasados de otros a este respecto (Dwyer et al. JBC; vol 271, n.º 14; págs. 9738-9743). Además la posición de la DNasa en la construcción así como la longitud de enlazador y la composición que conecta la DNasa con el Fc son críticos en la creación de una enzima DNasa altamente activa en el contexto de una proteína de fusión de Fc y nucleasa biespecífica.

Ejemplo 13: Análisis de cinética enzimática

Las figuras 12-13 muestra resultados de un ensayo de actividad enzimática de fluorescencia cinética que compara la actividad enzimática de RNasa de RNasa A (Ambion), RSLV 125, RSLV 126, hRNasa WT-SCCH-WThlgG1 y hRNasaG88D-SCCH-(P238S/K322S/P331S)hlgG1. Para definir adicionalmente las características funcionales de la proteína de fusión de mRNasa-Ig bivalente, los inventores estudiaron la cinética enzimática de diferentes proteínas de fusión de nucleasa usando el sustrato RNase Alert (Ambion/DT) y la fluorescencia se cuantificó con un lector de microplacas Biotek Synergy2. Los datos se analizaron usando software Gen5 (Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vermont). Las unidades de fluorescencia relativas en función del tiempo se ensayaron cada minuto durante el transcurso de un experimento de 45 minutos incubado a 37 C de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando concentraciones enzimáticas decrecientes partiendo de 10 pg/µl y diluyendo en serie hasta 0,1 pg/µl por incrementos 0,67x. Cada muestra incluyó una concentración fija de sustrato RNase Alert (200 nM) en tampón de reacción RNase Alert 1X.

La Figura 12 muestra las UFR (unidades de fluorescencia relativas) frente al tiempo para cada proteína a concentraciones equimolares, con las proteínas de ensayo a 4,5 pg/µl o 4,5 ng/ml y el control de RNasaA recombinante a 1,3 pg/µl en presencia de sustrato RNase Alert 200 nM.

La Figura 13 muestra una representación de Lineweaver Burk de las diferentes moléculas. Para estimar la V_{máx} y K_m, se prepararon ensayos de fluorescencia cinéticos RNase Alert usando enzima 105 pM y la concentración de sustrato se redujo de 200 nM a 50 pM en incrementos cuádruples. De este modo, la concentración enzimática se fijó y la concentración de sustrato se valoró en esta serie de experimentos. Los datos muestran las representaciones de Lineweaver Burk generadas para las diferentes proteínas de fusión en estas condiciones. Tomados juntos los datos en las Figuras 12 y 13 demuestran que los restos de RNasa son altamente activos en las tres proteínas de fusión de Fc de RNasa construidas y ensayadas aquí.

Ejemplo 14: Evaluación de citotoxicidad *in vitro* contra la línea celular THP-1 humana

Las Figuras 14-15 muestran resultados de estudios *in vitro* que analizan los efectos de las proteínas de fusión de RNasalg con dominios Fc de -IgG (incluyendo SCC, P238S, P331S) en la supervivencia de una línea celular monocítica, THP1. Las células THP1 se mantuvieron en crecimiento logarítmico en RPMI/FBS 10 % antes de la recogida para los ensayos. Las células fueron más del 98 % viables antes de su uso en ensayos de citotoxicidad. Se sembraron células THP1 en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1×10^6 c/ml, o 100.000 células por pocillo. Se añadieron proteínas de nucleasa híbridas a pocillos sucesivos usando una serie de diluciones dobles comenzando a 5 microgramos/ml y terminando con 0,01 microgramos/ml de proteína de fusión por reacción. En este experimento se comparó una proteína de fusión de RNasa-Fc con un Fc de IgG1 de tipo silvestre (wtRNasawtlgG) con una RNasa-Fc con un Fc mutante (P238S, P331S) que tuvo unión a receptor de Fc e internalización significativamente reducidas (mtRNasamglgG), con respecto a su capacidad para inducir citotoxicidad en las células THP1 cultivadas. Las reacciones se incubaron en placas de 96 pocillos durante tres días a 37 °C, CO₂ 5 % antes de la recogida y el análisis de las células. Después de tres días, las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm, se lavaron en PBS/FBS 2 % y se incubaron con reactivos del kit de detección de apoptosis de FITC Anexina V (n.º 556547, Becton Dickinson/Pharmingen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron con 100 microlitros de tampón de unión frío proporcionado con el kit, y anexina V-FITC/yoduro de propidio (PI) añadido a 1:100 en 100 µl de tampón de unión. Las muestras se incubaron en hielo durante 20 minutos, después de lo cual se añadieron 400 µl de tampón de unión adicional a cada muestra. Las muestras teñidas se analizaron por citometría de flujo usando un FACS Canto (Becton Dickinson) y los datos se analizaron usando software Flowjo (Treestar, Ashland, OR).

La Figura 14 muestra el efecto de proteínas de fusión de Fc de RNasa con un dominio Fc de tipo silvestre o mutante en la muerte celular como se mide por dos métodos, unión de anexina V (panel superior) y unión con yoduro de propidio (panel inferior), ambas son medidas sensibles de muerte celular. Este experimento demuestra que la unión de la proteína de fusión con Fc mutante (P238S, P331S) ha reducido la unión con receptores de Fc en la superficie de las células THP1 y la posterior internalización de la proteína. Los resultados muestran una reducción significativa en la muerte celular por el mutante de RNasa-Fc en comparación con proteínas de fusión de RNasa-Fc de tipo silvestre (por ejemplo, una reducción aproximadamente triple a 1,25 µg/ml de proteína). La Figura 15 presenta los resultados de experimentos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para examinar la citotoxicidad de construcciones de fusiones de RNasa y Fc con un dominio Fc de tipo silvestre o mutante (RNasa-wtlgG o RNasa-mtlgG respectivamente). Los datos demuestran una reducción significativa en el número de células muertas cuando las células THP1 se incuban con la construcción de RNasa Fc con un Fc mutante (menor tamaño de pico a la derecha de la gráfica para el mutante de RNasa Fc en comparación con RNasa-wtlgG). Estos datos muestran una reducción de aproximadamente 3 a 5 veces en muerte celular por mutante de RNasa Fc en comparación con el tipo silvestre. Estos y otros experimentos que examinan la unión del receptor de Fc muestran claramente que en presencia de células que portan receptores de Fc la construcción de RNasa Fc con una región Fc mutada tiene unión reducida con receptores de Fc y menos internalización por células, dando como resultado menos muerte celular debido a la actividad RNasa de la construcción. Dichas construcciones son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias ya que puede ser indeseable usar un producto terapéutico proteico que es citotóxico para células portadoras del receptor de Fc.

Ejemplo 15: La producción de IFN-alfa por PBMC humanas es inhibida por la adición de RSLV-132 a cultivos *in vitro*.

La adición de RSLV132 anuló la inducción de interferón- α de células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas usando complejos inmunitarios formados con suero de tres enfermos de LES más extracto de células necróticas (NCE) (Figura 16). Para medir la capacidad de RSLV-132 para unirse con y degradar ARN contenido en los complejos inmunitarios de enfermos de lupus se desarrolló un bioensayo *in vitro*. El experimento implica la formación de complejos inmunitarios *in vitro* usando los autoanticuerpos de enfermos de lupus y NCE de células humanas cultivadas (U937). La combinación del suero de enfermo de lupus con el NCE da como resultado la formación de complejos inmunitarios (CI) que son reductores muy potentes de interferón, el suero humano normal no estimula la producción de interferón. Los CI se incuban con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células indicadoras. La producción de interferón por las células indicadoras se mide usando un ELISA de interferón- α . Se obtuvieron células indicadoras de voluntarios normales mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Se obtuvo suero de enfermos de lupus o voluntarios sanos normales según el comité de revisión institucional de la Universidad de Washington #HSD N.º 3971, el suero se diluyó 1/1000 y se añadió a 10 % (v/v) de extracto de células necróticas (NCE) obtenido de células U937 cultivadas como anteriormente. Se incubó suero diluido de enfermos de lupus o voluntarios sanos con las NCE durante 15 minutos a temperatura ambiente, los CI se incubaron con o sin diversas dosis de RSLV-132, RSLV-124 o RNasa de tipo silvestre durante 15 minutos y después se incubaron con PBMC normales durante 20 horas en presencia de 500 U/ml de IFN Universal seguido de medición de la cantidad de IFN secretado del cultivo de PBMC. El suero se obtuvo de tres (3) enfermos de lupus diferentes con diversos grados de actividad de enfermedad que varían de leve a activa. Las NCE se incubaron con suero de enfermos de lupus o suero de voluntarios sanos normales durante 15 minutos seguido de incubación de 20 horas con PBMC. Se cuantificó IFN- α mediante ELISA en el que se captura IFN- α usando un MAbs de ratón contra IFN alfa humano (MMHA-11) [PBL Biomedical Laboratories, producto n.º 2112-1] y se detectó usando un anticuerpo policlonal de conejo contra IFN alfa [PBL Biomedical Laboratories, producto n.º 31101-1], seguido de desarrollo

usando HRP anti conejo [Jackson Immuno Research, producto n.º 711-035-152] y sustrato de TMB. En algunos casos antes de la adición de las NCE a las PBMC, el artículo de ensayo (RSLV-124 o RSLV-132) se añadió a concentraciones de 0,16, 0,5, 1,6 y 5,0 µg/ml o se añadió RNasa a concentraciones de 0,05, 0,16, 0,5 y 1,6 µg/ml (equimolares) a las NCE. La capacidad del suero de enfermos de lupus para estimular la producción de IFN de las PBMC se redujo en aproximadamente 50 % con la adición de 5,0 µg/ml de RSLV-124. Esta inhibición reflejó la de una cantidad equimolar de RNasa. La adición de la misma concentración de huRSLV-132 fue tanto o más eficaz en la inhibición de IFN que RSLV-124, anulando casi completamente la producción de IFN con la adición de 5,0 µg/ml de huRSLV-132. Cuando se combinan con NCE, los anticuerpos anti-ARN/ADN de enfermos de lupus son potentes inductores de IFN de PBMC recién aisladas. El suero de voluntarios normales no tiene esta misma capacidad de estimular la producción de IFN de las células indicadoras. Estos datos indican que los autoanticuerpos que circulan en el suero de enfermos de lupus son capaces de formar complejos inmunitarios que supuestamente desencadenan TLR7 y la producción posterior de IFN. El tipo y los subtipos exactos de IFN no se analizaron. Estos datos indican que RSLV-132 se une con su diana molecular, el ARN asociado con los CI de enfermos de lupus y potencialmente lo degrada, evitando de este modo la estimulación de IFN de las PBMC (Figura 16). RSLV-132 parece ser más activo que RSLV-124 en este ensayo.

Ejemplo 16: RSLV-132 es un potente inhibidor *in vivo* de la activación de interferón inducida por ARN.

Para evaluar la capacidad de RSLV-132 para unirse con y degradar ARN en la circulación del ratón, se desarrolló un modelo farmacodinámico usando un mimético de ARN ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) que es un activador robusto de la ruta de interferón. Poli(I:C) es un ARN bicatenario desapareado en el que una cadena es un polímero de ácido inosínico, y la otra un polímero de ácido citidílico. Se sabe que interacciona con receptor de tipo toll 3 (TLR3) que se expresa en la membrana de linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Poli(I:C) está disponible de Invitrogen. Los efectos de poli I:C pueden cuantificarse midiendo los niveles de expresión de genes estimulados por interferón en el bazo del ratón después de la administración. El día cero los ratones 10 B6, de tres meses de edad, se trataron con RSLV-132 (250 µg por ratón) o inmunoglobulina intravenosa (IVIG) (Privigen, Behring) (250 µg por ratón) como un control, ambos mediante inyección peritoneal. Veinte horas después de la inyección de RSLV-132 o IVIG, se inyectó poli(I:C) en los ratones a 200 µg por ratón por vía intraperitoneal. Dos horas después, los animales se sacrificaron por exposición a CO₂, los bazos se recogieron en RNAlater (Qiagen) y se almacenaron a -80C para estudio posterior de la expresión de genes estimulados por interferón (ISG). Las muestras de bazo se sometieron a estudio de la expresión de ISG, incluyendo Irf1 (proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 (UniProt Q64282)), Irf7 (factor regulador de interferón 7 (UniProt P70434)) y gen de Mx1 por qPCR. Los resultados de estos experimentos demuestran que la inyección intraperitoneal de RSLV-132 da como resultado concentraciones en suero de RSLV-132 que son capaces de unirse con poli (I:C) en circulación y degradar eficazmente el mimético de ARN, evitando de este modo de forma eficaz la estimulación de la ruta de interferón y los tres ISG supervisados (Figura 17).

Ejemplo 17. Análisis de cinética enzimática para RSLV-132 y RSLV-133

RSLV-132 y RSLV-133 se expresaron de forma transitoria en células CHO y se purificaron usando proteína A. La actividad RNasa de estas proteínas de fusión de RNasa Fc se cuantificó usando el kit RNaseAlert QC de Ambion (Cat n.º AM1966). Se usaron diversas cantidades de la proteína de fusión de RNasa Fc y los resultados se muestran en la Figura 18 en unidades de fluorescencia relativas (UFR) a lo largo del tiempo. Los resultados demuestran que RSLV-132 es una enzima RNasa altamente activa, y tiene actividad RNasa aumentada en relación con otras construcciones de fusión de RNasa Fc tales como RSLV-124 y RNasa de tipo silvestre por ejemplo usando cantidades iguales (400 pM) de RSLV132 y RSLV-124 produce más del doble de UFR (80.000 frente a 35.000) para RSLV-132 frente a RSLV-124. Además, se ensayaron dos lotes de producción con respecto a su estabilidad a 4 C. RSLV-132.1 se almacenó a 4 C durante 8 semanas antes de este experimento y RSLV-132.2 se almacenó a -80 C y se descongeló justo antes de su ensayo, demostrando que la proteína es estable a 4 C durante hasta 2 meses. La estabilidad del fármaco y la actividad catalítica aumentada pueden proporcionar eficacia aumentada en una situación terapéutica.

La Figura 19 muestra la actividad enzimática de RNasa en UFR a lo largo del tiempo, que compara la cantidad de actividad RNasa de la molécula RSLV-133 biespecífica con la RSLV-132 mono-específica y RNasa de tipo silvestre. Como se demuestra en la Figura 19 la molécula RSLV-133 tiene actividad RNasa significativamente aumentada en relación con la molécula RSLV-124 mono-específica o, una nucleasa biespecífica Fc anterior, RSLV-123, o RNasa de tipo silvestre, que produce más de dos veces más UFR con una cantidad igual de proteína. La Figura 20 muestra los resultados de un ensayo de actividad enzimática DNasa de la molécula RSLV-133 en comparación con RSLV-123, una construcción de nucleasa biespecífica previa y DNasa de tipo silvestre. En este experimento se cuantificó la actividad enzimática DNasa usando el kit DNaseAlert de Integrated DNA Technologies. La escisión del sustrato de ADN produjo una emisión fluorescente que se cuantificó usando un lector de microplacas multimodal Synergy2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). La Figura 20 muestra las UFR de actividad enzimática DNasa a lo largo del tiempo para RSLV-133, RSLV-123 o DNasa de tipo silvestre. Los resultados del experimento demuestran que RSLV-133 tiene actividad DNasa aumentada en relación con DNasa de tipo silvestre y RSLV-123, la molécula de nucleasa biespecífica anterior, produciendo más de 3 veces más actividad DNasa en el intervalo lineal del experimento. La Figura 21 demuestra la capacidad de la molécula RSLV-133 para digerir ADN en un experimento de digestión en gel.

Los resultados muestran que RSLV-133 es capaz de digerir ADN en este ensayo tan eficazmente como DNasa de tipo silvestre (compárense carriles 5 y 7). Dados los pesos moleculares relativos de RSLV-133 y DNasa de tipo silvestre parece que RSLV-133 es más eficaz en la digestión de ADN en este ensayo también.

5 Ejemplo 18: RSLV-132 demuestra unión al receptor de Fc reducida.

Para examinar la capacidad de las proteínas de fusión de RNasa Fc para unirse con receptores de Fc *in vitro*, RSLV124 (dominio Fc de tipo silvestre) y RSLV-132 (dominio Fc mutante; P238S/P331S) se incubaron con una línea celular mieloide humana que portaba Fc, THP1 y la unión específica con las células se cuantificó mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). RLSV-124 y RSLV-132 se marcaron con fluorescencia usando colorante alexa fluor AF-647 de Invitrogen (Cat n.º A20006). Después de dializar las proteínas de fusión de RNasa Fc para retirar el colorante no unido, se incubaron diversas cantidades de las proteínas marcadas con células THP1 durante una hora, las células se lavaron rigurosamente para retirar proteína de fusión de RNasa Fc no unida y la proteína unida específicamente se cuantificó por FACS que medía la intensidad de fluorescencia media. Los resultados en la Figura 22 demuestran que la proteína RSLV-132 que tiene un dominio Fc mutante tiene significativamente menos unión a receptor Fc que RSLV-124 que tiene un dominio Fc de tipo silvestre, que muestra una reducción mayor de 4 veces en la unión con el receptor de Fc. Este hallazgo es coherente con los hallazgos previos de los inventores de que las proteínas de fusión de RNasa Fc con un dominio Fc mutante (P238S/P331S) tienen citotoxicidad significativamente reducida.

20 Ejemplo 19: Evaluación *in vitro* de actividad biológica de moléculas de nucleasa híbridas.

Se purifican una o más moléculas de nucleasa híbridas, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad o de intercambio iónico como se ha descrito previamente en los ejemplos anteriores. En algunos casos la molécula de nucleasa híbrida es un polipéptido. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye una o más secuencias de la Tabla 1. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio de nucleasa unido con un dominio Fc mutante. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio Fc mutante. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende mutaciones en los dominios bisagra, CH2 y/o CH3. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S y/o mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S y/o mutaciones en las tres cisteínas de bisagra para SSS. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SSS. En algunos casos el dominio Fc mutante se muestra en las SEQ ID NO 59, 60, 61. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO. Pueden usarse diversos dominios enlazadores (por ejemplo, los descritos en el presente documento) para unir los dominios Fc con dominios de nucleasa. Por ejemplo, pueden usarse dominios enlazadores de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más aminoácidos de longitud. Se ensayan moléculas con respecto a la actividad nucleasa específica *in vitro* usando ensayos cualitativos para verificar que poseen la función de nucleasa deseada. Después se determinan las actividades específicas en general por ensayos cinéticos basados en fluorescencia utilizando sustratos tales como los reactivos del kit RNase o DNase Alert, y un lector de placas de fluorescencia ajustado para tomar lecturas en función del tiempo. Además, las soluciones proteicas se comprueban en general con respecto a contaminación de endotoxinas usando kits disponibles en el mercado, tales como el kit de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) de Pyrotell, límite de detección de 0,06 UE/ml de Cape Cod, Inc. (E. Palmouth, MA). Después se ensayan moléculas usando una diversidad de ensayos *in vitro* para actividad biológica.

Una serie de ensayos *in vitro* medirán el efecto de las moléculas en la producción de citocinas por PBMC humanas en respuesta a diversos estímulos, en presencia o ausencia de las moléculas en los cultivos. Se cultivan PBMC humanas normales o de enfermos (aproximadamente 1×10^6 células) durante 24, 48 o 96 horas dependiendo del ensayo. Las PBMC se cultivan en presencia de estímulos tales como ligandos de TLR, anticuerpos coestimulantes, complejos inmunitarios y sueros normales o autoinmunitarios. Los efectos de las moléculas en la producción de citocinas se mide usando reactivos disponibles en el mercado, tales como los kits de pares de anticuerpos de Biolegend (San Diego, CA) para IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IFN-gamma, TNF-alfa. Se recogen sobrenadantes de cultivo de cultivos *in vitro* en puntos temporales de 24, 48 horas o posteriores para determinar los efectos de las moléculas en la producción de citocinas. La producción de IFN-alfa se mide usando, por ejemplo, anticuerpos anti IFN-alfa humano y reactivos de curva patrón disponibles de la fuente de interferón PBL (Piscataway, NJ). Se realiza un conjunto similar de ensayos usando subpoblaciones de linfocitos humanos (monocitos aislados, linfocitos B, pDC, linfocitos T, etc.); purificados usando, por ejemplo, kits de aislamiento basados en perlas magnéticas disponibles en el mercado de Miltenyi Biotec (Auburn, CA).

Además, el efecto de las moléculas en la expresión de receptores de activación de linfocitos tales como CD5, CD23, CD69, CD80, CD86 y CD25 se evalúa en diversos puntos temporales después de la estimulación. Se someten subpoblaciones de PBMC o células aisladas a citometría de flujo multicolor para determinar cómo estas moléculas afectan a la expresión de diferentes receptores asociados con la activación de células inmunitarias.

Otro conjunto de ensayos medirán los efectos de estas moléculas en la proliferación de diferentes subpoblaciones de linfocitos *in vitro*. Estos ensayos utilizarán, por ejemplo, tinción de CFDA-SE (Invitrogen, Carlsbad, CA) de PBMC humanos antes de la estimulación. CFSE a 5 mM se diluye 1:3000 en PBS/BSA 0,5 % con 10^7 - 10^8 PBMC o subconjuntos de células purificadas y reacciones de marcaje incubadas durante 3-4 minutos a 37 C antes de lavar varias veces en RPMI/FBS 10 % para retirar el CFSE restante. Las células marcadas con CFSE se incuban después en reacciones de cocultivo con diversos estímulos (ligandos de TLR, anticuerpos coestimulantes, etc.) y las moléculas durante 4 días antes del análisis de proliferación celular por citometría de flujo usando anticuerpos específicos de subpoblación celular conjugados con colorante.

Otro ensayo medirá la citotoxicidad de una o más moléculas. Este ensayo medirá la toxicidad usando tinción de anexina 5 (por ejemplo, anexina 5-FITC). Las células de interés (por ejemplo, monocitos o una línea celular de monocitos) se ponen en contacto con una molécula de nucleasa híbrida de interés (por ejemplo, una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc mutante) o uno o más controles. En diversos puntos temporales después del contacto, las células se separan de cultivo y se tiñen con anexina 5. El número de células apoptóticas o muertas se cuentan después, por ejemplo, usando citometría de flujo o un microscopio de fluorescencia. Las células puestas en contacto con una molécula de nucleasa híbrida de interés muestran números menores de células que se tiñen positivas para anexina 5 en comparación con controles positivos.

El efecto de estas moléculas en la maduración *in vitro* de monocitos en CD y macrófagos también se evalúa usando muestras de PBMC tanto normales como de enfermos.

La eficacia de una molécula de nucleasa híbrida se demuestra comparando los resultados de un ensayo de células tratadas con una molécula de nucleasa híbrida desvelada en el presente documento con los resultados del ensayo de células tratadas con formulaciones de control. Tras el tratamiento, los niveles de los diversos marcadores (por ejemplo, citocinas, receptores de superficie celular, proliferación) descritos anteriormente se mejoran en general en un grupo tratado con molécula eficaz en relación con los niveles marcadores existentes antes del tratamiento o en relación con los niveles medidos en un grupo de control.

Ejemplo 20: Administración de una molécula de nucleasa híbrida a un mamífero que lo necesite.

Se usan mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, roedores, seres humanos, cobayas) en el estudio. Se administran a mamíferos (por ejemplo, por vía intravenosa) una o más moléculas de nucleasa híbridas que comprenden una o más secuencias de la Tabla 1 o un control. En algunos casos la molécula de nucleasa híbrida es un polipéptido. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye una o más secuencias de la Tabla 1. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio de nucleasa unido con un dominio Fc mutante. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida incluye un dominio Fc mutante. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende mutaciones en los dominios bisagra, CH2 y/o CH3. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S, y puede incluir mutaciones en una o más de las tres cisteínas de bisagra. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y/o P331S y/o mutaciones en las tres cisteínas de bisagra. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y mutaciones en las tres cisteínas de bisagra para SSS. En algunos casos, el dominio Fc mutante comprende P238S y P331S y SSS. En algunos casos el dominio Fc mutante se muestra en las SEQ ID NO 59, 60, 61. En algunos casos, la molécula de nucleasa híbrida se muestra en las SEQ ID NO. Pueden usarse diversos dominios enlazadores (por ejemplo, los descritos en el presente documento) para unir los dominios Fc con dominios de nucleasa. Por ejemplo, pueden usarse dominios enlazadores de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más aminoácidos de longitud. En algunos casos la molécula de nucleasa híbrida se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos la molécula se formula como se describe en la sección de composiciones farmacéuticas anteriores. La molécula de nucleasa híbrida se dirige a RNasa y/o DNasa.

Se usan múltiples ciclos de dosis cuando se considere útil. Los efectos en los niveles de IFN-alfa, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o niveles de complejos inmunitarios en circulación se supervisan en los mamíferos. Se realizan estudios similares con diferentes protocolos de tratamiento y vías de administración (por ejemplo, administración intramuscular, etc.). La eficacia de una molécula de nucleasa híbrida se demuestra comparando los niveles de IFN-alfa, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o los niveles de complejos inmunitarios en circulación en mamíferos tratados con una molécula de nucleasa híbrida desvelada en el presente documento a mamíferos tratado con formulaciones de control.

En un ejemplo, se selecciona o se identifica un sujeto humano que necesite tratamiento. El sujeto puede necesitar, por ejemplo, reducir una causa o un síntoma de LES. La identificación del sujeto puede realizarse en una situación clínica o en otra parte, por ejemplo, en la casa del sujeto mediante el propio uso por parte del sujeto de un kit de autoensayo.

- 5 En el tiempo cero, se administra al sujeto una primera dosis adecuada de una molécula de nucleasa híbrida. La molécula de nucleasa híbrida se formula como se describe en el presente documento. Después de un periodo de tiempo después de la primera dosis, por ejemplo, 7 días, 14 días y 21 días, la condición del sujeto se evalúa, por ejemplo, midiendo los niveles de IFN-alfa, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o niveles de complejos inmunitarios en circulación. También pueden medirse otros criterios relevantes. El número y la concentración de dosis se ajustan de acuerdo con las necesidades del sujeto.
- 10 Tras el tratamiento, los niveles de IFN-alfa del sujeto, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o niveles de complejos inmunitarios en circulación se reducen y/o mejoran en relación con los niveles existentes antes del tratamiento o en relación con los niveles medidos en un sujeto similarmente aquejado pero descontrolado/de control.
- 15 En otro ejemplo, se selecciona o se identifica un sujeto roedor que necesite tratamiento. La identificación del sujeto puede realizarse en una situación de laboratorio o en otra parte.
- 20 En el tiempo cero, se administra al sujeto una primera dosis adecuada de una molécula de nucleasa híbrida. La molécula de nucleasa híbrida se formula como se describe en el presente documento. Después de un periodo de tiempo después de la primera dosis, por ejemplo, 7 días, 14 días y 21 días, la condición del sujeto se evalúa, por ejemplo, midiendo los niveles de IFN-alfa, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o niveles de complejos inmunitarios en circulación. También pueden medirse otros criterios relevantes. El número y la concentración de dosis se ajustan de acuerdo con las necesidades del sujeto.
- 25 Tras el tratamiento, los niveles de IFN-alfa del sujeto, los niveles de genes de respuesta a IFN-alfa, los títulos de autoanticuerpos, la función y patología renal y/o niveles de complejos inmunitarios en circulación se reducen y/o mejoran en relación con los niveles existentes antes del tratamiento o en relación con los niveles medidos en un sujeto similarmente aquejado pero descontrolado/de control.
- 30 Aunque la invención se ha mostrado y se ha descrito en referencia a una realización preferida y diversas realizaciones alternas, los expertos en la materia relevante entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles de la misma sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

TABLAS

TABLA 1

| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
|------------|---------------|--|
| 30 | g4s4lnk | agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtgggag tggaggaggtgggttctaccggctctcgag |
| 31 | G4S5-1 | agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtggctc aggtggtggaggatctggaggaggtgggagtaccggctctcgag |
| 32 | G4S5-2 | agatctctccggaggaggtggctcaggtggtggaggatctggaggaggtggctc aggtggtggaggatctggaggaggtgggagtctcgag |
| 33 | 3'hRNasaG88 D | gtcgacggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagcgtgcaggatatac ccttccctgggcaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggac tcagacaggttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaagatgaggcgc cggaatatgacacagggcggtgcaaacacgtgaacacctttgtgcacgagccc ctggtagatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacggg cagggcaactgctacaagagcaactccagcatgcatcacagactgccgcctg acaaacgactccaggtacccccactgtgcataccggaccagcccgaaggagaga cacatcattgtggcctgtgaaggagcccataatgtgccagtcacctttgatgct tctgtggaggactctacctataatctaga |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|------------------------|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 34 | hDNasa1-3'-G105R;A114F | gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggacgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgcggtgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtgagggtgatgctgaaatgataatctaga |
| 35 | hDNasa1-3'-WT | gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccagccattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggacgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgcggtgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtgagggtgatgctgaaatgataatctaga |
| 36 | hDNasa1-3'A114F | gatatcctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggctta gaggacgtcatgttgatgggacgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgcggtgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt gaccactatccagtgagggtgatgctgaaatgataatctaga |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|------------------------|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 37 | hDNasa1-5'-G105R;A114F | accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttgggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaaatggggcttg gaggacgtcatggtgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggccaagccatcagt gaccactatccagtgaggatgatgctgaaagatctcgag |
| 38 | hDNasa1-5'-WT | accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttgggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaaatggggcttg gaggacgtcatggtgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggccaagccatcagt gaccactatccagtgaggatgatgctgaaagatctcgag |
| 39 | hDNasa1-5'-A114F | accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttgggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcgggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccgggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaaatggggctta gaggacgtcatggtgatgggcgacttcaatgcgggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgcctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgcagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggccaagccatcagt gaccactatccagtgaggatgatgctgaaagatctcgag |
| 40 | hlgG1WT | agatctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagc acctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaagga caccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgag ccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca taatgccaagacaaagccgcgggagagcagtagacaacagcacgtaccgtggtg cagcgtcctcaccgctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggatcaagtg caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagc caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatga gctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccag cgacatcgccgtggagtgaggagacaaatgggcagccggagaaactacaagac |

| TABLA 1 | | |
|------------|---------------------------------|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| | | cacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctctacagcaagctcac cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgca tgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctgtctccgggtaa atgataatctaga |
| 41 | hDNasa1+VK3 LP | gttaagcttgccaccatggaaaccccagcgcagcttcttcttctctgctactc tggctcccagataccaccggctctgaagatcgcagccttcaacatccagacattt ggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctg agccgctatgacatcgccttggccaggagggtcagagacagccacctgactgcc gtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactac gtggtcagtgcagccactgggacggaacagctataaggagcgtacctgttctgtg tacaggcctgaccaggtgctcgcggtggacagctactactacgatgatggctgc gagccctgcgggaacgacaccttcaaccgagagccagccattgtcaggttcttc tcccggttcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccg ggggacgcagtagccgagatcgcagcctctctatgacgtctacctggatgtccaa gagaaatggggcttggaggacgtcatgttgatgggagcttcaatgcgggctgc agctatgtgagaccctcccagtggtcatccatccgctgtggacaagccccacc tccagtggtgatccccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgt gcctatgacaggatcgtggttgacagggatgctgctccgagggcgcggtgttccc gactcggctcttcccctttaaacttccaggtgcctatggcctgagtgaccaactg gccaagccatcagtgaccactatccagtgagggtgatgctgaagtga |
| 42 | hDNasa1L3 | atgtcacgggagctggccccactgctgcttctcctcctctccatccacagcgc ctggccatgaggatctgctccttcaacgtcaggtcctttggggaaagcaagcag gaagacaagaatgccatggatgtcattgtgaaggtcatcaaagcctgtgacatc atactcgtgatggaaatcaaggacagcaacaacaggatctgccccatactgatg gagaagctgaacagaaattcaaggagaggcataaacatacaactatgtgattagc tctcggcttggagaacacatataaagaacaatatgccttctctacaaggaa aagctggtgctgtgaagaggagttatcactaccatgactatcaggatggagac gcagatgtgtttccaggagccctttgtggtctggttccaatctccccacact gctgtcaaagacttctgtgattatccccctgcacaccacccagagacatccgtt aaggagatcgtatgagttgggttgagggtctacacggacgtgaaacaccgctggaag goggagaatttcattttcatgggtgacttcaatgcccggctgcagctacgtcccc aagaaggcctggaagaacatccgcttgaggactgaccccaggtttgtttggctg atcggggaccaagaggacaccacggtgaagaagagcaccaactgtgcatatgac aggattgtgcttagaggacaagaaatcgtcagttctgttcttcccaggtaaac agtgttttgacttccagaaagcttacaagctgactgaagaggaggcctggat gtcagcgaccactttccagttgaatttaaactacagtcttcaaggccttcacc aacagcaaaaaatctgtcactctaaggaagaaaaacaaagagcaaacgctcctag |
| 43 | ribonucleasa pancreática humana | atgggtctggagaagtctcttgtccggctccttctgcttgtcctgatactgctg gtgctgggctgggtccagccttccctgggcaaggaatccggggccaagaaattc cagcggcagcatatggactcagacagttccccccagcagcagctccacctactgt aaccaaatgatgaggcgcggaatatgacacagggcggtgcaaaccagtgaac acctttgtgcacgagcccctggtagatgtccagaatgtctgtttccaggaaaag gtcacctgcaagaacgggcagggcaactgctacaagagcaactccagcatgcac atcacagactgccgctgacaaaacggctccaggtaccccaactgtgcataccgg accagcccgaaggagagacacatcattgtggcctgtgaagggagcccatatgtg ccagtccactttgatgctactgtgtag |
| 44 | enlazador NLG | gtcgcagggcgcggccgcccagccccgtgaacgtgagcagccccagcgtgcaggat atc |
| 45 | g4s4lnk | dlsgggsgggsgggsgggsgggstgle |
| 46 | G4S5-1 | dlsgggsgggsgggsgggsgggsgggstgle |
| 47 | G4S5-2 | dlsgggsgggsgggsgggsgggsgggstgle |
| 48 | hDNasa1-3'-G105R;A114F | d1k1aa1n1qt1getkmsnat1vsv1vq1lsrydia1vqevrdsh1tavgk11 dnlnqdapdyhyvvseplgrnsykerlylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcrn dtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrsqswssirlwtsptfqwlipdsadtatpthcaydri vvagml1rgavvpdsalpfnfqaaygl1sdqlaqaisdhypvevmlk* |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|--|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 49 | hDNasa1-3'-WT | dilkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydialvqevrdshltavgkll dnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcgn dtfnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydri vvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqaisdhypvevmlk* |
| 50 | hDNasa1-3'A114F | dilkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydialvqevrdshltavgkll dnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcgn dtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydri vvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqaisdhypvevmlk* |
| 51 | hDNasa1-5'-G105R;A114F | tgkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydialvqevrdshltavgkll dnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcrn dtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydri vvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqaisdhypvevmlkdle |
| 52 | hDNasa1-5'-WT | tgkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydialvqevrdshltavgkll dnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcgn dtfnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydri vvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqaisdhypvevmlkdle |
| 53 | hDNasa1-5'-A114F | tgkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydialvqevrdshltavgkll dnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcgn dtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdqekwgl edvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydri vvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqaisdhypvevmlkdle |
| 54 | hlgG1WT | dlepksdkthtccppcpapelggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykc kvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrdeltknqvsltclvkgyfyps diavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltdvksrwqqgnvfscsvmh ealhnhytqkslslspgk |
| 55 | hRNasaG88D-3' | vdgasspvnvsspsvqdipslgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrr rnmtqgrckpvntfvheplvdvqncvfqekvtckngqgncyksnssmhitdcr ltdnsrypncayrtsperhiivacegspypvvhfdasvedst* |
| 56 | DNasa1 humana+VK3L P | metpaqlflfllllwpdttglkiaafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydi alvqevrdshltavgkllndnlndapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyvrdq vsavdsyyyddgcepcgndtfnrepaivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvylvdqekwglvedvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwli pdsadttatpthcaydriivagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqqlaqais dhypvevmlk* |
| 57 | DNasa1L3 | msrelapl11111sihsalamricsfnvrsfgeskqedknamdvivkvikrcdi ilvmeikdsnnricpilmeklnrnsrrgitynyvissrlgrntykeqyaflyke klsvkrsyhyhdyqgdadvfsrepfvvfwfqsptavkdfviiplhttpetsv keidelvevytdvkhwrkaenfiimgdfnagcsyvpkkawknirlrtdprfwl igdqedttvkkstncaydrivlrgqeivssvvpksnsvdfqkayklteeeald vsdhfpvefklqssraftnskksvtlrrkktkskrs* |
| 58 | ribonucleasa pancreática humana (Uniprot P07998) | Malekslvrl1111vl1111vlgwvqpslgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstyc nqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdvqncvfqekvtckngqgncyksnssm hitdcr1tngsrypncayrtsperhiivacegspypvvhfdasvedst |
| 59 | dominio Fc con SSS | cccaaattcttctgacaaaactcacacatctccaccgtctccagcacctgaactc ctgggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggaccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagac |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| | | cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaag acaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcc acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctgtctccgggtaaa |
| 60 | dominio Fc con SSS | pkssdkthtsppspapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshed pevknwvyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsn kkalpapiektiskakgqprepqvylppsrdeletknqvsltclvkgfypsdi vewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslsispkg |
| 61 | RSLV125: huVK3LP- wthRNasa-SSS- mthlgG1 P238S P331S | atggaaacccctgccagctgctgttctctgctgctgctgtggctgcccgacacc accgtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgaggcgcgggaat atgacacagggggcgtgcaaaccagtgaacaccttctgacagagccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggcaccctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataaccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgcccagctccactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccactcttctgacaaaactcacacatctccaccg agcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagcttctctctcccccaaaa cccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcagctac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctctct ccgggaaatga |
| 62 | RSLV125: huVK3LP- wthRNasa-SSS- mthlgG1 P238S P331S | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgnicyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspypvhfdasvedstlepksdkthtspp spapellgssvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevknwvyvdg vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvylppsrdeletknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksls pkg |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 63 | RSLV126: huVK3LP- WThRNasa- (g4s)4-SSS- mthlgG1-P238S- P331S | atggaaacccccagcgcagcttctctctcctcctgctactctggctcccagataacc accggtaaggaatccccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgagggcgccggaat atgacacagggggcggtgcaaacagtgaaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgcccctgacaaac ggctccaggtacccccactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgccagtcactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggagggtggctcaggtggaggatctggg ggagggtgggagtggtggagggtggttctaccggctctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactcctgggaggatcgtca gtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccct gaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtagctggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag gagcagtagacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag |
| | | gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatccccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctcctccgggaaaatga |
| 64 | RSLV126: huVK3LP- WThRNasa- (g4s)4-SSS- mthlgG1-P238S- P331S | metpaql1fl111lwpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvfcqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspypvvhfdasvedstdlsggggsggggsg gggsggggstglepkssdkthtsppspapellggssvflfppkpkdtlmisrtp evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhq dwlngkeykckvsnkalsiasietskakgpprepqvytlppsrdeltnqvs1 tclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsgfflyskltvdkrsrwqg gnvfscsvmhealthnhytqkslslspgk |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 65 | RSLV127: huVK3LP- hDNasa1 105/114-(g4s)4- SSS-mthlgG1- P238S-P331S- NLG-RNasa | atggaaacccccagcgcagcttctctctctctctgctactctgggtcccagatacc accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatc gccctgggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtgggtcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgogagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccatttcattgtcaggttcttctcccgggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcccggcccccgggagcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatgggagcacttcaatgcccggctgcagctatgtgagacc tcccagtggtcatccatccgctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggatc gtggttgagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccgaagccatcagt gaccactatccagtgagggtgatgctgaaagatctctcccggaggaggtggctca gggtggaggagatctggaggaggtgggagtggtggaggttctaccggtctcag cccaaactctctgacaaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactc ctgggaggtcgtcagctcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatg atctcccggaccctgaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccgcccggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcc aacaagccctcccagcctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggttctatcccagcagacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagcccggagaacaactacaagaccagcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctcccgggaaaagtcgacgga gctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatgcaggatatacccttccc ggcaaggaatcccgggccaagaaatccagcggcagcagatggactcagacagt tccccagcagcagctccacctactgtaaccaaagatgatgaggcgcgggaatg acacagggcggtgcaaaccagtgaaacaccttctgtgcacgagcccctggtgat gtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggcaag tggtacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgcccgctgacaaaaggc tccaggtacccaactgtgcataccgaaccagcccgaaggagagacacatcatt gtggcctgtgaaggagcccataatgtgccagtcactttgatgcttctgtgaggag gactctacctaa |
| 66 | RSLV127: huVK3LP- hDNasa1 105/114- | metpaqlflfllllwlpdttglkiaafniqtfggetkmsnatlvsyivqilsrydi alvqevrdshltavgklldnlngdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdq vsavdsyyyddgcepcrntdfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvylvdvqekwglvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwli pdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaais |
| | (g4s)4-SSS- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- RNasa | dhypvevmlkdlsgggsgggsgggsgggstglepkssdkhtsppspapel lgsavflfpkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgq prepqvtytlppsrdeltnkqvslctlvkgfypsdiavewesngqpennykttpp vldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispqkvdg asspvnvssprmqdipslgkesrakkfqrqhmddsspsstycnqmmrrnm tqgrckpvnthfheplvdvqnvcfqekvtckngqgkwyksnssmhitdcrlnq srypncayrtsperhiiivacegahmcqstlmlavedst |

| TABLA 1 | | |
|------------|--|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 67 | RSLV128: huVK3LP-hRNasa WT-(g4s)4-SSS- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | atggaaaccccagcgcagcttctctctcctcctgctactctggctcccagataacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgagggcggcgaat atgacacagggggcggtgcaaacacagtgaaacaccttctgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgcccagctccacttttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctcggaggagggtggctcaggtggggagggatcggga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggctctcgagcccaaatctctgac aaaactcacacatctccaccgagcccagcacctgaactcctggggaggatcgtca gtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctt gaggtcacatgctggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggag gagcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccggagaaccacag gtgtacacctgccccctcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctctccgggaaaagtcgacggagctagcagcccctg aacgtgagcagcccagaatgcaggatctcctgaagatcgagccttcaacatc cagacatttggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtg cagatcctgagccgctatgacatcgccctgggtccaggaggtcagagacagccac ctgactgccgtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacc tatcactacgtggtcagtgagccactgggacggaaacagctataaggagcgtac ctgttctgtacagggcctgaccaggtgctctgagggtggacagctactactacgat gatggctgagcgcctgcaggaacgacacctcaaccgagagccattcattgtc aggttcttctcccgggtcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcat gcccgggggggggacgcagtagccgagatcgacgctctctatgacgtctacctg gatgtccaagagaaatggggcttggaggacgtcatgttgatgggagcacttcaat gcccggctgacgctatgtgagaccctcccagtggtcatccatccgcctgtggaca agccccaccttccagtggtgatccccgacagcgtgacaccacagctacacc acgcaactgtgcctatgacaggatcgtggttgaggagatgctgctccgaggcgcc gttgttcccgactcggctcttccctttaaacttccagggtgcctatggcctgagt gaccaactggcccagccatcagtgaccactatccagtgagggtgatgctgaaa tga |
| 68 | RSLV128: huVK3LP-hRNasa WT-(g4s)4-SSS- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspyvvhfdaasvedstdlsgggsggggsg gggsgggstglepkssdkthtsppspapellggssvflfppkpkdtlmisrtp evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhq dwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsrdeitknqvsl tclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqq gnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkvdgasspvnvssprmquidilkiiafni qtfggetkmsnatlvsyivqilsrydialvqevrdshltavgkllldnlndapdt yhyvvseplgrnsykerylfvyvrdqvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfiv rffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvylvdvqekwglvedvmlmgdfn agcsyvrvpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydrivvagmllrga vvpdsalpfnfqaayqlsdqlaqaisdhypvevmlk |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 69 | RSLV129: huVK3LP- hRNAsaWT-SSS- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNAsa 105/114 | atggaaacccctgccagctgctgttctctgctgctgctgtggctgccgacacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgagggcggcgaat atgacacagggggcgtgcaaaccagtgaaacaccttctgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgtctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccatatgtgccagtcactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccaaattctctgacaaaactcacacatctccaccg agcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagtccttctctcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaaaggcttc tatcccagcgcacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagc aagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctct ccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatg caggatatcctgaagatcgagccttcaacatccagacatttgggggagaccaag atgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgac atcgccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgccgtggggaaagctg ctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgag ccactgggacggaacagctataaggagcgtacctgtctggtacagggcctgac caggtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgagcagccctgcagg aacgacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctccccggttaca gaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgaggccccgggggacgcagta gccgagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggc ttggaggacgtcatgttgatgggagacttcaatgcccgtgacgctatgtgaga ccctcccagtggtcatccatccgctgtggacaagccccaccttccagtggtg atccccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacagg atcgtggttgacagggatgctgctccgagggcggctgttctccgactcggctctt ccctttaacttccaggctgctatggcctgagtgaccaactggccaagccatc agtgaccactatccagtgagggtgatgctgaaatga |
| 70 | RSLV129: huVK3LP- hRNAsaWT-SSS- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNAsa 105/114 | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsststycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspyvvhfdasvedstlepkssdkthtspp spapellggssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdlngkeykckvsnkalpasiecti skakgqprepqvytlppsrdeitknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhhytqkslsls pgkvdgasspvnvssprmqdilkiaafniqtfggetkmsnatlvsyivqilsryd ialvqevrdshltavgkllldlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerlyfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrntdfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgda aaidalydvylvdvqekwglevmlmgdfnagcsyvrrpsqwssirlwtsptfqwl ipdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaaaglsdqlaqai sdhypvevmlk |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|--------------------------------------|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 71 | dominio Fc con P238S-2 (bisagra SCC) | cccaaactcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag aaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtggtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcc aacaagccctcccagccctatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctggcacaaggcttctatcccagcgcacatgcc gtgagtgaggagcaatggcagccgagagaacaactacaagaccacgcctccc |
| | | gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctcctccgggaaaa |
| 72 | dominio Fc con P238S-2 (bisagra SCC) | pkssdkthtppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshed pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvlvtvlhqdwlngkeykckvs nkalspapiektiskakgqpprepqvytlppsrdeltnqvsltlvkgfypsdi vewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnyhtqkslslspgk |
| 73 | dominio Fc con P331S-2 | cccaaactcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgccagcacctgaactc ctgggaggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag aaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtggtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcc aacaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctggcacaaggcttctatcccagcgcacatgcc gtggagtgggagagcaatggcagccgagagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctcctccgggaaaa |
| 74 | dominio Fc con P331S-2 | pkssdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshed pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvlvtvlhqdwlngkeykckvs nkalspasiektiskakgqpprepqvytlppsrdeltnqvsltlvkgfypsdi vewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnyhtqkslslspgk |
| 75 | dominio Fc con SSS, P238S y P331S-2 | cccaaactcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag aaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtggtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcc aacaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctggcacaaggcttctatcccagcgcacatgcc gtggagtgggagagcaatggcagccgagagaacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctcctccgggaaaa |
| 76 | dominio Fc con SSS, P238S y P331S-2 | pkssdkthtspspapellggssvflfppkpkdtlmisrtpvctvvdvshed pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvlvtvlhqdwlngkeykckvs nkalspasiektiskakgqpprepqvytlppsrdeltnqvsltlvkgfypsdi vewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnyhtqkslslspgk |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 77 | RSLV125-2: huVK3LP- wthRNasa-SCC- mthIgG1 P238S P331S | atggaaaccctgccagctgctgttctctgctgctgctggtgcccgacacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgagggcgccggaat atgacacagggggcggtgcaaacaccagtgaacacctttgtgacagagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgcccagctccactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccataatctctgacaaaactcacacatgtcccagc tgcccagcacctgaactcctgggaggatcgtcagctcttctctcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcagcgtac cgtggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcc |
| | | cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac tacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctct ccgggaaaatga |
| 78 | RSLV125-2: huVK3LP- wthRNasa-SCC- mthIgG1 P238S P331S | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspypvhfdasvedstlepksdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqprepqvylpplsrdeltknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhhytqkslsls pgk |
| 79 | RSLV126-2: huVK3LP- WThRNasa- (g4s)4-SCC- mthIgG1-P238S- P331S | atggaaaccctcagcagcttctcttctctgctactctggctcccagataacc accggtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgagggcgccggaat atgacacagggggcggtgcaaacaccagtgaacacctttgtgacagagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgcccagctccactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggaggtggctcaggtggtggagatctgga ggaggtgggagtggtggaggtggttctaccggtctcgagcccaaatcttctgac aaaactcacacatgtccaccgtgccagcacctgaactcctgggaggatcgta gtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccct gaggtcacatgctggtggtggagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggag gagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggtgggagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacag cagaagagcctctctctctctccgggaaaatga |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 80 | RSLV126-2: huVK3LP- WThRNasa- (g4s)4-SCC- mthlgG1-P238S- P331S | metpaql1fl1111wlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsststycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvfcqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtsperhiiivacegspyvvhfdasvedstdlsgggsgggsg ggsgggstglepkssdkthtppcpapel1ggssvflfppkpkdtlmisrtp evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhq dwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsrdeltknqvs1 tclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqq gnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk |
| 81 | RSLV127-2: huVK3LP- hDNasa1 105/114-(g4s)4- SCC-mthlgG1- P238S-P331S- NLG-RNasa | atggaaaccccagcgcagcttctcttctcctcctgctactctggctcccagatacc accggtctgaagatcgcagccttcaacatccagacatttggggagaccaagatg tccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgacatg gccctggtccaggaggtcagagacagccacctgactgcccgtggggaagctgctg gacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggctcagtgagcca ctgggacggaacagctataaggagcgtacctgttcgtgtacaggcctgaccag gtgtctgcggtggacagctactactacgatgatggctgcgagccctgcaggaac gacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccgggttcacagag gtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcccggggggacgcagtagcc gagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggcttg gaggacgtcatgttgatggggcacttcaatgcccggctgcagctatgtgagaccc tcccagtggtcatccatccgctgtggacaagccccaccttccagtggtgatc cccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgcctatgacaggtatc gtggtgacagggatgctgctccgaggecgttgttcccgactcggctcttccc ttaaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatcagt |
| | | gaccactatccagtgagggtgatgctgaaagatctctcccggaggaggtggctca ggggggaggatctggaggaggtgggagtggtggagggttctaccggtctcgag cccaaactctctgacaaaactcacacatgtccaccgtgccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagctcttctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatg atctcccggaccttggaggtcacatgctggtggggagcgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaag acaaagccgcccggaggagcagtaaacagcagctaccgtggtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctcc aacaagccctcccagcctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggtagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgaggagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctcccgggaaaagtcgacgga gtagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatgcaggatatcccttccctg ggcaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagacagt tccccagcagcagctccacctactgtaaccaaagatgagggcgcgggaatag acacaggggcggtgcaaaccagtgaaacaccttgggtgacagagcccctgtagat gtccagaatgtctgttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggcagggcaag tggtacaagagcaactccagctgacatcacagactgcccctgacaaaacggc tccaggtacccaactgtgcataccgaaccagccccgaaggagagacacatcatt gtggcctgtgaaggagccccatagtgccagctccactttgatgcttctgtggag gactctacctaa |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 82 | RSLV127-2: huVK3LP- hDNasa1 105/114-(g4s)4- SCC-mthlgG1- P238S-P331S- NLG-RNasa | metpaql1fl1111wlpdttgk1aafniqtfggetkmsnatlvsvyivqilsrydi alvqevrdshltavgklldnlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylffvyrpdq vsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdava eidalydvylvdqekwgleedvmlmgdfnagcsyvrsqwssirlwtspftqwli pdsadttatpthcaydrivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqais dhypvevmlkdlsgggsgggsgggsgggstglepkssdkthtccppcappel lggssvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgg prepqvylppsrdeltnkqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpp vldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealthhnyhtqksls1s1spgkvdg asspvnvssprmqdipslgkesrakkfqrqhmdsdsspsststycnqmmrrnm tqgrckpvntfvheplvdvqnvfcqekvtckngqgkwyksnssmhitdcr1ng srypncayrtspkerhiivacegahmcqstlmlavedst |
| 83 | RSLV128-2: huVK3LP-hRNasa WT-(g4s)4-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | atggaaaccccagcgcagcttctcttctcctcctgctactctggctcccagatacc accgtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacctactgtaaccaaatagatgaggcgccggaat atgacacagggggcgtgcaaacacagtgaaacaccttctgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggcaccctgcaagaacgggcagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgcctgacaaac ggctccaggtaccccaactgtgcataaccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaagggagcccataatgtgccagtcactttgatgcttctgtg gaggactctacagatctctccggaggagggtggctcagggtggaggatctgga ggagggtgggagtggtggagggtggttctaccggctctcgagcccaaactctctgac aaaactcacacatgtccaccgtgccagcactgaactcctgggaggatcgtca gtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccct gaggtcacatgctggtgggtggagcgtgagccacgaagaccctgaggcaagttc aactggtagctggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag gagcagtaaacagcagctaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaaagccctcca gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcagcctg acctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagc aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggagcagcag gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg cagaagagcctctctctctcctccgggaaaagtcgacggagctagcagccccgtg |
| | | aacgtgagcagccccagaatgcaggatcctgaagatcgagccttcaacatc cagacatttggggagaccaagatgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtg cagatcctgagccgctatgacatcgccctggtccaggaggctcagagacagccac ctgactgccgtggggaagctgctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacc tactactacgtggtcagtgagccactgggacggaacagctataaggagcgtac ctgttcgtgtacagccctgaccaggtgtctgcggtggacagctactactacgat gatggctgagcagccctgcaggaacgacacctcaaccgagagccattcattgtc aggttcttctcccgttcacagaggtcagggagtttgccattgttcccctgcat gcgccccgggggacgcagtagccgagatcgacgctctctatgacgctactcctg gatgtccaagagaaaatggggcttgaggacgtcatgttgatggcgacttcaat gcgggctgcagctatgtgagaccctcccagtggtcatccatcccgcctgtggaca agccccaccttccagtggtgatccccgacagcgtgacaccacagctacacc acgcaactgtgcctatgacaggatcgtggttgaggatgctgctccgagggcgc gttgttcccgactcggctcttcccttaactccaggctgcctatggcctgagt gaccaactggccaagccatcagtgaccactatccagtgagggtgatgctgaaa tga |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|--|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 84 | RSLV128-2: huVK3LP-hRNasa WT-(g4s)4-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | metpaql1fl1111wlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngggncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspypvhfdasvedstdlsgggsgggsg ggsggggstg1epkssdkthtppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtp evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhq dwlngkeykckvsnkalpasiektiskakggpprepqvytlppsrdeltknqvs tclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdfsfflyskltvdksrwqq gnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkvdgasspvnvssprmqdilkiaafni qtfggetkmsnatlvsiyivqilsrydialvqevrdshltavgkllldlnqdpdt yhyvvseplgrnsykerylvyrypdqvsavdsyyyddgcepcrntdfnrepfiv rffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalydvlydvqekwglevmlmgdfn agcsyvrsqwssirlwtsptfqlwlpdsadttatpthcaydrivvagmllrga vvpdsalpfnfqaaayglsdq1aqaisdhypvevmlk |
| 85 | RSLV129-2: huVK3LP- hRNasaWT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | atggaaaccctgccagctgctgttccctgctgctgctgctggctgccgacacc accgtaaggaatcccgggccaagaaattccagcggcagcatatggactcagac agttccccagcagcagctccacactactgtaaccaaatgatgaggcgccggaat atgacacagggcggtgcaaaccagtgaaacacctttgtgcacgagcccctggta gatgtccagaatgtctgtttccaggaaaaggtcacctgcaagaacgggagggc aactgctacaagagcaactccagcatgcacatcacagactgccgctgacaaac ggctccaggtacccccactgtgcataaccggaccagcccgaaggagagacacatc attgtggcctgtgaaggagcccataatgtgccagtcacactttgatgcttctgtg gaggactctaccctcgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgtccaccg tgcccagcactgaaactcctgggaggatcgtcagtccttctcttcccccaaaa cccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgggtg gacgtgagccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtagctggagggcgtg gagggtgataatgccaagacaaaagccgaggaggagcagtagaacagcagctac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag tacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttc tatcccagcagcatcgccgtggagtgggagagcaatgggagcgggagacaac tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagc aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagcgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcagagaagagcctctctctctct ccgggaaaagtgcagcggagctagcagccccgtgaacgtgagcagccccagaatg caggatctcctgaagatcgagccttcaacatccagacatttggggagaccaag atgtccaatgccaccctcgtcagctacattgtgcagatcctgagccgctatgac atcgccctgggtccaggagggtcagagacagccacctgactgccgtggggaagctg ctggacaacctcaatcaggatgcaccagacacctatcactacgtggtcagtgag ccactgggacggaacagctataaggagcgtacctgttctgttacaggcctgac caggtgtctgctggagcagctactactacgatgatggctgcagcctgacag aacgacaccttcaaccgagagccattcattgtcaggttcttctcccgggtcaca gaggtcagggagtttgccattgttcccctgcatgcggccccggggagcgcagta gccgagatcgacgctctctatgacgtctacctggatgtccaagagaaatggggc |
| | | ttggaggacgtcatgttgatgggagcacttcaatgcgggctgcagctatgtgaga ccctcccagtggtcatccatccgctgtggacaagccccacctccagtggtg atccccgacagcgtgacaccacagctacaccacgcactgtgctatgacagg atcgtggttgacagggatgctgctccgaggcgccgttgttcccgaactcggtctt ccctttaacttccaggctgcctatggcctgagtgaccaactggcccaagccatc agtgaccactatccagtgagggtgatgctgaaatga |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 86 | RSLV129-2: huVK3LP- hRNAsaWT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNAsa 105/114 | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvfcfgekvtckngggncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspyvvhfdasvedstlepksdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiekti skakgqpprepqvytlppsrdeletknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgkvdgasspvnvssprmqdilkiaafniqtfggetkmsnatlvsyivqilsryd ialvqevrdshltavgkllnlnqdapdtyhyvseplgrnsykerlylfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrffsrftevrefaiivplhaapgdav aeidalvdyldvqekwglvedvmlmgdfnagcsyvrpsqswsirlwtsptfql ipdsadtatpthcaydrivvagmlrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqai sdhyvvevmlk |
| 87 | dominio Fc con SCC | cccaaactcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgtccagcacctgaactc ctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag aaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcc aacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctcctcgggtaaa |
| 88 | dominio Fc con SCC | pkssdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshed pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvs nkalpapiektiskakgqpprepqvytlppsrdeletknqvsltclvkgfypsdi vewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslslspsgk |
| 89 | dominio Fc con SCC, P238S y P331S-2 | cccaaactcttctgacaaaactcacacatgtccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggaggatcgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag aaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcc aacaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag aaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgcc gtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctctctctcctcgggaaaa |
| 90 | dominio Fc con SCC, P238S y P331S-2 | pkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshed pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvs nkalpasiektiskakgqpprepqvytlppsrdeletknqvsltclvkgfypsdi vewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslslspsgk |
| 91 | RSLV132: huVK3LP- wthRNAsa-SCC- mthlgG1 | atggaaaccctgcccagctgctgttctctgctgctgctgtggctgectgacacc accggcaagagctcccgggccaagaagtccagcggcagcacatggactccgac tccagccctccagctcctccactactgaaccagatgatgcggcgggagaac atgaccaggccgggtgcaagcccgtgaacaccttctgtcagcagcccctggtg acatcacaacatattttcaacagaaaatgaacctcaaaaacacccagacc |

ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| | P238S P331S | aactgctacaagtccaactcctccatgacacatcaccgactgccggctgaccaac ggctccagataccccaactgcgctaccggacctccccaaagaacggcacatc atcgtggcctgcgagggctctccttacgtgcccgtgcacttcgacgcctccgtg gaagattccaccctggaacccaagtccctccgacaagaccacacactgtccccct tgtcctgccccctgaactgctggcggtcctccgtgttctctgttcccccaag cccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtacatgctggtggtg gatgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggggtg gaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctac cgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggaaaagag tacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgccgcctccatcgaaaagaccatc tccaaggccaaggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagc agggacgagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgcctcgtgaagggttc taccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaac tacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctcattcttctctgactcc aagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctcc gtgatgcacgaggctctgcacaaccactacaccagaagtcctctgctccctgagc cccgcaaatga |
| 92 | RSLV132: huVK3LP- wthRNasa-SCC- mthlgG1 P238S P331S | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdrltn gsrypncayrtspkerhiivacegspypvhfdasvedstlepksdkthtcpp cpapellggssvflfppkpktlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalsiekti skakgqpprepqvytlppsrdeletknqvsletclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk |

| TABLA 1 | | |
|------------|--|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 93 | RSLV133: huVK3LP- hRNA ^s WT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNA ^s 105/114 | atggaaaccctgccagctgctgttccctgctgctgctgtggctgcccagacc accggcaaagagagccgggccaagaagtccagcggcagcacatggacagcgac agcagcccagcagctccagcacctactgcaaccagatgatgcggggagaac atgaccagggccggtgcaagcccgtgaacaccttcgtgcacgagcccctggtg gacgtgcagaacgtgtgttttcaagaaaaagtacctgcaagaacggccagggc aactgctacaagagcaacagcagcatgcacatcacctgactgcccggctgaccaac ggcagcagatacccactgcccctaccggaccagccccaaagaacggcacatc atcgtggcctgogagggcagcccttacgtgcccgtgactttgacgccagcgtg gaagatagcaccctggaacccaagagcagcagcagaagaccacactgtcccccc tgccctgcccctgagctgctggggcgaagcagcgtgttccctgttcccccaag cccaaggacaccctgatgatcagccggacccccgaagtacctgctgtgggtggg gatgtgtcccacgaggacccccgaagtgaagtcaattggtacgtggacggcgtg gaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctac cgggtgggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagag tacaagtgcaaggctccaacaaggccctgcccggcagcatcgagaaaaccatc agcaaggccaaggccagcctcgcgagccccagggtgtacacactgccccccagc cgggacgagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgctggtgaaaggtctc taccacagcgatcgcgcgtggaatgggagagcaacggccagccccgagaacaac tacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcattcttccctgtacagc aagctgaccgtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagc gtgatgcacgaggccctgcacaaccactaccccagaagtccctgagcctgagc cccggcaagggtggacggcgcagctcccctgtgaacgtgtccagccccagcgtg caggacatcctgaagatcgccgccttcaacatccagaccttcggcgagacaaag atgagcaacgccaccctggtgtcctacatcgtgcagatcctgagcagatcagat atcgccctggtgcaagaagtgcgggacagccacctgaccgcccgtgggcaagctg ctggacaacctgaaccaggacgccccgacacctaccactacgtggtgtccgag cctctgggcccgaacagctacaaagaaagataacctgttcgtgtaccggccccgat caggtgtccgcccgtggacagctactactacgacgacggctgcgagccccctgccc aacgacaccttcaaccgcgagcccttcatcgtgcggttcttcagccggttcacc gaagtgcgcgagttcgccatcgtgcccctgcatgctgcccctggcgacgcccgtg gccgagatcgatgccctgtacgacgtgtacctggatgtgcaagaaaagtggggc ctggaagatgtgatgctgatgggagcttcaacgcccgtgcagctacgtgccc cccagccagtggtccagcatcagactgtggacctccccaccttcagtggtg atccccgacagcggcagataccaccgccccccccacctgtgacctacgacaga atcgtggtggccggcatgctgctgagaggcgccgtggtgacctgacagcgcctg |
| | | ccattcaattttcaagccgctacggcctgagcgatcagctggcccaggccatc agcgaccactaccccgtggaagtgatgctgaagtga |
| 94 | RSLV133: huVK3LP- hRNA ^s WT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNA ^s 105/114 | metpaqlflfllllwlpdttgkesrakkfqrqhmdsdsspsstycnqmmrrrn mtqgrckpvntfvheplvdvqnvfcqekvtckngqgncyksnssmhitdcrln gsrypncayrtspkerhiivacegspyvvhfdasvedstlepksdkthtcpp cpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalsiakti skakgpprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhtqkslsls pgkvdgasspvnvsspsvqdilkiaafniqtfggetkmsnatlvsiyivqilsryd ialvqevrdshltavgkllldlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpd qvsavdsyyyddgcepcrndtfnrepfivrrfrrftevrefaivplhaapgdav aaidalydvylvdvqekwglcdvmlmgdfnagcsyvrpsqswssirlwtsptfqwl ipdsadtatpthcaydriivvagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqai sdhypvevmk |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 95 | RSLV132: wthRNasa-SCC- mthlgG1 P238S P331S | aaagagtcccgggccaagaagtccagcggcagcacatggactccgactccagc ccttccagctcctccacactactgcaaccagatgatgcgggcgagaaacatgacc cagggccgggtgcaagcccgtagaacctttgtgcacgagcccctggaggactg cagaacgtgtgttttcaagagaaagtgacctgcaagaacggccagggcaactgc tacaagtccaactcctccatgacatcaccgactgcccggctgaccaacggctcc agataccccaactgcgctaccggacctccccaaagaacggcacatcatcgtg gcctgaggggctctccttacgtgcccgtgcaacttcgacgcctccgagggaagat tccaccctggaacccaagtccctccgacaagaccacacctgtccccctgtcct gccccctgaactgctgggaggtcctccgtgttcctgttcccccaagcccaag gacaccctgatgatctccggaccccccgaagtgacatgctggtggaggatgtg tcccacgaggaccctgaagtgaagtcaattggtacgtggacgggggtggaagtg cacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtg gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggaaaagagtacaag tgcaaggtgtccaacaaggccctgcccgcctccatcgaaaagaccatctccaag gccaagggccagccccgggaacccccagggtgtacacactgccccctagcaggac gagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgctcgtgaagggttctacccc tccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaag accacccccctgtgctggacagcgacggctcattcttctgactccaagctg acagtggacaagtcccggtagcagcagggcaacgtgttctcctgctccctgatg cacgaggctctgcacaaccactacaccagaagtcctgtcctgagccccggc aatga |
| 96 | RSLV132: wthRNasa-SCC- mthlgG1 P238S P331S | kesrakkfqrqhmdsdsspsstycnqmmrrnmtqgrckpvnfvheplvdv qnvcfqekvtckngqgncyksnssmhitdcrlnsrypncayrtspkerhiiv acegspyvvhfdasvedstlepkssdkthtppcpapellgssvflfppkpk dtlmisrtpvctcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiectiskakgpprepqvytlppsrd eltknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskl tvdksrwqgnvfscsvmhealhhnytqkslsispk |
| 97 | RSLV133: hRNasaWT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNasa 105/114 | aaagagagccggggccaagaagtccagcggcagcacatggacagcgacagcagc cccagcagctccagcacctactgcaaccagatgatgcgggcgagaaacatgacc cagggccgggtgcaagcccgtagaaccttcgtgcacgagcccctggaggactg cagaacgtgtgttttcaagaaaaagtgacctgcaagaacggccagggcaactgc tacaagagcaacagcagcatgacatcaccgactgcccggctgaccaacggcagc agataccccaactgcgctaccggaccagccccaaagaacggcacatcatcgtg gcctgaggggagcccttacgtgcccgtgcaacttgacgcagcgtggaagat agcaccctggaacccaagagcagcagacaagaccacacctgtccccctgcct gccccctgagctgctgggaggaagcagcgtgttcctgttcccccaagcccaag gacaccctgatgatcagccggaccccccgaagtgacctgctggtggaggatgtg tcccacgaggaccctgaagtgaagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtg cacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtg gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggaaaagagtacaag tgcaaggtctccaacaaggccctgcccgcagcatcgagaaaaccatcagcaag gccaagggccagcctcgcgagccccagggtgtacacactgccccccagccgggac gagctgaccaagaaccagggtgtccctgacctgctggtgaaaggcttctacccc aqcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggccagcccagagacaactacaag |

| TABLA 1 | | |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| | | accacccccctgtgctggactccgacggctcattcttctctgtacagcaagctg accgtggacaagagccggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatg cacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccggc aaggtggacggcgccagctcccctgtgaacgtgtccagccccagcgtgcaggac atcctgaagatcgccgccttcaacatccagaccttcggcgagacaaagatgagc aacgccaccctggtgtcctacatcgtgcagatcctgagcagatacगतatcgcc ctggtgcaagaagtgcgggacagccacctgaccgctgggcaagctgctggac aacctgaaccaggacgccccgacacctaccactacgtggtgctccgagcctg ggccggaacagctacaaagaaagatacctgttcgtgtaccggccccgatcaggtg tccgccgtggacagctactactacgacgacggctgagcctgcccgaacgac accttcaaccgagccttcatcgtgcggttcttcagccggttcaccgaagtg cgcgagttcgccatcgtgcccctgatgctgcccctggcgacgccgtggccgag atcgatgccctgtacgacgtgtacctggatgtgcaagaaaagtgggcctggaa gatgtgatgctgatggcgacttcaacgcccgtgcagctacgtgcccagc cagtggtccagcatcagactgtggacctccccaccttccagtggctgatcccc gacagcggcgaataccaccgccacccccacccactgtgcctacgacagaatcgtg gtggccggcatgctgctgagaggcggcgtggtgctgacagcgcctgccattc aatttcaagccgctacggcctgagcgatcagctggccaggccatcagcgac cactaccccgaggagtgtgctgaagtga |
| 98 | RSLV133: hRNAsaWT-SCC- mthlgG1-P238S- P331S-NLG- hDNAsa 105/114 | kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtckngqncyksnssmhitdcrlnsrypncayrtspkerhiiv acegspyvvhfdasvedstlepkssdkthtppcpapellgssvflfppkpk dtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspasiektiskakgpprepqvytlppsr eltknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgfflyskl tvdksrwqqgvfscsvmhealhhnytqkslslspgkvdgasspvnvsspsvqd ilkiaafniqtfggetkmsnatlvsvivqilsrydialvqevrdshltavgkll nlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcr ndtfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalvdvldvqekwgle dvmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydriv vagmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhyppvevmlk |
| 99 | NLGlnk2 | vdgasspvnvsspsvqdi |
| 100 | líder VK3LP | metpaqlflllwpdtt |
| 101 | hRNAsaWT (madura) UniProt P07998) | kesrakkfqrqhmdsdsspsssstycnqmmrrrnmtqgrckpvntfvheplvdv qnvcfqekvtckngqncyksnssmhitdcrlnsrypncayrtspkerhiiv acegspyvvhfdasvedst |
| 102 | hDNAsa 1 (madura) UniProt P24855 | lkiaafniqtfggetkmsnatlvsvivqilsrydialvqevrdshltavgkll nlnqdapdtyhyvvseplgrnsykerylfvyrpdqvsavdsyyyddgcepcgnd tfnrepfivrffsrftevrefaivplhaapgdavaeidalvdvldvqekwgle vmlmgdfnagcsyvrpsqwssirlwtsptfqwlipdsadttatpthcaydriv agmllrgavvpdsalpfnfqaayglsdqlaqaisdhyppvevmlk |
| 103 | hDNAsa 1L3 (madura) UniProt Q13609 | mricsfnvrsfgeskqedknamdvivkvikrcdiilvmeikdsnnricpilmek lnrnsrrgitynyvissrlgrntykeqyaflykeklsvkrshyhdvqgdad vfsrepfvvwfqsphatavkdfviiplhttpetsvkeidelveytdvkhwrkae nfi fmgdfnagcsyvpkkawknirldprfwlignqdedttvkkstncaydri vlgqevivssvvpksnsvfdfqkayklteeealdvsdhfpvefklqssraftns kksvtlrkktkskrs |
| 104 | hTRESX1 | mgpgarrqgrivqgrpemcfcppptplpplrilrtlgthtptpcsspsgsaagtyp tmgsqalppgpmqtliffdmeatglpfsqpkvtelc llavhrcalespptsqgp pptvppprvvdklslcvapgkacspaaseitglstavlaahgrqcfdnlanl llaflrrqpqpwclvahngdrydfllqaelamlgltsaldgafcvdsitalka lerasspsehgpkrksylgsiytrlygqspdshtaegdvlallsicqwrpqa lrvvdaharpgfirtprmygtasartkprpsavtttahlatrntspslgesrg tkdlppvkdpgalsreqllaplqlailtlatvatlyglsatpge |

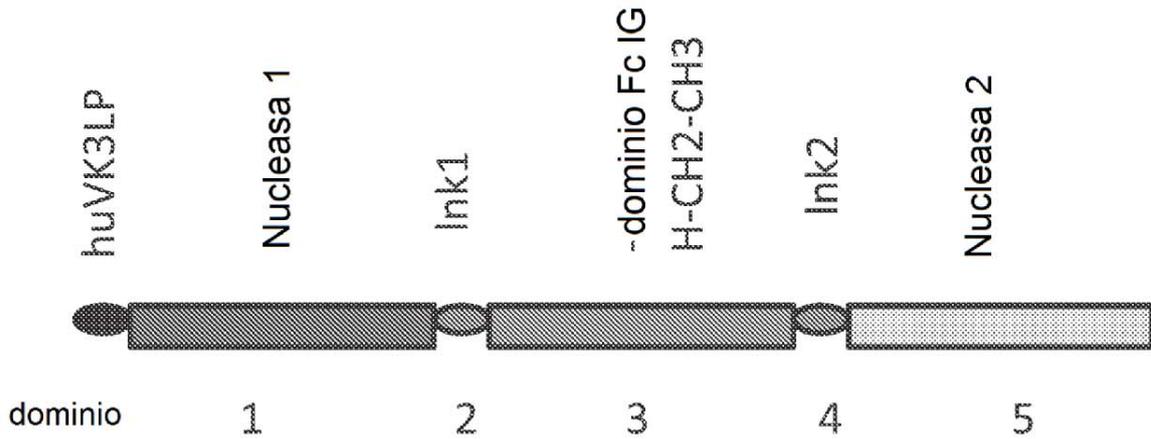
ES 2 666 303 T3

| TABLA 1 | | |
|------------|---------------------------------------|---|
| SEQ ID NO: | DESCRIPCIÓN | SECUENCIA (LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS SON 5'-3') |
| 105 | hTREX1 (72 aa C terminales truncados) | mgpgarrqgrivqgrpemcfcppptplpplriltlgthtptpcsspgsaagtyp tmgsqalppgpmqtliffdmeatglpfsqpkvtelc llavhrcalespptsqgp pptvpppprvvdkls lcvapgkacspaaseitglstavlaahgrqcfdnlanl llaflrrqpqpwc lvahngdrydfllqaelamlgltsaldgafcvdsitalka lerasspsehgp rksy slgsiytrlygqsppdshtaegdvlallsicqwrpqa lrwvdaharpfgtirpmygvtasartk |
| 106 | RSLV-124 hVK3LP-hRNasa (WT)-hlgG1 WT | metpaql l l f l l l l l w l p d t t g k e s r a k k i q r q h m d s d s s p s s s t y c n q m m r r r n m t q g r c k p v n t f v h e p l v d v q n v c f q e k v t c k n g g g n c y k s n s s m h i t d c r l t n g s r y p n c a y r t s p k e r h i i v a c e g s p y v p v h f d a s v e d s t d l e p k s s d k t h t c p p c p a p e l l g g p s v f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l p a p i e k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s r d e l t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r w q q g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k |
| 107 | NLGlnk | vdgaaaspvnvsspsvqdi |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de nucleasa híbrida que comprende una RNasa humana y un dominio Fc de IgG1 humano mutante, en la que la RNasa humana está acoplada operativamente al dominio Fc y en la que el dominio Fc incluye una mutación P238S y una mutación P331S y tiene citotoxicidad reducida en relación con una molécula de nucleasa híbrida que tiene un dominio Fc no modificado y en la que la molécula de nucleasa híbrida comprende:
- 10 una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96, 92, 62 o 78; o
una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 94.
- 15 2. La molécula de nucleasa híbrida de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 96.
3. La molécula de nucleasa híbrida de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98.
- 20 4. Un dímero que comprende una molécula de nucleasa híbrida de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente un homodímero.
5. Una composición que comprende la molécula de nucleasa híbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el dímero de la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de nucleasa híbrida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
7. Un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.
- 30 8. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Un método para preparar la molécula de nucleasa híbrida de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende:
- 35 proporcionar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de nucleasa híbrida; y
mantener la célula hospedadora en condiciones en las que se expresa la molécula de nucleasa híbrida.
- 40 10. La molécula de nucleasa híbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el dímero de la reivindicación 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en un método para tratar o prevenir una afección asociada con una respuesta inmunitaria anómala, opcionalmente en la que la afección es una enfermedad autoinmunitaria, preferentemente en la que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, una forma experimental de uveorretinitis, tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, uveítis facogénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hbs negativa, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis, dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico (LES) y enfermedad del tejido conectivo.
- 50 11. La molécula de nucleasa híbrida, el dímero o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad autoinmunitaria es LES.
- 55 12. Una composición que contiene nucleasa eficaz para degradar complejos inmunitarios que contienen ARN, ADN o tanto ARN como ADN, en la que la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una molécula de nucleasa híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 96, 98, 92, 94, 62 o 78, para su uso en un método para tratar el LES.

Esquema que muestra el enfoque general para modificar técnicamente proteínas de fusión de FC y nucleasa híbrida



| <u>Nucleasa 1 o 2</u> | <u>Ink 1 o 2</u> | <u>IgGFc</u> |
|-----------------------|------------------|------------------|
| hRNasa-WT | (gly4ser)3 | SCCH-hlgG1WT |
| hRNasa-G88D | (gly4ser)4 | SCCH-hlgG1WT |
| hDNasa 1 WT | (gly4ser)5 | hlgG1-P238S |
| hDNasa 1-A114F | NLG | hlgG1-N297S |
| hDNasa 1-G105R;A114F | ninguno | hlgG1-P331S |
| hDNasa1-G105R | (gly4ser)n | mlgG2a-WT |
| hTREX1-72AA | | mlgG2c-WT |
| hDNasa 1L3 | | mlgG2A-C WT o MT |
| hTREX1-Ink-hTREX1 | | |

Figura 1

RSLV-124 muestra respuesta PK bifásica en ratones

Semivida *in vivo* de RSLV-124 en ratones (una única inyección de 150 µg i.v.)

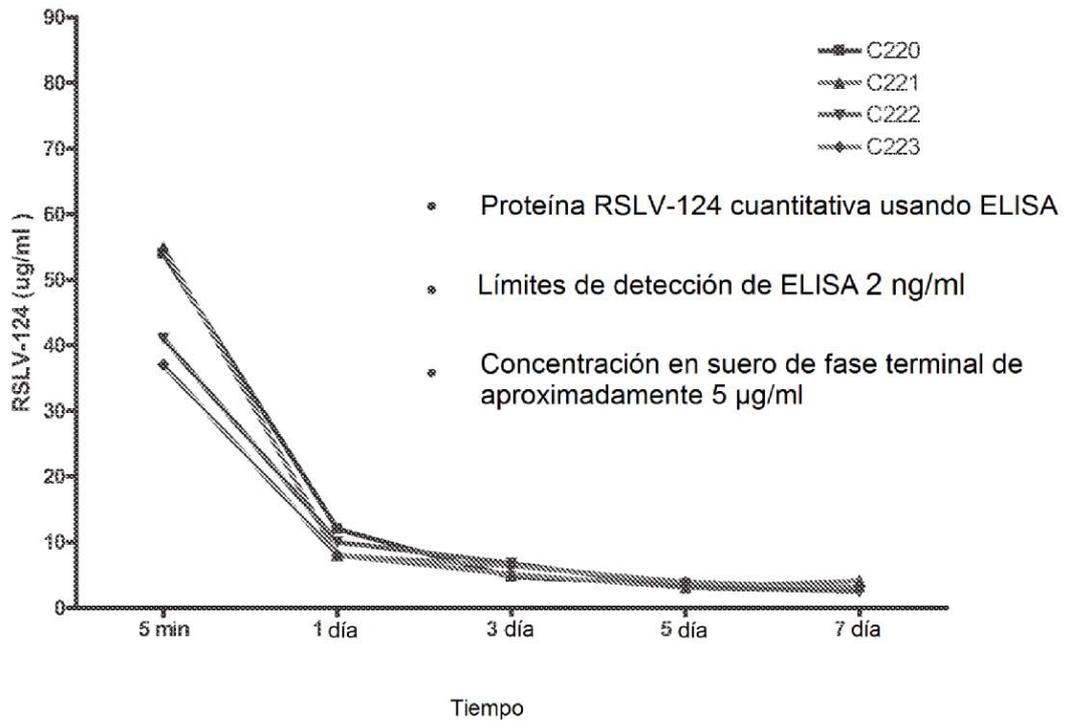


Figura 2

RSLV-124 conserva actividad enzimática completa *in vivo*

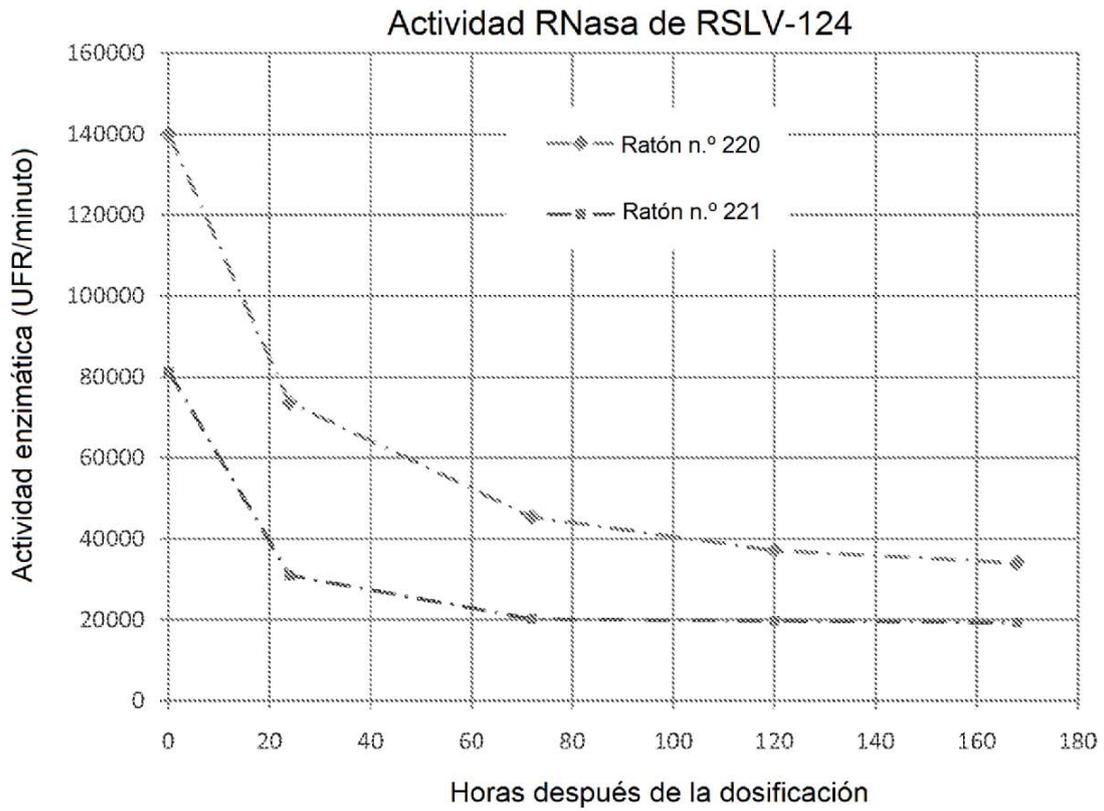
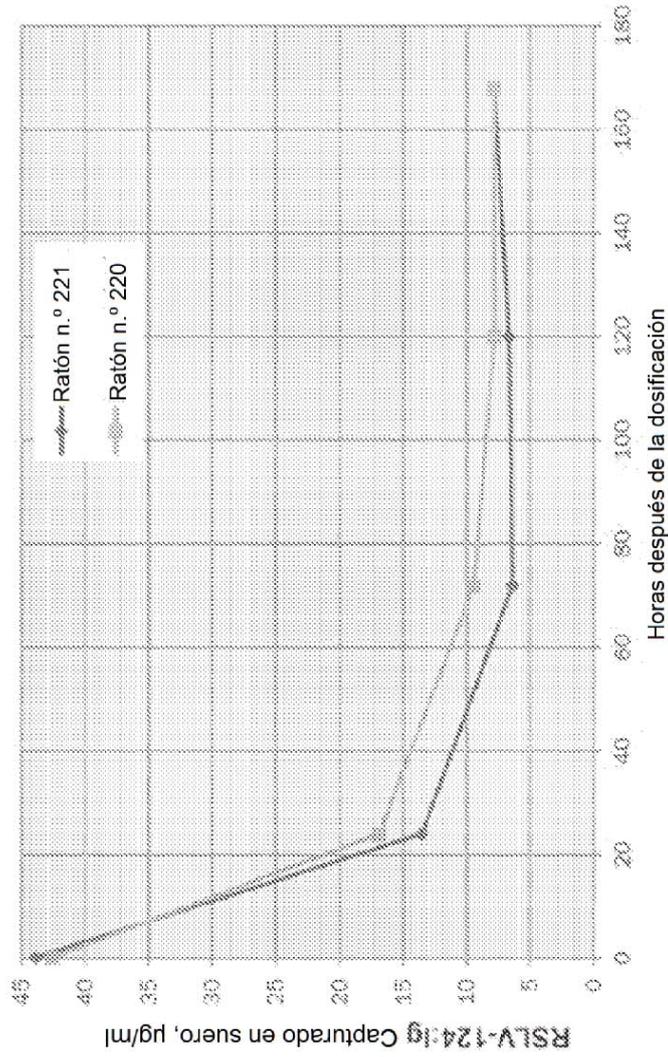


Figura 3

Concentración de proteína RSLV-124



Después de la administración a ratones, se capturó RSLV-124 en suero mediante Fc anti-humano unido a placa.

Se evaluó la actividad RNasa asociada.

Basándose en la comparación con RNasa, se estimó la cantidad de RSLV-124 (µg/ml).

Las concentraciones proteicas derivadas coincidieron bien con las determinadas por un ELISA directo. Como tal, RSLV-124 parece mantener actividad completa in vivo.

Figura 4

Análisis por DERI de actividad enzimática de RNasa en los ratones Tg para RNasa

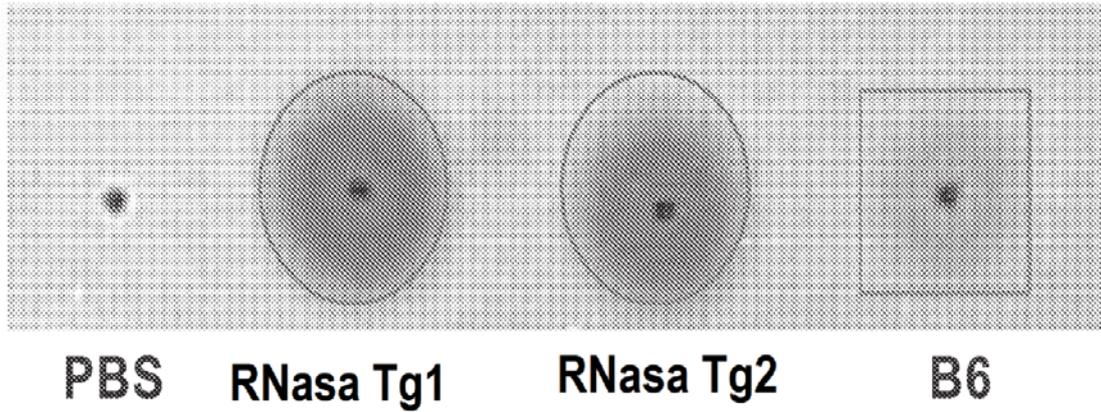


Figura 5

La expresión de RNasa reduce la mortalidad de los ratones TLR7

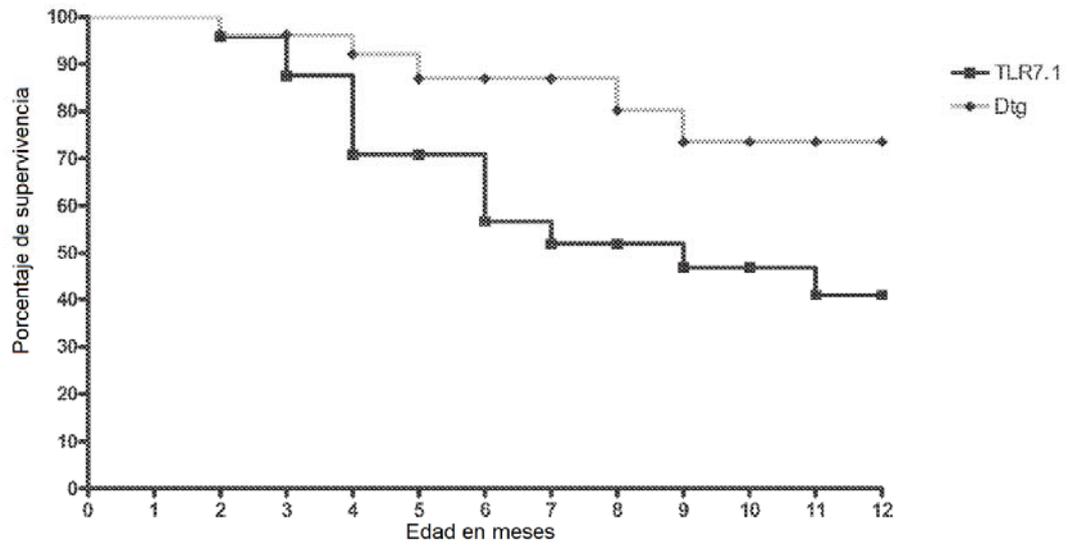
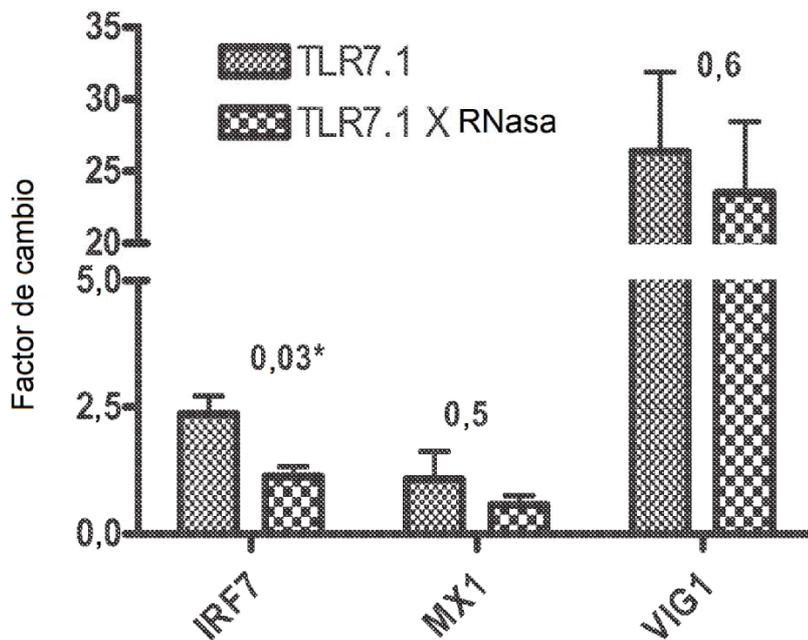


Figura 7

Reducción en los genes estimulados por interferón (ISG) en los ratones transgénicos dobles

IRG de TLR7.1 y TLR7.1 x RNasa en bazo.



Gen de referencia 18s. Todos en relación con ratones B6 de la misma edad.

N= 5 ratones/grupo. *p<0,05

Figura 8

Expresión transitoria de proteínas de fusión de Fc y Nucleasa en células COS

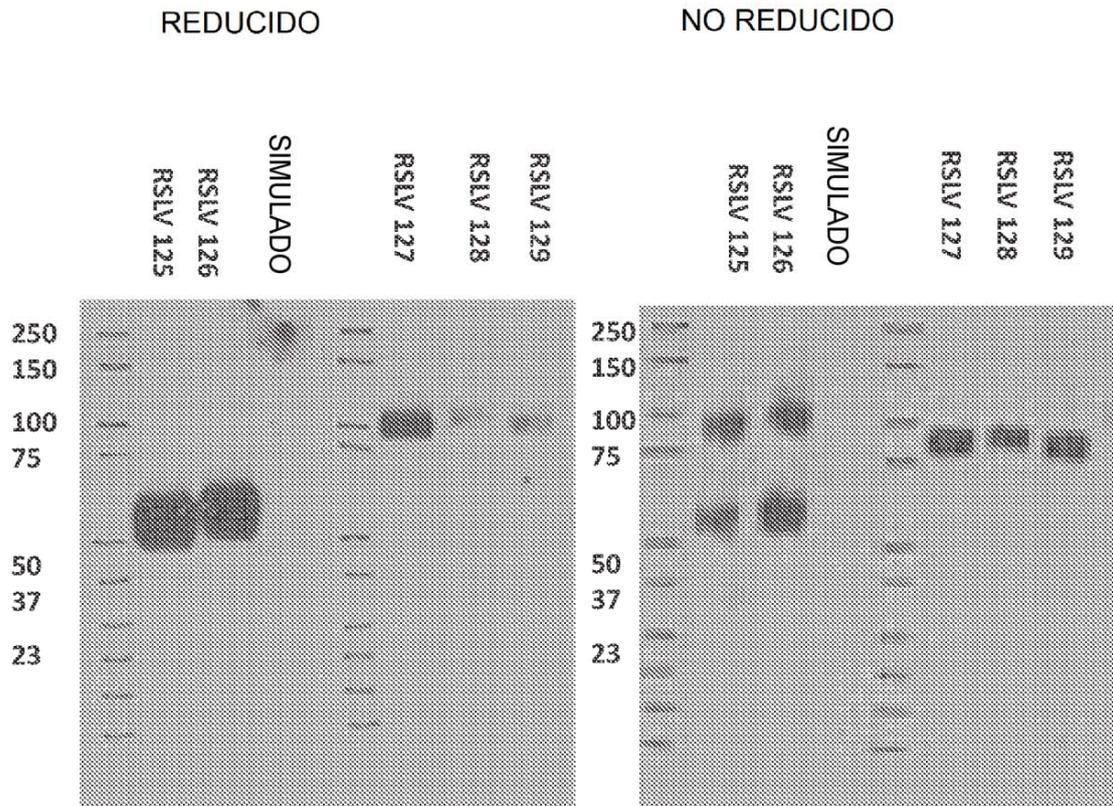


Figura 9

Actividad enzimática RNasa de proteínas de fusión de Fc y Nucleasa purificadas por proteína A usando ensayo de DERI

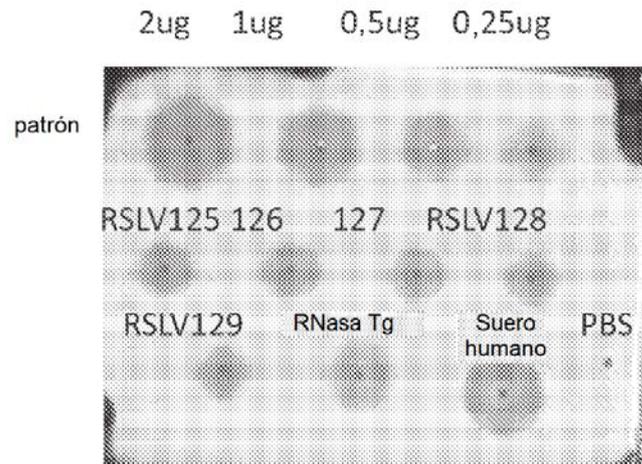


Figura 10

Ensayo de actividad enzimática DNasa en gel

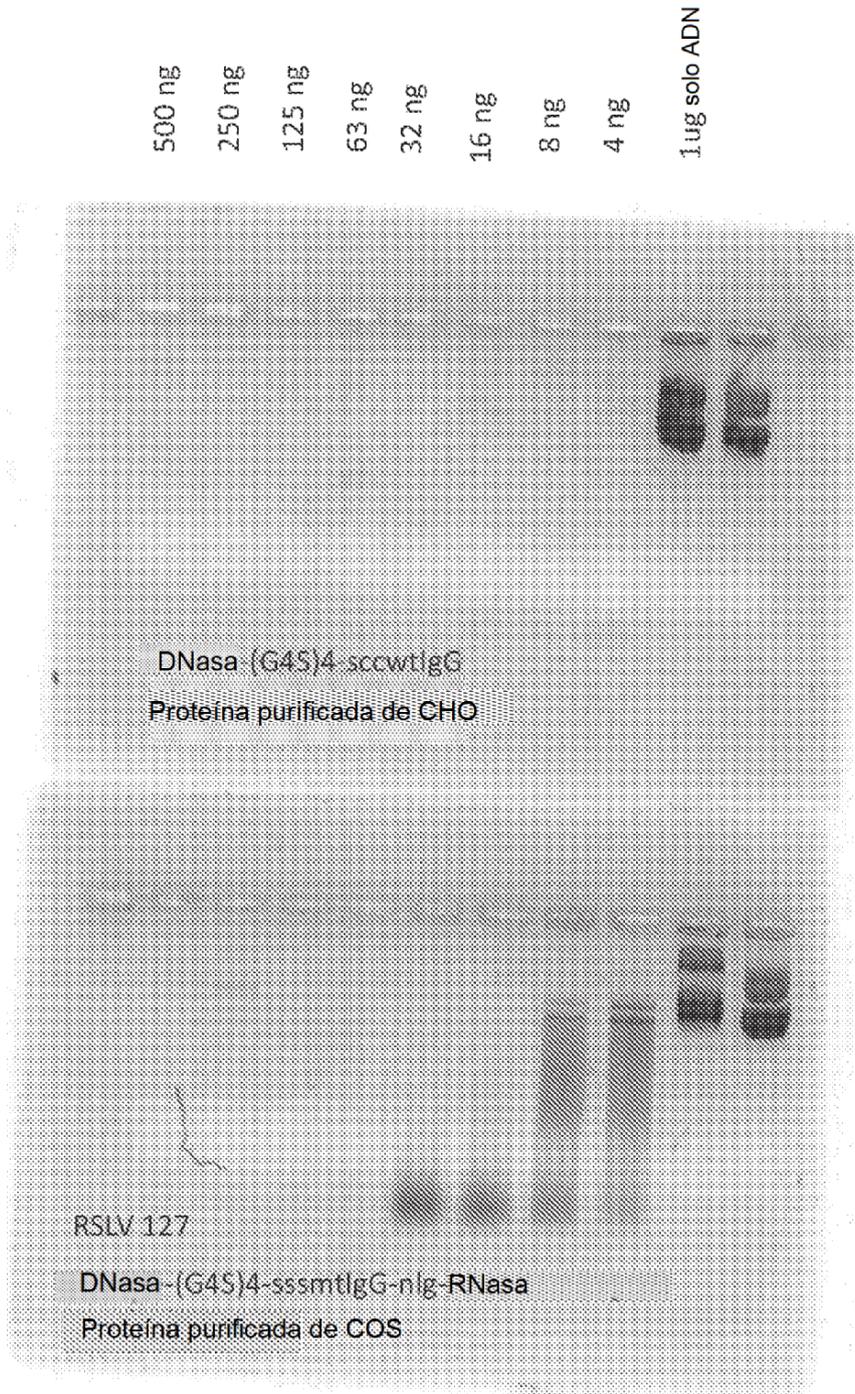


Figura 11a

Ensayo de actividad enzimática DNasa en gel

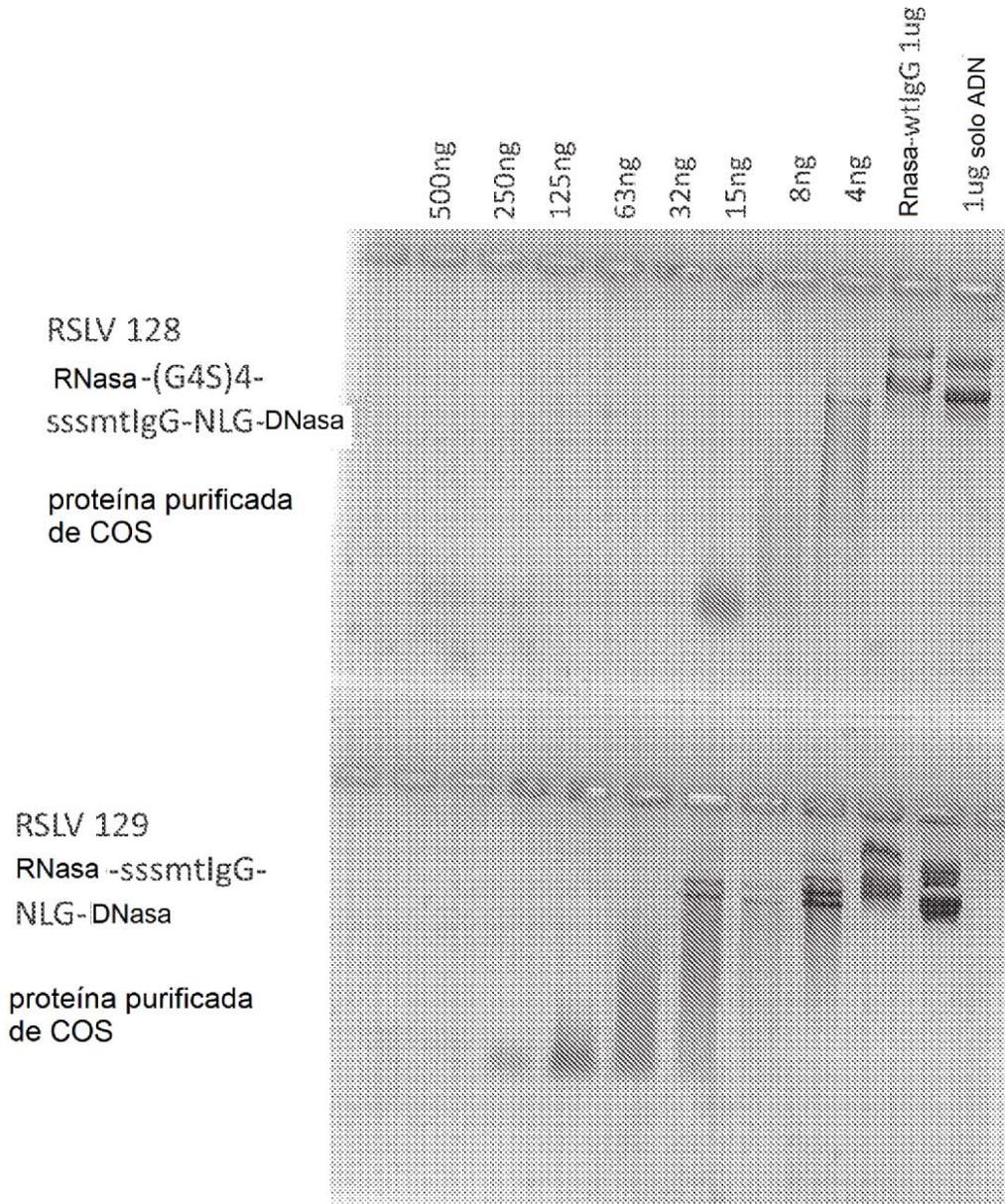


Figura 11b

Ensayo de actividad enzimática DNasa en gel

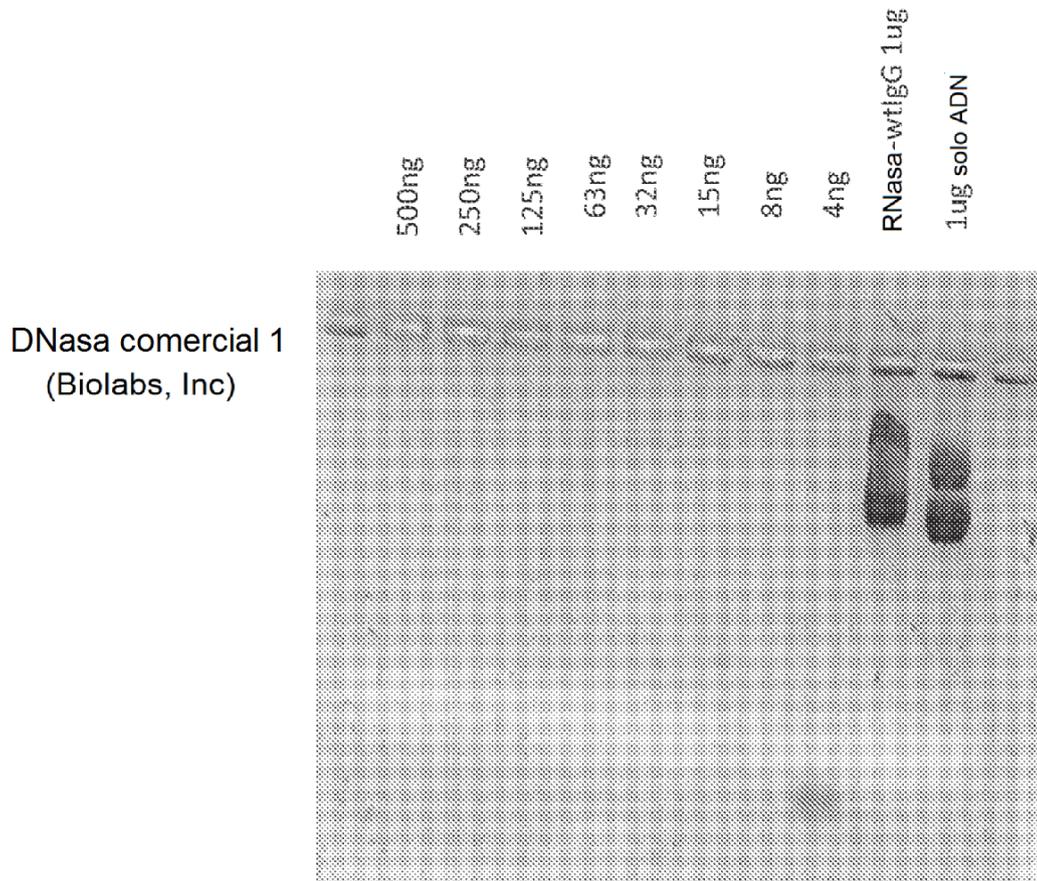


Figura 11c

Ensayo de actividad enzimática RNasa fluorescente
cuantitativa (sistema RNaseAlert QC)

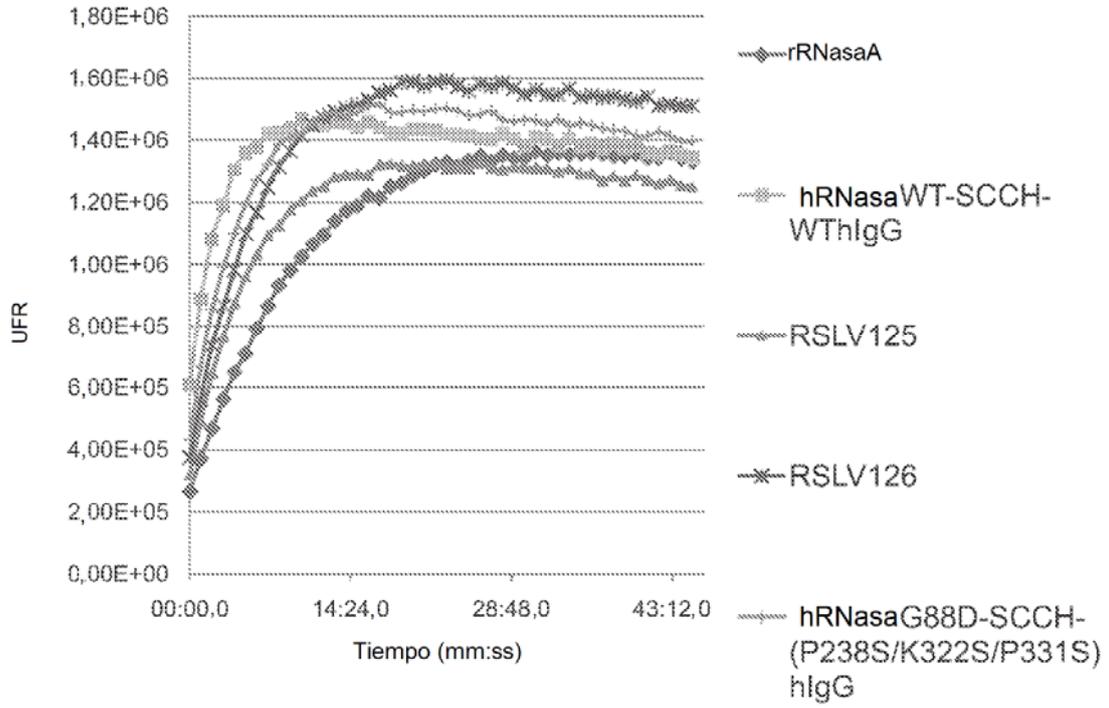


Figura 12

Análisis cinético enzimático de actividad RNasa de proteínas de fusión de RNasa y Fc

Resultados de ajuste L-B

| Nombre de la curva | Id del pocillo | Fórmula de curva | A | B | R2 | V _{máx} | K _m |
|--------------------|-----------------------|------------------|----------|----------|-------|------------------|----------------|
| L-B_SPL1 | rRNasaA | $Y=A*X+B$ | 1,17E-08 | 8,41E-09 | 0,988 | 1,2E+08 | 1,3912 |
| L-B_SPL2 | hRNasaWT-SCCH-WTIgG | $Y=A*X+B$ | 1,26E-08 | 7,34E-09 | 0,966 | 1,4E+08 | 1,71662 |
| L-B_SPL3 | RSLV125 | $Y=A*X+B$ | 3,22E-08 | 2,45E-09 | 0,994 | 4,1E+08 | 13,1429 |
| L-B_SPL4 | RSLV126 | $Y=A*X+B$ | 2,31E-08 | 5,08E-09 | 0,996 | 2E+08 | 4,54724 |
| L-B_SPL5 | hRNasaG88D-SCCH-TMIgG | $Y=A*X+B$ | 1,66E-08 | 7,66E-09 | 0,975 | 1,3E+08 | 2,1671 |

Figura 13

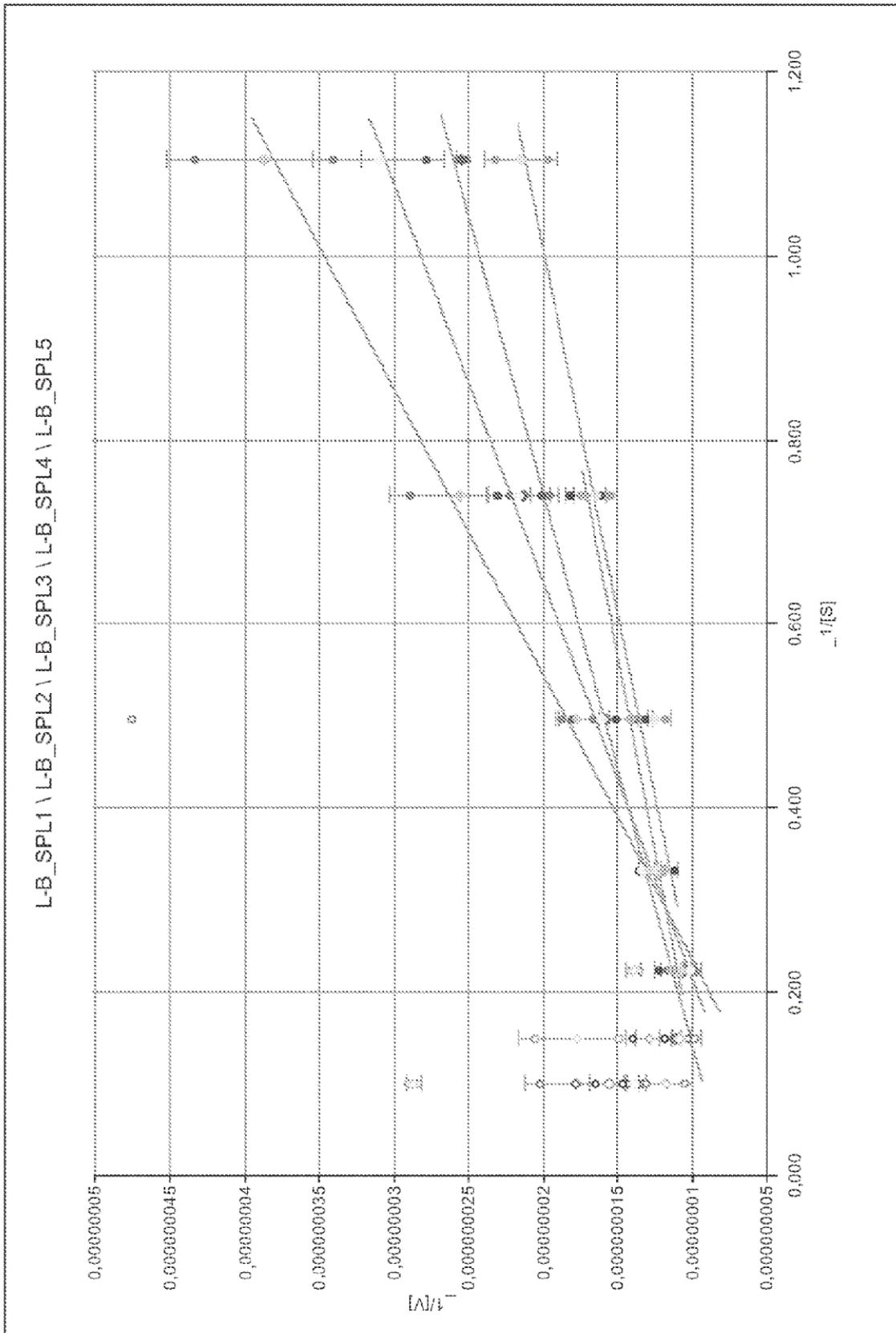


Fig. 13 (Continuación)

Análisis de citotoxicidad en células THP1 tratadas con proteínas de fusión de RNasa y Fc con dominios Fc de tipo silvestre y mutantes

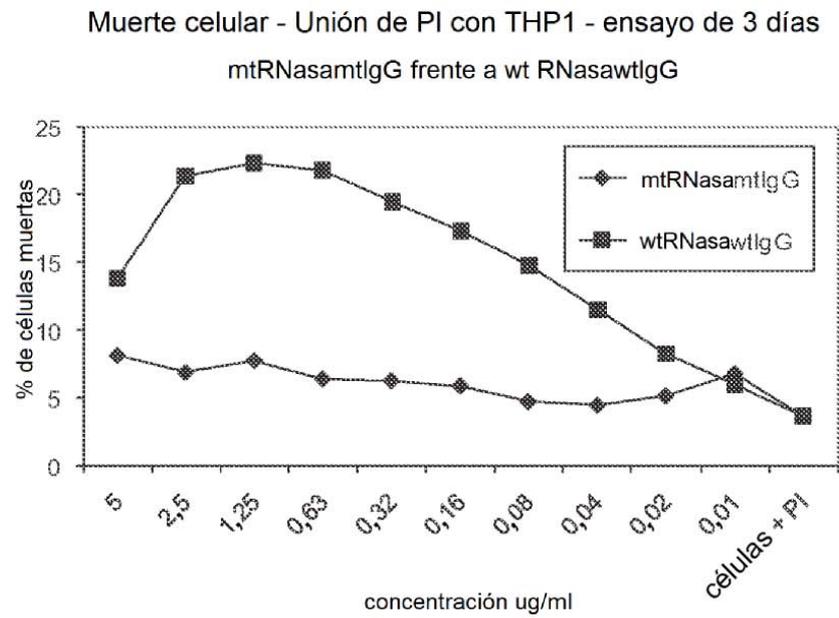
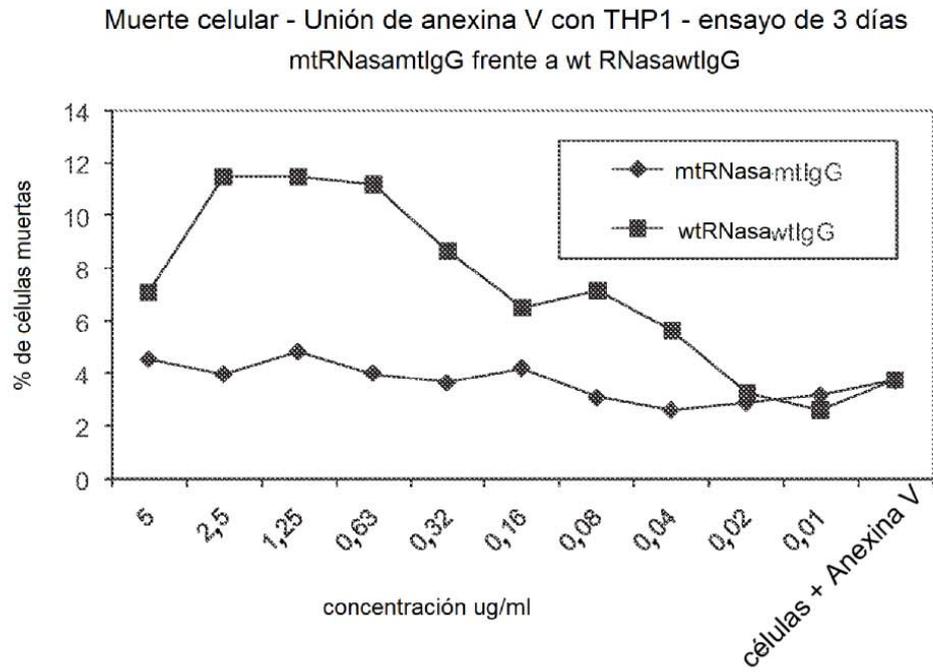
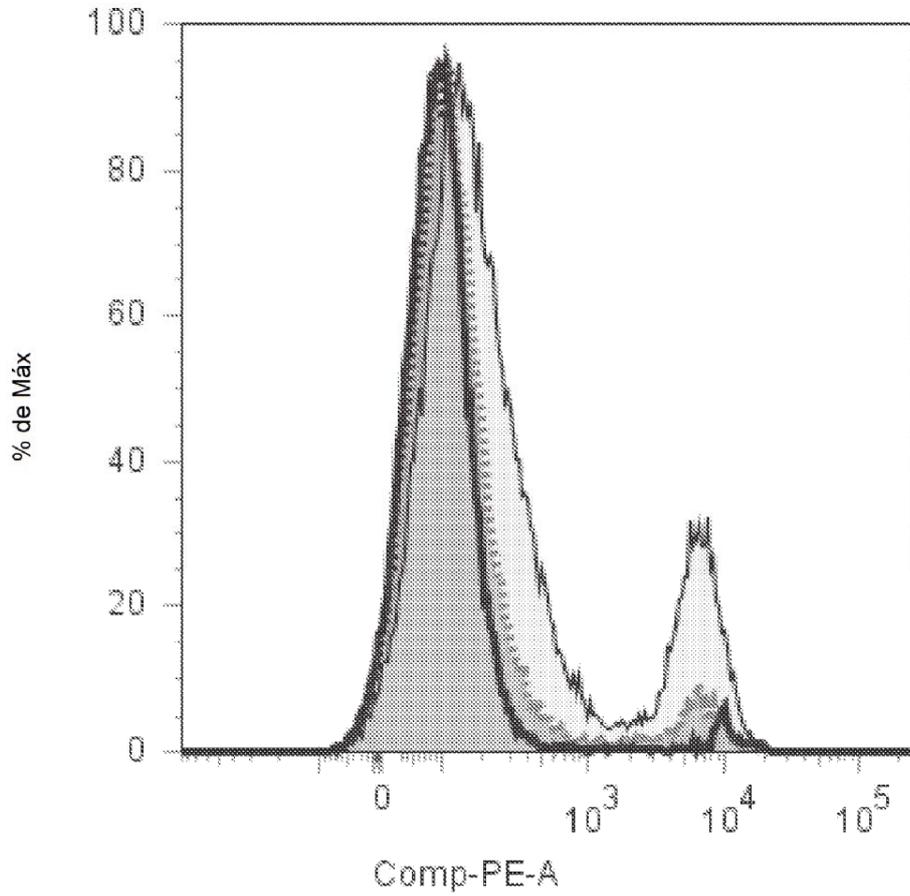


Figura 14

Perfil de FACS de células tratadas con proteínas de fusión de RNasa y Fc con dominios Fc Wt y mutantes



| Nombre de muestra | |
|-------------------|----------------------|
| | solo células +PI.fcs |
| | RNasa-wtIgG + PI.fcs |
| | RNasa-mtIgG + PI.fcs |

Figura 15

RSLV-132 inhibe potentemente la producción de IFN inducida por IC del enfermo de LES

Inhibición por RSLV de IC IFN- α

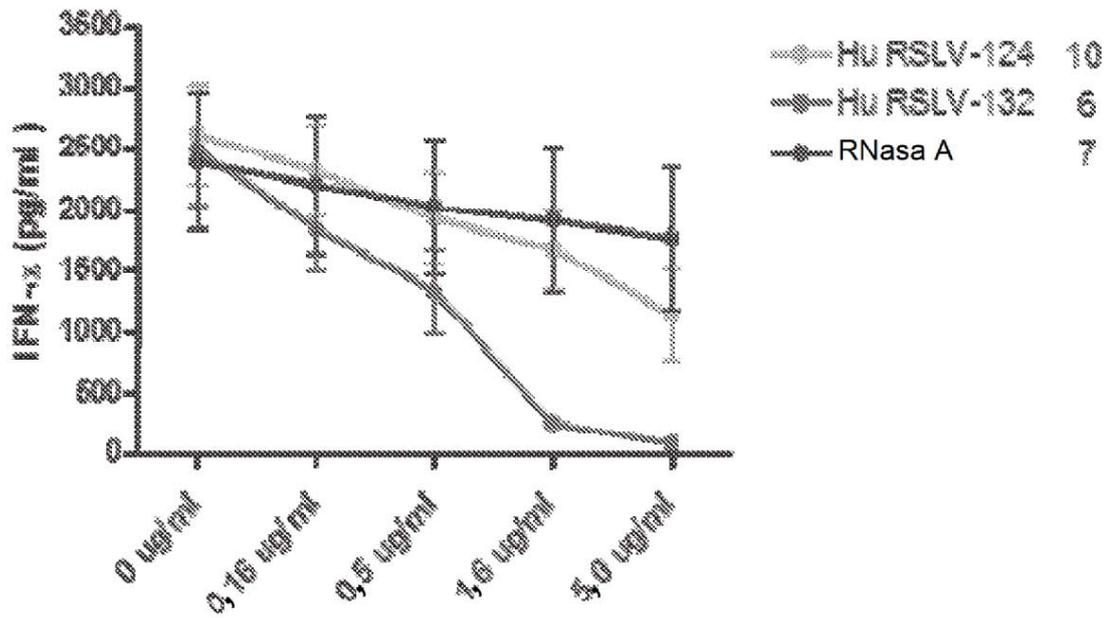


Figura 16

RSLV-132 inhibe eficazmente la producción de IFN inducida por ARN *in vivo*

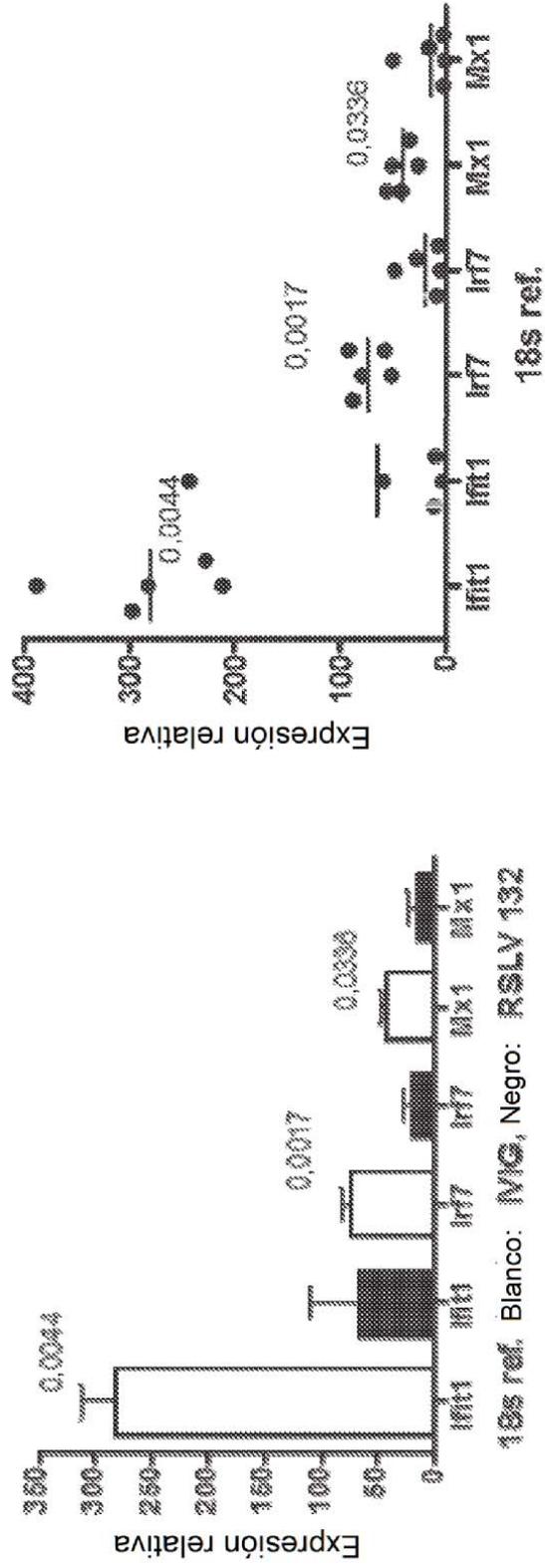


Figura 17

RSLV-132 es una RNasa altamente activa

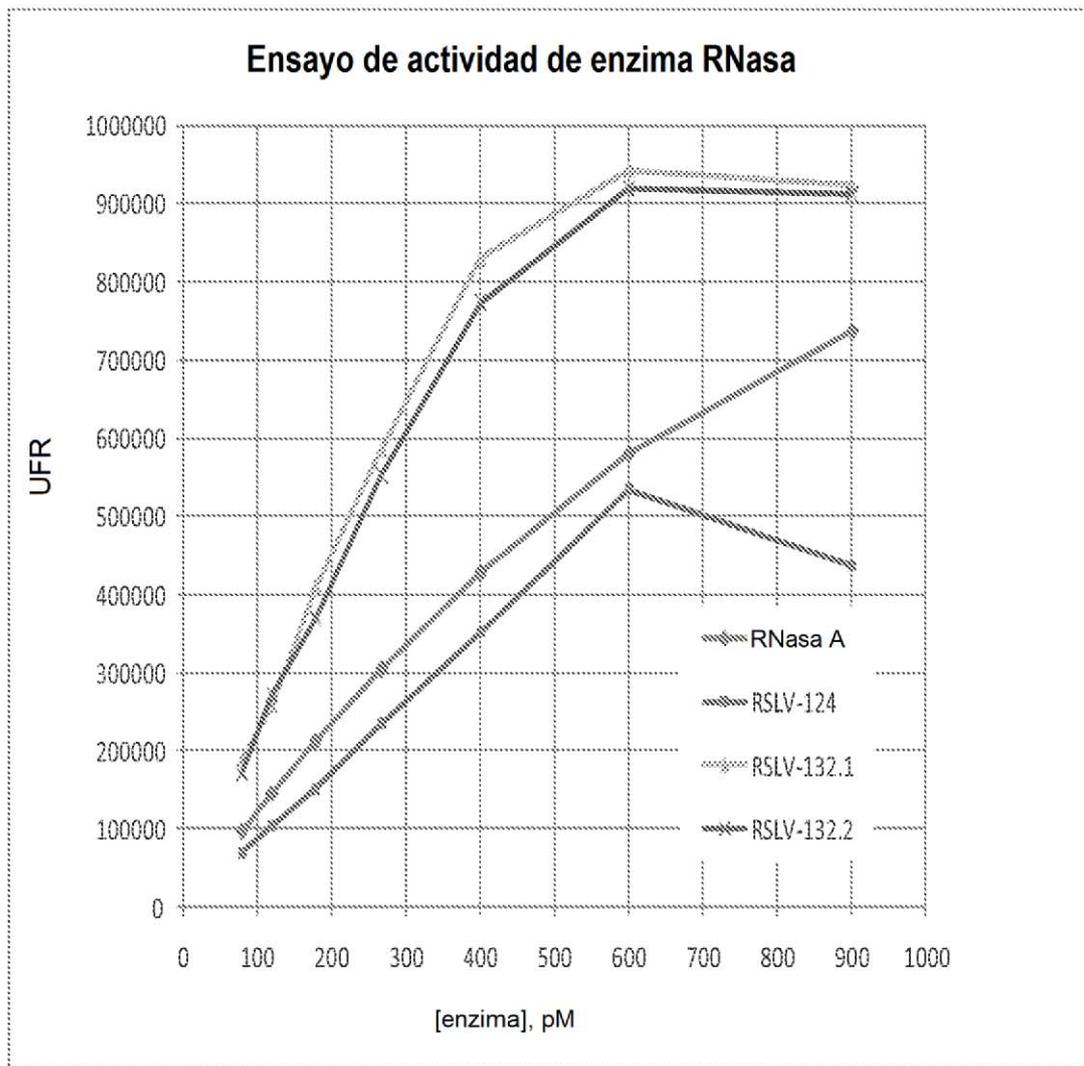


Figura 18

RSLV-133 demuestra un resto de RNasa altamente activo

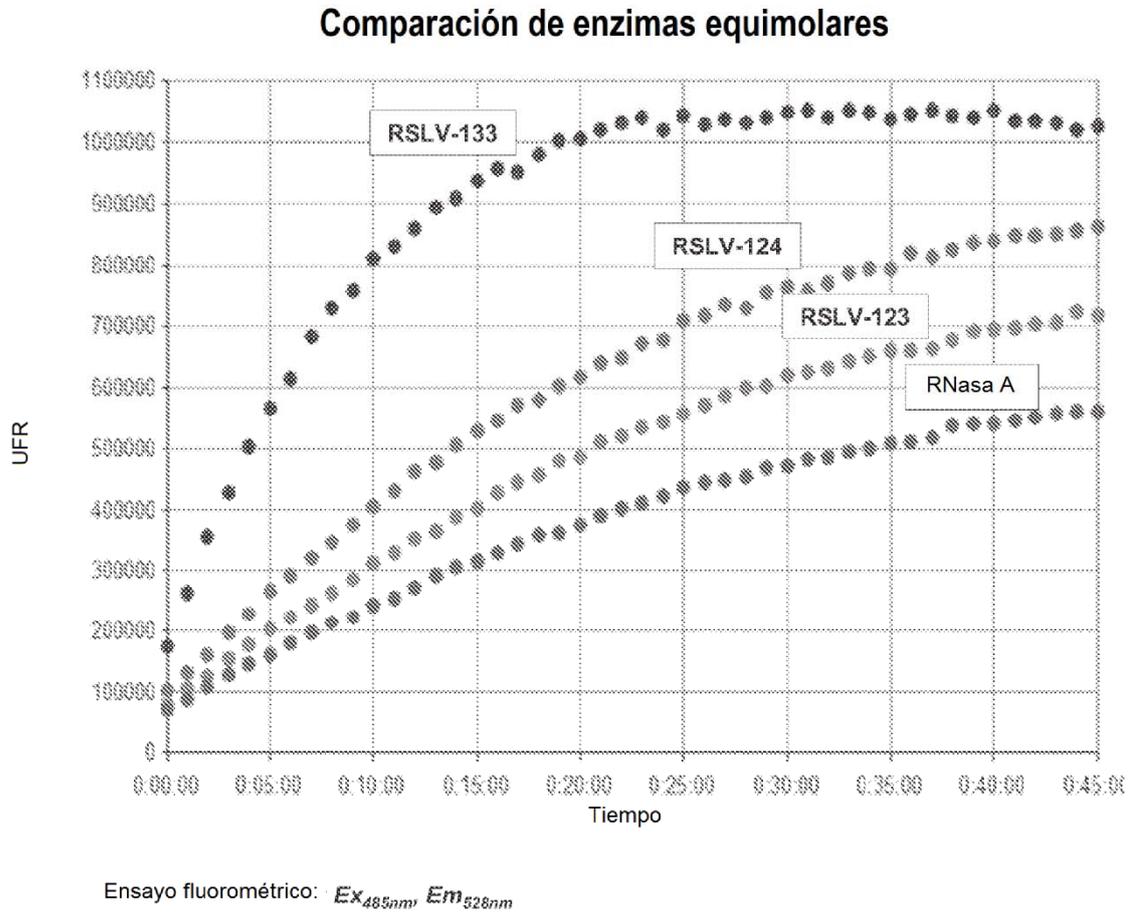


Figura 19

RSLV-133 demuestra un resto de DNasa altamente activo

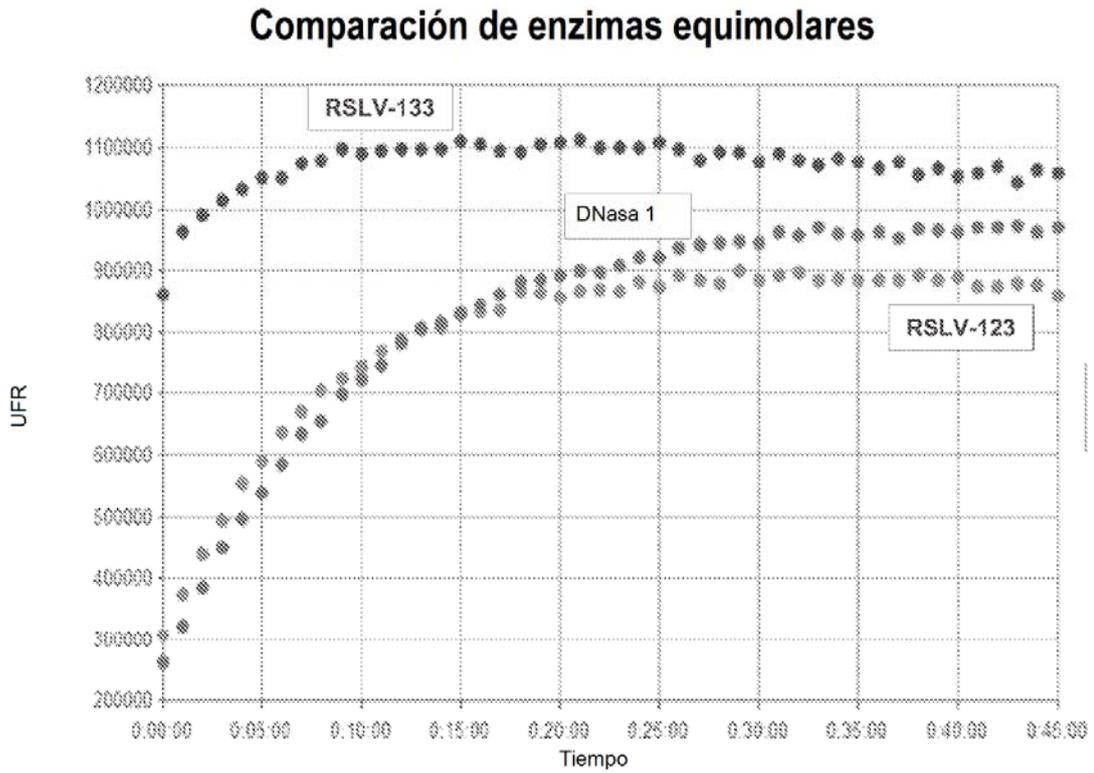


Figura 20

RSLV-133 contiene gran cantidad de un resto de DNasa altamente activo

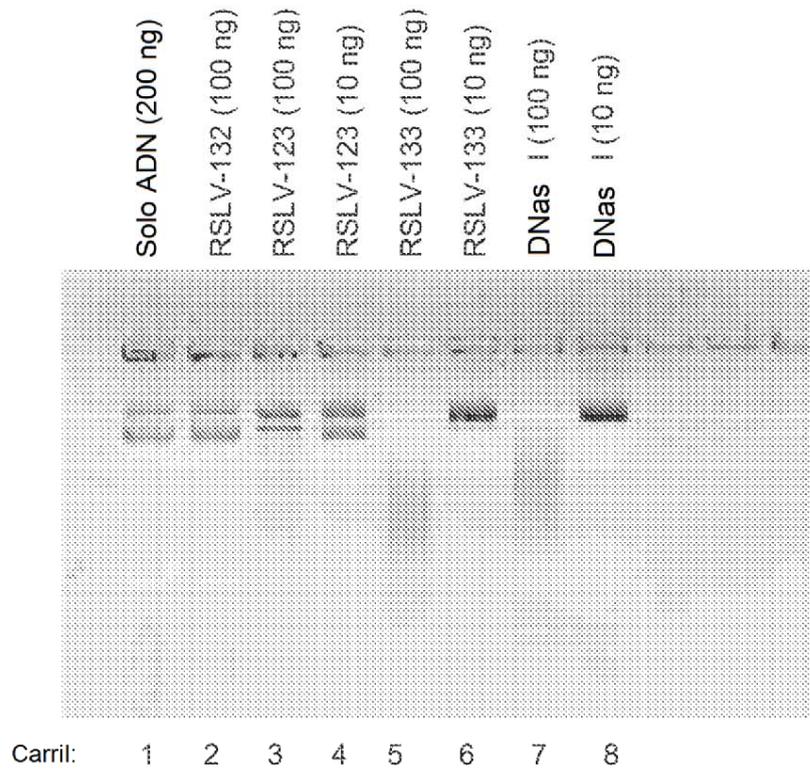


Figura 21

RSLV-132 demuestra unión a receptor de Fc reducida

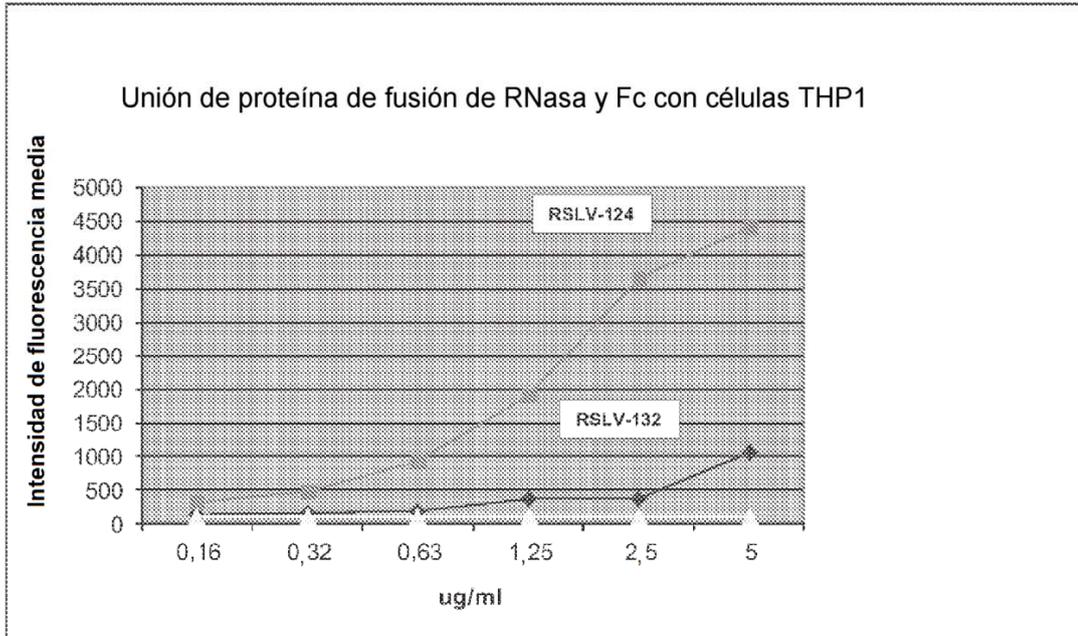


Figura 22