(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월13일
(11) 등록번호 10-2806169
(24) 등록일자 2025년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 38/46* (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *A61P 41/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2025.05)
A61K 38/465 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7007703
(22) 출원일자(국제) 2018년08월20일
심사청구일자 2021년08월19일
(85) 번역문제출일자 2020년03월16일
(65) 공개번호 10-2020-0047588
(43) 공개일자 2020년05월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/047084
(87) 국제공개번호 WO 2019/036719
국제공개일자 2019년02월21일
(30) 우선권주장
62/547,220 2017년08월18일 미국(US)
62/611,166 2017년12월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
THESIS, COLUMBIA UNIVERSITY, 2017, BENJAMIN SALLY, DOCTOR OF PHILOSOPHY IN THE GRADUATE SCHOOL OF ARTS AND SCIENCES,(2017.02.06)*
CELL, 2016, VOL.166 (1), P.88 - 101. [DOI:10.1016/J.CELL.2016.05.034]
NCBI Reference Sequence NP_004935.1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
뉴트롤리스 인코포레이티드
미국, 메사추세츠 02142, 캠브리지, 1 브로드웨이
(72) 발명자
폭스 토비아스 에이.
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 노스, 700 메인 스트리트, 뉴트롤리스 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
히메네즈-알카자르 미구엘
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 노스, 700 메인 스트리트, 뉴트롤리스 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 이형곤

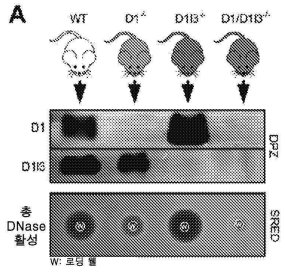
(54) 발명의 명칭 **조작된 DNASE 효소 및 치료에의 사용**

(57) 요 약

본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 축적 및/또는 방출을 특징으로 하는 병태의 치료에 유용한 엔지니어링된 DNase 단백질 (DNase1-유사 3 및 DNase1 포함)을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 NET가 관여되는 혈관 폐색의 예방 또는 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에서 입증되는 바와 같이, NET는 피브린 및 혈소판

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a



에 의존하지 않는 혈관 폐색에 대한 비정규적인 메커니즘에 참여한다.

(52) CPC특허분류
A61P 13/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
A61P 41/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
C12N 15/85 (2013.01)

(72) 발명자
괴벨 조세핀 (이전 비털링 조세핀)
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 노스, 700 메인 스트리트, 뉴트롤리스 테라퓨틱스 인코포레이티드 내

잉글러트 한나
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 노스, 700 메인 스트리트, 뉴트롤리스 테라퓨틱스 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 DNase 1-유사 3 (D1L3) 변이체로서, 상기 D1L3 변이체가 C-말단 테일 내에 적어도 NLS2의 결실을 포함하는 절단과 함께, 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 대상체가 자가면역 질환을 갖는, D1L3 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, D1L3 변이체가 단백질 또는 담체 모이어티에 융합 또는 컨쥬게이션되고, 여기서 담체 모이어티가 알부민인, D1L3 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 번호: 33에 의해 정의된 C-말단 테일의 전부의 결실을 포함하는, D1L3 변이체.

청구항 4

제1항에 있어서, DNase1 (D1)로부터의 적어도 하나의 빌딩 블록 치환을 갖는, D1L3 변이체.

청구항 5

제4항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 33에 의해 정의된 C-말단 테일의 전부의 결실을 포함하는, D1L3 변이체.

청구항 6

제1항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, D1L3 변이체.

청구항 7

제6항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, D1L3 변이체.

청구항 8

호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 D1L3 변이체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드로서, 상기 D1L3 변이체가 C-말단 테일 내에 적어도 NLS2의 결실을 포함하는 절단과 함께, 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 대상체가 자가면역 질환을 갖는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제8항에 있어서, D1L3 변이체가 단백질 또는 담체 모이어티에 융합 또는 컨쥬게이션되고, 여기서 담체 모이어티가 알부민인, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 10

제8항에 있어서, 서열 번호: 33에 의해 정의된 C-말단 테일의 전부 또는 일부의 결실을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제8항에 있어서, D1L3 변이체가 DNase1 (D1)로부터의 적어도 하나의 빌딩 블록 치환을 갖는, 단리된 폴리뉴클레

오티드.

청구항 12

제11항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 33에 의해 정의된 C-말단 테일의 전부의 결실을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제8항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

제13항에 있어서, D1L3 변이체가 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로서, 상기 대상체가 자가면역 질환을 갖는, 벡터.

청구항 16

제15항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 17

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 D1L3 변이체, 제8항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 제15항에 따른 벡터, 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제약 조성물로서, 상기 대상체가 자가면역 질환을 갖는, 제약 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 비경구 투여를 위해 제제화된 D1L3 변이체를 포함하는, 제약 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 자가면역 질환이 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 혈관염, 및 전신성 경화증으로부터 선택되는, 제약 조성물.

청구항 20

제17항에 있어서,

대상체가 D1L3의 결핍, 또는 D1 및 D1L3의 결핍을 특징으로 하는 질환을 앓고 있거나,

대상체가 *Dnase1* 및/또는 *Dnase1l3* 유전자에 돌연변이를 갖거나, 또는

대상체가 D1 및/또는 D1L3의 후천적 억제제를 갖는, 제약 조성물.

청구항 21

제17항에 있어서, 대상체가 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)를 갖는, 제약 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권**

[0002] 본 출원은 2017년 12월 28일 출원된 미국 출원 번호 62/611,166 및 2017년 8월 18일 출원된 62/547,220의 이익 및 그에 대한 우선권을 청구하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 염증은 침입하는 미생물을 통제하고 손상된 조직을 치유하기 위한 필수적 숙주 반응이다. 통제되지 않는 지속적 염증은 과다 염증성 장애에서 조직 손상을 유발한다. 호중구는 급성 염증에서 우세한 백혈구이다. 감염 동안 호중구는, 박테리아를 부동화시키고 중화시키는 효소 및 독성 히스톤으로 장식된 DNA-필라멘트의 격자, 호중구 세포외 트랩 (NET)을 생성한다. 숙주 방어에서 NET의 관련성은, 세포외 DNase가 여러 병원성 박테리아에서 독성 인자로서 작용한다는 사실에 의해 나타난다. 그러나, 부적절하게 방출된 NET는 그의 세포독성, 전염증성, 및 전혈전성 활성으로 인해 숙주 세포를 해칠 수 있다. 실로, NET는 빈번히 염증성 또는 허혈성 기관 손상과 관련되고, DNase의 치료적 주입은 다양한 동물 모델에서 숙주 손상을 제한한다.

[0004] 세포외 트랩 (ET) 형성은, 다른 백혈구, 즉 단핵구, 대식세포, 호염기구, 호산구, 및 비만 세포 또한 ET를 방출함에 따라, 호중구로 제한되지 않는다. 또한, 암 세포, 예컨대 급성 전골수성 백혈병 (APL) 세포, 및 손상된 내피 세포는, ET-유사 특징을 갖는 DNA-필라멘트를 노출시킬 수 있다.

[0005] 숙주가 염증의 에피소드 동안 생체내에서 어떻게 NET를 분해하여 조직 손상을 제한하는지는 잘 이해되지 않는다. 혈청 내의 DNase1 (D1)은 시험관내에서 NET의 DNA-백본을 소화시키는 것으로 나타났다. 다른 세포외 DNase가 규명되었고, 이는 순환에서 DNase1-유사 3 (D1L3)을 포함하며, 이는 세포외 마이크로입자-관련 크로마틴을 소화시킬 수 있다.

[0006] D1 및 D1L3은 DNase1-유사 1 (D1L1) 및 DNase1-유사 2 (D1L2)와 함께, 인간에서 발현되는 상동 분비 DNase 효소의 그룹인 DNase1-단백질 패밀리를 형성하고, 이는 NET-관련 질환에 대한 약물 후보물질을 제공한다. 그러나, 이들 효소의 물리적, 효소적, 및 약동학적 특성은 치료용으로 이상적이지 않다.

[0007] 본 발명은, 급성 염증성 에피소드 동안 NET의 방출로부터 유래될 수 있는 혈관 폐색의 예방 또는 치료를 위한 것을 포함한, 치료를 위한, 엔지니어링된 DNase, 예컨대 DNase1-유사 3 및 DNase1을 제공한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 축적 및/또는 방출을 특징으로 하는 병태의 치료에 유용한 엔지니어링된 DNase 단백질 (DNase1-유사 3 및 DNase1 포함)을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 NET가 관여되는 혈관 폐색의 예방 또는 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에서 입증되는 바와 같이, NET는 피브린 및 혈소판에 의존하지 않는 혈관 폐색에 대한 비정규적인 메커니즘에 참여한다.

[0009] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 대상체에서의 NET 축적을 감소시키거나 예방하기 위해, 치료용으로 보다 적합한 물리적, 약역학적, 및/또는 효소적 특성을 갖도록 엔지니어링된 DNase1-유사 3 (D1L3) 변이형을 제공한다. 일부 구현예에서, D1L3 효소는, 치료에서 사용하기에 적합한 재조합 효소의 생성을 제공하는 제조에 있어서의 이점을 갖는다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 글리코실화, 핵 국소화 신호의 불활성화, 및/또는 C-말단 테일의 전부 또는 일부의 결실을 제공하는 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하는 재조합 D1L3 변이형을 제공한다.

[0010] 다양한 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은, 야생형 D1L3 단백질에 비해, 증가된 단백질 안정성, 프로테아제에 의한 억제에 대한 증가된 저항성, 증가된 생체이용률, 및 실질적으로 동일한 또는 보다 우수한 DNA 및/또는 크로마틴 및/또는 NET-분해 활성 (시험관내 또는 생체내)을 갖는다. 다양한 구현예에서, D1L3 변이형은 야생형 D1L3 (예: 서열 번호: 2)에 비해 하기 특성 중 하나 이상을 포함한다: 동일한 또는 실질적으로 동일한 (또는 보다 높은) 무단백질 DNA (네이크드 DNA) 분해 활성, 동일한 또는 실질적으로 동일한 (또는 보다 높은) 염색체 DNA (크로마틴) 분해 활성, 프로테아제 저항성, 증가된 순환 반감기, 및 시험관내 발현 시스템 (예: 차이니즈 햄스터 난소 세포 및/또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*))에서의 보다 높은 생성 수준.

[0011] 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 빌딩 블록 치환으로서 본원에 기재된, 인간 DNase1 (서열 번호: 1)로부터의 하나 또는 복수의 블록 치환을 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 대상체에서의 NET 축적을 감소시키거나 예방하기 위해, 치료용으로 보다 적합한 물리적, 약역학적, 및/또는 효소적 특성을 갖도록 엔지니어링된 DNase1 (D1) 변이형을 제공한다. 일부 구현예에서, D1 효소는, 치료에서 사용하기에 적합한 재조합 효소의 생성을 제공하는 제조에 있어서의 이점을 갖는다. 다양한 구현예에서, 엔지니어링된 D1 변이형은, 돌연변이된 DNA 결합 자리, 돌연변이된 크로마틴 결합 자리, 돌연변이된 액틴 결합 자리, 돌연변이된 글리코실화 자리, 핵 국소화 신호의 부가 (예: D1L3의 NLS1 또는 NLS2와 유사성 또는 동일성을 가짐), 및/또는 D1L3의 C-말단 테일과 유사한 또는 동일한 C-말단 도메인 중 하나 이상을 제공하는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 (삽입 포함), 또는 결실을 가지며, 서열 번호: 1의 아미노산 서열의 성숙 효소와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 야생형 효소에 비해 하기 특징 중 하나 이상을 포함하도록 엔지니어링된다: 동일한 또는 보다 높은 무단백질 DNA (네이크드 DNA) 분해 활성, 보다 높은 염색체 DNA (크로마틴) 분해 활성, 유사한 또는 향상된 프로테아제 저항성, 액틴 저항성, 혈액으로부터 소변 및/또는 담즙으로의 유사한 또는 향상된 침투, 및 시험관내 발현 시스템 (예: 차이니즈 햄스터 난소 세포 및/또는 피키아 파스토리스)에서의 보다 높은 생성 수준.

[0014] 본원에 기재된 D1 변이형은 양이온 잔기의 부가를 포함한 점 돌연변이의 조합을 가질 수 있고/거나, D1L3 (서열 번호: 2)으로부터의 하나 이상의 블록 치환을 포함할 수 있다. 이러한 블록 치환은 본원에 기재되며, "빌딩 블록 치환"이라 불린다.

[0015] 일부 양태에서, 본 발명은 D1L3 및/또는 D1 변이형, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 다양한 구현예에서, 조성물은 비경구 또는 폐 투여를 위해 제제화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 관절내, 근육내, 국소 또는 피하 투여를 위해 제제화된다. 일부 구현예에서, 조성물은, 각각 본원에 기재된 임의로 엔지니어링된 변이형인 D1L3 및 D1 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 D1 및 D1L3 둘 다로부터의 블록 서열을 함유하는 키메라 단백질을 포함한다. D1과 D1L3 사이의 예시적 블록 치환이 도 31에 나타나 있다.

[0016] 또한 다른 양태에서, 본 발명은, 키메라 서열 생성에 의한 DNase 효소 엔지니어링 방법을 제공한다. 예를 들어, 이들 양태에서 방법은, 공여자 및 수용자 DNase 효소의 단백질-단백질 정렬을 제공하고; 전달을 위한 가변 아미노산 서열 ("빌딩 블록")을 규명하는 것을 포함한다. 가변 아미노산 또는 아미노산들은 공여자 및 수용자 DNase 효소에서 하나 이상의 보존 아미노산에 의해 플랭킹된다 (빌딩 블록의 상류 및 하류에서). 이들 빌딩 블록은 수용자와 공여자 단백질 사이에서 교환될 수 있다. 이에 따라 키메라 효소가 재조합 생성된다.

[0017] 또한 다른 양태에서, 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 축적의 감소 또는 예방을 위한 제약 조성물의 제조

방법을 제공한다. 이들 구현예에서, 본 발명은, D1 및 D1L3 활성이 결핍된 유전자 변형된 마우스, 및 G-CSF 폴리뉴클레오티드의 이종 발현 (예: 간세포 세포 내) 또는 지속된 내인성 G-CSF 발현의 유도 (예: 미생물 화합물의 반복적 투여를 통함)를 사용한다. 이 마우스 모델은 NET를 축적하고, NET-관련 혈관 폐색을 빠르게 발달시킨다. 이들 구현예에서, 본 발명은, 후보물질 NET 억제제 또는 후보물질 DNase 효소 (본 개시내용에 따른 D1L3 또는 D1 변이형 포함)를 유전자-변형 마우스에게 투여하고, NET의 축적을 감소시키는 NET 억제제 또는 DNase 효소를 선택하는 것을 포함한다. 선택된 억제제 또는 효소는 인간 환자로의 투여를 위해 제제화된다.

[0018] 일부 양태에서, 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 방법은, 치료 유효량의 본 개시내용에 따른 D1L3 및/또는 D1, 및/또는 그의 변이형을 투여하는 것을 포함한다. D1L3 또는 D1 변이형은 재조합 단백질, 또는 일부 구현예에서는 코딩 DNA 또는 RNA, 또는 일부 구현예에서는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0019] 다양한 구현예에서, 본 발명은 NET의 존재 또는 축적을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료에 관한 것이다. 이러한 질환 또는 병태는, 만성 호중구증가증 (예: 호중구 수의 증가), 호중구 응집 및 백혈구울혈과 관련된 질환, 혈전증 및 혈관 폐색 (예: 겸상 적혈구 질환), 허혈-재관류 손상 (예: 중장 염전, 고환 비틀림, 사지 허혈 재관류, 중요 기관 허혈-재관류, 기관 이식), 외과적 및 외상성 조직 손상, 급성 또는 만성 염증성 반응 또는 질환, 자가면역 질환 (예: 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 혈관염, 전신성 경화증), 심혈관 질환 (예: 심근 경색, 뇌졸중, 죽상경화증, 혈전용해 치료를 포함한 정맥 혈전색전증), 대사 질환 (예: 당뇨병), 전신성 염증 (예: 전신성 염증 반응 증후군 (SIRS), 패혈증, 패혈성 쇼크, 파종성 혈관내 응고 (DIC), 및 혈전성 미소혈관증 (TMA)), 호흡기의 염증성 질환 (예: 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 폐 손상 (ALI), 연기 유발 폐 손상, 수혈 유발 폐 손상 (TRALI), 급성 호흡 장애 증후군 (ARDS), 및 천식, 무기폐, 기관지염, 농흉), 신장 염증성 질환 (급성 신장 손상 (AKI) 및 만성 신장 질환 (CKD)을 포함한 급성 및 만성 신장 질환, 이식 조직 관련 염증성 질환 (예: 이식-대-숙주 질환) 및 암 (예: 백혈병, 종양 전이, 및 충실성 종양)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0020] 일부 구현예에서, 대상체는 도관 시스템에서 도관 폐색을 갖거나 그의 위험이 있다. 도관 시스템 또는 도관 시스템을 함유하는 기관 또는 조직의 비제한적 예는 담관, 누관, 유관, 담낭관, 간관, 사정관, 이하선관, 악하선관, 주요 설하선관, 바르톨린관, 대뇌수도관, 췌장, 유선, 수정관, 수뇨관, 방광, 담낭, 및 간을 포함한다. 이와 같이, 본 발명은 췌장염, 담관염, 결막염, 유방염, 안구 건조 질환, 수정관의 폐색, 또는 신장 질환을 갖는 대상체의 치료에 유용하다.

[0021] 다른 구현예에서, 대상체는 내피 표면 상의 (예: 수술 유착), 피부 상의 (예: 상처/흉터, 궤양), 또는 활막 관절 내의 (예: 통풍, 관절염) NET 축적을 갖거나 그의 위험이 있다. 예를 들어, NET는, 예를 들어, 침습성 의료 절차 후, 수술 유착에 기여할 수 있다. 본 발명은 수술 유착의 형성을 예방하거나 억제하기 위해 수술 동안 투여될 수 있다. 일부 경우에, 본원에서 요약된 바와 같은 D1, D1L3 (그의 변이형 포함), 또는 D1 및 D1L3 (또는 그의 변이형)의 조합은 상처 및/또는 흉터를 예방하거나 치료하기 위해 피부에 국소 투여될 수 있다. 다른 경우에, 본원에서 요약된 바와 같은 D1, D1L3, 또는 그의 변이형, 또는 이들의 조합은 통풍 및 관절염을 예방하거나 치료하기 위해 활막 관절에 투여될 수 있다.

[0022] 일부 구현예에서, 대상체는 NET를 포함하는 혈관 폐색을 갖거나 그의 위험이 있다.

[0023] 다양한 구현예에서, 본 발명은 D1 및 스트렙토도르나제를 포함한 DNase 효소로 치료가능한 질환의 치료에 관한 것이다. 이러한 질환 또는 병태는 혈전증, 뇌졸중, 패혈증, 폐 손상, 죽상경화증, 바이러스 감염, 겸상 적혈구 질환, 심근 경색, 귀 감염, 상처 치유, 간 손상, 심내막염, 간 감염, 췌장염, 일차 이식 장애, 사지 허혈 재관류, 신장 손상, 혈액 클롯팅(clotting), 알룸-유도 염증, 간신장 손상, 흉막 삼출, 혈흉증, 담관내 혈액 클롯, 후 공압 빈혈(post pneumatic anemia), 궤양, 이비인후과 병태, 경구 감염, 경미한 부상, 부비강염, 수술후 비성형, 불임, 방광 카테터, 상처 세정, 피부 반응 시험, 폐렴구균 수막염, 통풍, 족부 궤양, 낭포성 섬유증, 카르테게너 증후군(Kartegener's syndrome), 천식, 엽성 무기폐, 만성 기관지염, 기관지확장증, 루푸스, 일차 섬모 이상운동증, 세기관지염, 농흉, 흉막 감염, 암, 안구 건조 질환, 하부 호흡기 감염, 만성 혈종, 알츠하이머병, 및 폐쇄성 폐 질환을 포함한다.

[0024] 또한 다른 구현예에서, 본 발명은, 피키아 파스토리스와 같은, 비포유류 발현 시스템을 사용한, D1 또는 D1L3, 또는 그의 변이형의 재조합 생성 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 피키아 파스토리스는 숙주 세포로부터의 분비를 가능하게 하는 네이티브(native) 신호 펩티드로 DNase 효소를 코딩한다.

[0025] 본 발명의 다른 목적, 구현예 및 이점은 하기 상세한 설명에서 명백하다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1a - 도 1f는 순환에서 DNase1 및 DNase1l3이 시험관내에서 NET를 분해함을 보여주며, WT, DNase1-/- (D1-/-), DNase1l3-/- (D1L3-/-), DNase1/DNase1l3-/- (D1/D1L3-/-) 마우스로부터의 혈청의 DNA-분해 활성을 특성화한다. 도 1A는 지모그래픽 검정 DPZ 및 SRED에 의한 DNase1 (D1), DNase1l3 (D1L3), 및 총 DNase 활성의 검출을 제공한다. 도 1b는 이미지를 제공하고, 도 1c는 지시된 유전자형으로부터의 혈청과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 NET의 DNA-염색의 정량화를 제공한다 (N=6). 스케일 바: 50 μm. 도 1c는 DNase1 (D1), DNase1l3 (D1L3), 또는 대조군 플라스미드 (Ctrl)로 플라스미드를 안정적으로 발현하는 D1/D1L3-/- 마우스로부터의 혈청의 DPZ 및 SRED 분석을 나타낸다. 도 1e는 이미지를 나타내고, 도 1f는 D1, D1L3, 또는 Ctrl을 발현하는 D1/D1L3-/- 마우스로부터의 혈청 또는 완충제와 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 NET의 DNA-염색의 정량화를 나타낸다 (N=5). 스케일 바: 50 μm. 이미지는 2개 이상의 독립적 실험을 대표하는 것이다. 통계: (도 1c 및 도 1f) 일원 ANOVA 후 본페로니(Bonferroni)의 시험 후 다중 비교; § P < 0.001 vs. 모든 다른 그룹.

도 2A-도 2I는, DNase1 또는 DNase1l3이 만성 호중구증가증을 용인하기 위해 필요함을 보여준다. 만성 호중구증가증을 G-CSF-발현 플라스미드 (CSF3)의 주사에 의해 유도하였다. 대조군은 비어있는 플라스미드를 수용하였다 (Ctrl). 도 2A는 2주 후 WT 마우스 및 대조군의 혈액 호중구 카운트를 나타낸다 (N=3-6). 도 2B는 1주 후 WT 마우스로부터의 혈액 도말의 DNA-염색에서 NET-유사 구조 (화살표)를 나타낸다(M=3). 스케일 바: 20 μm. 도 2C는 WT (N=7), DNase1-/- (D1-/-, N=6), DNase1l3-/- (D1L3-/-, N=6), DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-, N=6) 및 대조군 (Ctrl, N=4)의 생존율을 나타낸다. 도 2D는 DNase1 (CSF3/D1, N=5), DNase1l3 (CSF3/D1L3, N=6), 및 대조군 (CSF3/Ctrl, N=4)으로 CSF3을 공동-발현하는 D1/D1L3-/- 마우스의 생존율을 나타낸다. 도 2E-2I는 만성 호중구증가증 동안 치사율을 특성화한다 (N= 4). 도 2E는 주변 체온 변화를 나타낸다. 도 2F는 혈장 및 소변의 사진을 제공한다. 도 2G는 혈액 중 헤모글로빈의 농도를 제공한다. 도 2H는 혈액 도말의 이미지를 제공한다. 화살표는 분열적혈구를 가리킨다. 스케일 바: 20 μm. 도 2I는 혈장 중 LDH 농도를 나타낸다. UT: 비처리된 마우스 (N=5-6). 이미지는 3마리 이상의 마우스를 대표하는 것이다. 통계: (도 2A, 2H, 2I) 일원 및 (도 2E) 이원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교, (도 2B) 스튜던츠 t-시험(student's t-test), (도 2C, 2D) 로그-랭크 시험(Log-rank test); # P < 0.01, § P < 0.001 vs. 모든 다른 그룹 또는 베이스라인 (BL).

도 3A-도 3G는, DNase1 및 DNase1l3이 만성 호중구증가증 동안 NET-클롯에 의한 혈관 폐색을 막음을 보여준다. DNase1 (CSF3/D1, N=4), DNase1l3 (CSF3/D1L3, N=4), 또는 대조군 플라스미드 (CSF3/Ctrl, N=4)로의 CSF3을 공동-발현하는 DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-)의 조직학적 분석. 도 3A는 폐의 헤마톡실린 및 에오신 염색 (H&E)을 제공한다. 스케일 바: 500 μm (개요), 25 μm (상세). 도 3B는 시야 (FOV) 당 헤마톡실린-양성 클롯에 의해 폐색된 폐에서의 혈관의 정량화를 나타낸다. 비처리된 WT 마우스 (UTWT, N=4), 비처리된 D1/D1L3-/- 마우스 (UT; N=4). 도 3C는 호중구-마커 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 및 크로마틴에 대한 폐색된 혈관의 면역염색을 나타낸다. 도 3D 및 3E는 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor) (vWF), 피브린, 및 DNA에 대한 면역염색을 나타낸다. 세가지 유형의 NET-클롯이 검출되었다 (α, vWF+/피브린-; β, vWF+/피브린+; γ, vWF-/피브린-). 도 3F는 NET-클롯에서의 vWF 및 피브린의 정량화를 제공한다. 데이터는 평균±SD로 나타내었고, n = 108이다. 도 3G는 IgG (N=4), 항-혈소판-IgG (N=5), 및 다비가트란 (N=5)으로 처리된 CSF3를 발현하는 D1/D1L3-/- 마우스의 생존율을 나타낸다. 스케일 바: 50 μm. 이미지는 3마리 이상의 마우스를 대표하는 것이다. (도 3C, 3D, 3E) 점선은 용기 벽을 나타낸다. 통계: (도 3B) 일원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교; § P < 0.001 vs. 모든 다른 그룹, (도 3G) 로그-랭크 시험; P > 0.05 항-혈소판-IgG 또는 다비가트란 vs. IgG.

도 4A-도 4I는, DNase1 및 DNase1l3이 패혈증에서 숙주 손상에 대하여 보호함을 보여준다. DNase1 (D1, N=7), DNase1l3 (D1L3, N=8), 또는 대조군 플라스미드 (Ctrl, N=11)를 발현하는 DNase1 및 DNase1l3의 조합 결핍 (D1/D1L3-/-)을 갖는 마우스 및 WT 마우스 (N=5)를 리포폴리사카라이드 및 열-사멸 대장균으로 처리하여 패혈증을 유도하였다. 도 4A는 패혈성 마우스의 생존 시간을 나타낸다. 도 4B는 혈액 중 헤모글로빈의 농도를 나타낸다. 도 4C는 혈장 및 소변의 사진을 나타낸다. 도 4D는 혈장 중 LDH 농도를 제공한다. 도 4E는 시야 (FOV) 당 혈액 중의 분열적혈구의 정량화를 나타낸다. 도 4F는 FOV 당 폐에서의 폐색된 혈관의 정량화를 나타낸다. 도 4G는 폐의 헤마톡실린 및 에오신 염색 (H&E)을 나타낸다. 화살촉은 폐색된 혈관을 가리킨다. 스케일 바: 500 μm. 도 4H 및 4I는 부분 및 완전 폐색된 혈관의 H&E 염색을 나타낸다. 화살표는 세포간 공간을 커버하는 NET를 가리킨다. 삽입물은 개요이다. 스케일 바: 50 μm. 통계: (도 4A) 로그-랭크 시험; # P < 0.01 vs. 모든 다른 그룹,

(도 4B-4F) 일원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교; § P < 0.001, # P < 0.01.

도 5A-도 5E는 만성 호중구증가증의 뮤린 모델을 나타낸다. 4주령 WT 마우스에게 CSF3-발현 플라스미드 (CSF3) 또는 비어있는 대조군 플라스미드 (Ctrl)를 주사하였다. 도 5A는 혈장 중의 G-CSF 수준을 나타낸다 (N=3-6). BL: 베이스라인, 주사 전; Ctrl: 2주 동안 CSF3을 갖지 않는 대조군 플라스미드를 발현하는 마우스 (N=4-5). 도 5B는 폐, 신장, 및 간의 호중구 엘라스타제에 대한 면역염색을 나타낸다. 스케일 바: 200 μm. 도 5C는 비장의 사진 및 체중을 나타낸다 (N=5-6). 스케일 바: 1 cm. 도 5D는 지시된 시간에 마우스의 체중을 나타낸다 (N=3-5). 도 5E는 주사 2주 후 ALT, AST, BUN, 및 크레아티닌의 전혈 및 혈장 수준에서의 호중구 카운트를 나타낸다. 이미지는 3마리 이상의 마우스를 대표하는 것이다. 통계: (도 5A, 5C) 일원 및 (도 5D) 이원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교, 및 (도 5E) 스튜던츠 t-시험; # P < 0.01, § P < 0.001 vs. (도 5A) BL, 또는 (도 5C) UT.

도 6A-도 6D는, DNase1 및 DNase1l3이 만성 호중구증가증 동안 간 및 신장에서의 NET-클롯의 형성 및 기관 손상을 막음을 보여준다. 대조군 플라스미드 (CSF3/Ctrl, N=4), DNase1 (CSF3/D1, N=4), 또는 DNase1l3 (CSF3/D1L3, N=4)로의 CSF3을 공동-발현하는 DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-)의 분석. 대조군은 비처리된 WT 마우스 (UTWT, N=4) 및 비처리된 D1/D1L3-/- 마우스 (UT; N=4)를 포함한다. 도 6A는 알라닌 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (ALT, AST)의 혈장 수준을 나타낸다. 도 6B는 혈액 우레아 질소 (BUN) 및 크레아티닌의 혈장 수준을 나타낸다. 도 6C는 섹션 당 간에서의, 또한 시야 (FOV) 당 신장에서의 혈관내 헤마톡실린-풍부 클롯의 정량화를 제공한다. 도 6D는 간 및 신장의 H&E 염색을 제공한다. 스케일 바: 500 μm (개요), 50 μm (상세). 이미지는 3마리 이상의 마우스를 대표하는 것이다. 통계: (도 6A, 6B, 6C) 일원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교; # P < 0.01, § P < 0.001 vs. 모든 다른 그룹.

도 7A-도 7C는, 헤마톡실린-양성 클롯이 NET로 구성됨을 보여준다. 도 3A-3G에 나타낸 만성 호중구증가증을 갖는 DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-) (D1/D1L3-/- + CSF3/Ctrl)로부터의 폐의 분석. 도 7A는 연속적 폐 섹션의 DNA에 대한, 또한 크로마틴에 대한, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로의 염색을 제공한다. 스케일 바: 200 μm. 도 7B는 크로마틴, CRAMP (카텔린-관련 항미생물 펩티드), 및 DNA에 대한 폐색된 혈관의 면역염색을 제공한다. 스케일 바: 50 μm. 도 7C는 크로마틴, 시트룰린화 히스톤 3 (citH3), 및 DNA에 대한 폐색된 혈관의 면역염색을 제공한다. 스케일 바: 50 μm. 이미지는 3마리 이상의 마우스를 대표하는 것이다.

도 8A 및 도 8B는, 인간 NET가 시험관내에서 클롯을 형성함을 보여준다. 도 8A는 시험관내에서 PMA-활성화된 인간 호중구에 의해 생성된 NET-클롯 (화살표)의 사진을 제공한다. 비처리된 호중구 (UT) 또는 재조합 인간 DNase1의 존재 하에 활성화된 호중구 (PMA + D1)를 대조군으로서 제공하였다. 스케일 바: 5 mm. 도 8B는 시험관내 생성된 NET-클롯의 헤마톡실린 및 에오신 염색 (H&E) 및 크로마틴 및 호중구-마커 미엘로퍼옥시다제 (MPO)에 대한 면역염색을 제공한다. 스케일 바: 200 μm. 이미지는 3개 이상의 독립적 실험을 대표하는 것이다.

도 9A 및 도 9B는, NET-분해가 STEC-HUS에서 질환 활성과 상관됨을 보여준다. 도 9A는 이미지를 나타내고, 도 9B는 완충제, 정상적 건강 공여자로부터의 혈장 (N=7), 또는 STEC-HUS를 갖는 11명의 환자의 급성 질환 상태 (급성) 및 차도 상태 (Rem.)에서 수집된 혈장과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 NET의 DNA-염색의 정량화를 나타낸다. 스케일 바: 50 μm. 통계: 일원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교; § P < 0.001 vs. 모든 다른 그룹.

도 10은 환자 번호, 부검 보고서에 지시된 사망 원인 (ARDS, 급성 호흡 장애 증후군)과 같은 다양한 검사 환자로부터의 인간 조직의 기술 표를 제공한다. 환자의 성별 및 연령. 분석된 조직의 유형. 조직은 3 단계 절차로 분석하였다: 첫째, 헤마톡실린 & 에오신 염색에서의 헤마톡실린-풍부 클롯 / 응집물의 규명; 둘째, 크로마틴 & 미엘로퍼옥시다제 (MPO)에 대한 면역염색에 의한 헤마톡실린-풍부 클롯에서 NET의 규명; 셋째, 폐 아키텍처 내의 NET-클롯의 국소화의 규명.

도 11A-도 11D는, 인간 NET가 계내에서 클롯을 형성함을 보여준다. 패혈증을 갖는 2명의 환자 (도 10에서 환자 #6 및 #7)로부터 부검에서 폐 조직을 수집하였다. 도 11A는 환자 #6으로부터의 폐 조직에서의 두 헤마톡실린-풍부 혈관내 클롯의 H&E 염색을 나타낸다. 도 11B는 패널 A에 나타낸 좌측 혈관의 크로마틴 및 미엘로퍼옥시다제 (MPO)에 대한 연속 섹션의 면역염색을 나타낸다. 도 11C는, 환자 #7로부터의 폐 조직에서 H&E 염색 혈관이 헤마톡실린-풍부 혈관내 클롯을 나타냄을 보여준다. 도 11D는 크로마틴 및 MPO에 대한 연속 섹션의 면역염색을 나타낸다. 화살표는 NET의 클롯을 가리킨다. 스케일 바: 50 μm.

도 12는, NET-클롯이 패혈성 마우스에서 혈관을 폐색시킴을 보여준다. DNA, 크로마틴 및 미엘로퍼옥시다제

(MPO)에 대한 패혈성 DNase1/DNase1l3-/- 마우스에서의 완전 폐색된 혈관의 면역염색. NET의 DNA 및 크로마틴 염색 (화살표)은 핵 염색 (별표)에 비해 이량체로 보이고, 세포간 공간을 커버한다. 스케일 바: 10 μm.

도 13A-도 13F는, DNase1 및 DNase1l3이 별개의 메커니즘에 의해 NET를 분해함을 보여준다. 도 13A는 WT, DNase1-/- (D1-/-), DNase1l3-/- (D1L3-/-), DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-)로부터의 혈청과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 PFA-고정 NET의 DNA-염색을 제공한다. 데이터는 ≥3개 독립적 실험을 대표하는 것이다. 스케일 바: 50 μm. 도 13B는 WT, D1-/-, D1L3-/-, 및 D1/D1L3-/- 마우스로부터의 혈청과 인큐베이션 후 PFA-고정 NET로부터 방출된 무세포 DNA 단편의 농도를 나타낸다. 도 13C는 비히클, 재조합 뮤린 DNase1 (rmD1), 또는 재조합 뮤린 DNase1l3 (rmD1L3)과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 비고정 NET의 DNA-염색을 나타낸다. 도 13D는 비히클, rmD1, 또는 rmD1L3과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 비고정 NET로부터 방출된 무세포 DNA 단편의 농도를 나타낸다. 도 13E는 비히클, rmD1, 또는 rmD1L3과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 PFA-고정 NET의 DNA-염색을 나타낸다. 도 13F는 비히클, rmD1, 또는 rmD1L3과 인큐베이션 후 시험관내에서 생성된 PFA-고정 NET로부터 방출된 무세포 DNA 단편의 농도를 나타낸다. 일원 ANOVA 후, 본페로니의 시험 후 다중 비교에 의한 통계; § $P < 0.0001$.

도 14A-도 14G는 인간 및 마우스의 순환에서의 DNase1 및 DNase1l3 활성을 제공한다. 도 14A-도 14E는 SRED에 의해 정량화된 인간 및 뮤린 혈장의 DNase 활성을 나타낸다. 도 14A는, 인간 DNase1에 대한 폴리클로날 항체 (α-hDNase1)를 갖는 (그러나 IgG는 갖지 않음) 정상적 건강 공여자 (NHD)로부터의 혈장의 보충이 농도-의존적 방식으로 DNA 분해 활성을 차단함을 보여준다 (*: $p < 0.05$ vs. IgG). 도 14B는, 200 μg/ml α-hDNase1 및 헤파린 (DNase1l3의 억제제)으로 보충된 혈장이 200 μg/ml α-hDNase1로 보충된 혈장에서의 잔류 DNase 활성을 차단함을 보여준다 (*: $p < 0.05$ vs. NHD). 도 14C-도 14E는 마우스 및 NHD로부터의 혈장의 일련의 희석액에서 DNase 활성의 비교를 제공한다. 도 14C는, WT 마우스의 총 DNase 활성이 NHD에서보다 대략 10배 높음을 보여준다. 도 14D는, DNase1l3-/- 마우스로부터의 혈장에서 DNase1 활성이 500 μg/ml 헤파린으로 보충된 인간 혈장보다 대략 10배 높음을 보여준다. (DNase1-/- 마우스로부터의 혈장에서 E DNase1l3 활성은 200 μg/ml α-hDNase1로 보충된 인간 혈장보다 대략 10배 높다. (F, G) 시험관내에서의 NET-분해가 도 14F 및 도 14G에 나타나 있다. 도 14F는, NHD 단독으로부터의 또는 200 μg/ml α-hDNase1로 보충된 혈장, TMA 환자로부터의 혈장, 및 WT, DNase1-/-, 및 DKO 마우스로부터의 혈장과 인큐베이션된 활성화된 호중구를 나타낸다 (스케일 바: 200 μm). 도 14G는 지시된 공급원으로부터의 혈장과 인큐베이션된 활성화된 호중구의 상청액 중의 무세포 DNA를 나타낸다 (§: $p < 0.001$ vs. NHD). 인간 혈장에 의한 시험관내 NET-분해는 DNase1에 의존한다 (인간 혈장에서 DNase1l3은 NET를 분해하기에 충분하지 않음).

도 15A-도 15C는 DNase1/DNase13-/- 마우스의 대안적 균주에서 만성 호중구증가증의 치명적인 과정을 나타낸다. DNase1-/- 마우스의 대안적 균주 (실시예 1의 방법 참조)를 DNase1l3-/- 마우스와 교차시켜 조합 결핍을 갖는 마우스를 생성하였다. 도 15A는 WT (N=9), DNase1-/- (D1-/-, N=5), 및 DNase1/DNase1l3-/- 마우스 (D1/D1L3-/-, N=5)에서의 호중구증가증의 생존율 곡선을 제공한다. 만성 호중구증가증을 CSF3-발현 플라스미드 (CSF3)의 주사에 의해 유도하였다. 도 15B는 폐 섹션의 헤마톡실린 및 에오신 염색 (H&E)을 제공한다. 화살표는 D1/D1L3-/- 마우스에서 헤마톡실린 양성 클롯을 가리킨다. 스케일 바: 500 μm. 도 15C는 대조군 플라스미드 (CSF3/Ctrl, N=6), DNase1 (CSF3/D1, N=5), 또는 DNase1l3 (CSF3/D1L3, N=6)으로의 CSF3을 공동발현하는 D1/D1L3-/- 마우스의 생존율을 제공한다. 통계: 로그-랭크 시험; § $P < 0.001$.

도 16A-도 16B는 시험관내에서 DNase1 및 DNase1L3의 과다활성 변이형을 규명하기 위한 스크리닝 접근을 나타낸다. 도 16A는, DNase의 라이브러리가 야생형 DNase1L3 (I, D1L3), 야생형 DNase1 (II, D1), 및 그의 변이형을 포함하였음을 보여준다. D1 및 D1L3 변이형은 D1L3으로부터 D1 (III, $D1^{V}$) 및 D1로부터 D1L3 (IV, $D1L3^{V}$)으로의 전달에 의해 디자인되었다. DNase 활성을, 기질로서, 고분자량 (HMW) DNA, dsDNA 및 크로마틴의 분해를 사용하여 시험하였다. 도 16B에서, 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: D1, 0.0005 ng). D1은 D1L3에 비해 대략 100배 더 효율적으로 dsDNA를 분해한다. 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. D1L3은 D1에 비해 대략 100배 더 효율적으로 크로마틴을 분해한다. 10:1 또는 1:1 (m/m)의 비율에서, D1 및 D1L3은 크로마틴의 분해에서 상승적 효과를 나타낸다.

도 17은 인간 DNase1 (서열 번호: 1) 및 인간 DNase1L3 (서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 신호 펩티드, 보존 아미노산, D1L3의 가변 영역에서의 부가적 아르기닌- 및 리신-잔기, 및 D1L3의 C-말단 테일이 강

조되어 있다. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다.

도 18은 단지 DNase1L3 중에 존재하는 아르기닌- 및 리신-잔기의 목록을 나타낸다. DNase1에서의 상응하는 아미노산 및 DNase1에서의 아미노산 치환이 나타나 있다. 괄호 안의 숫자는 신호 펩티드가 없는 성숙 단백질에서의 아미노산 위치이다. D1L3의 C-말단 테일에 위치하는 아르기닌- 및 리신-잔기는 레인 29-37에 나타나 있다. 본 출원은 37개의 가능한 DNase1 변이형 중 22개를 시험하였다.

도 19는 도 18에 열거된 단일 아르기닌 및 리신 아미노산 치환을 갖는 DNase1 변이형의 특성화를 나타낸다. 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 크로마틴 분해 활성 증가를 유발하는 아미노산 치환이 청색으로 강조되어 있다. 이러한 효과가 없는 샘플은 밝은 청색으로 나타나 있다.

도 20은 인간 DNase1 (서열 번호: 1), 마우스 DNase1 (서열 번호: 3), 래트 DNase1 (서열 번호: 4), 및 인간 DNase1L3 (서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다. 신호 펩티드는 회색으로 강조되어 있다. 마우스/래트 DNase1 및 인간 DNase1L3 중에 존재하는, 그러나 인간 DNase1 중에는 존재하지 않는 양이온성 아미노산 잔기 (아르기닌: R, 리신: K)가 강조되어 있다. 4개의 이러한 R/K-잔기는 마우스 DNase1 (Q31R, Q49K, Q79R, W209R)에서 나타난다. 래트 DNase1은 2개의 부가적 R/K-잔기 (Q177K, G262K)를 함유한다.

도 21A-도 21B는 뮤린과 인간 DNase1의 비교를 나타낸다. (도 21A) 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타낸다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 뮤린 DNase1 (mD1) 및 인간 DNase1 (D1)은 유사한 수준의 dsDNA 분해 활성을 나타낸다. 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 뮤린 DNase1 (mD1)은 인간 DNase1 (D1)에 비해 더 큰 크로마틴 분해 활성을 나타낸다. (도 21B) 인간 DNase1로의 유전자 치료는 NET에 의한 치명적인 혈관으로부터의 단지 부분적 보호를 제공한다. 부수적 혈관내 NET-형성을 갖는 만성 호중구증가증이 *Csf3*의 간 발현에 의한 것과 같이 유도되었고, 이는 G-CSF로 코딩된다. 데이터는 *Csf3*-발현 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스의 생존율 곡선을 나타낸다. 동물에게 *Csf3* 및 비어있는 대조군 벡터 (*Ctrl*, N = 6), *Csf3*과 인간 DNase1의 혼합물 (*hDnase1*, N = 12), 및 *Csf3* 및 뮤린 DNase1 (*mDnase1*, N = 5)을 주사하였다. *P*-값을 로그-랭크 시험을 사용하여 계산하였다.

도 22A-도 22B는 생체내 및 시험관내에서의 설치류-유사 인간 DNase1-변이형의 특성화를 나타낸다. (도 20A) 설치류-유사 DNase1-변이형으로의 유전자 치료는 NET에 의한 치명적인 혈관으로부터 완전한 보호를 제공한다. 부수적 혈관내 NET-형성을 갖는 만성 호중구증가증이 *Csf3*의 간 발현에 의한 것과 같이 유도되었고, 이는 G-CSF로 코딩된다. 데이터는 *Csf3*-발현 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스의 생존율 곡선을 나타낸다. 동물에게 *Csf3* 및 비어있는 대조군 벡터 (*Ctrl*, N = 6), *Csf3*과 인간 DNase1의 혼합물 (*hDnase1*, N = 12) (도 21에 나타냄)을 주사하였다. *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스의 제3 그룹은, 4개 아미노산 돌연변이 Q31R/Q49K/Q79R/W209R을 함유하는 뮤린-유사 DNase1-변이형으로 코딩하는 유전자 (*Q31R/Q49K/Q79R/W209R*, N = 6) 및 *Csf3*으로의 주사를 수용하였다. *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스의 제4 그룹은, 6개 아미노산 돌연변이 Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, 및 G262K를 함유하는 래트-유사 DNase1-변이형으로 코딩하는 유전자 (*Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K*, N = 6) 및 *Csf3*으로의 주사를 수용하였다. *P*-값을 로그-랭크 시험을 사용하여 계산하였다. (도 22B) 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 인간 DNase1의 뮤린-유사 변이형 (Q31R/Q49K/Q79R/W209R), 및 인간 DNase1의 래트-유사 변이형 (Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K)은 야생형 인간 DNase1에 비해 유사한 dsDNA를 나타내지만 보다 큰 크로마틴 분해 활성을 나타낸다.

도 23은 인간 DNase1 (D1, 서열 번호: 1) 및 인간 DNase1L3 (D1L3, 서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다. 공개된 돌연변이를 갖는 D1의 아미노산이 강조되어 있다. 인간 D1L3은 인간 DNase1에서의 기능획득과 관련된 3개의 돌연변이 (Q31R/T227K/A136F) 및 증가된 활성과 관련된 4개의 돌연변이를 함유한다.

도 24A-24B는 돌연변이 Q31R, T227K, 및/또는 A136F를 갖는 DNase1 변이형 ($D1^V$)의 특성화를 나타낸다. (도 24A) 트랜스펙션된 HEK293 세포의 배양물 상청액을 분석하였다. 야생형 DNase1 (D1) 및 DNase1L3 (D1L3)으로 트랜스펙션된 HEK 세포를 대조군으로서 제공하였다. 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 3개 아미노산 돌연변이 Q31R/T227K/A136F를 특징으로 하는 $D1^V$는, Q31R, T227K, A136F, 또는 Q31R/T227K를 특징으로 하는 D1 및 $D1^V$에 비해 유사한 dsDNA 분해 활성, 그러나 보다 큰 크로마틴 분해 능력을 갖는다. (도 24B) 과다활성 $D1^V$로의 유전자 치료는 NET에 의한 치명적인 혈관으로부터의 완전한 부분적 보호를 제공한다. 부수적 혈관내 NET-형성을 갖는 만성 호중구증가증이 Csf3의 간 발현에 의한 것과 같이 유도되었고, 이는 G-CSF로 코딩된다. 데이터는 *Csf3*-발현 $Dnase1^{-/-}Dnase1l3^{-/-}$ 마우스의 생존율 곡선을 나타낸다. 동물에게 *Csf3* 및 비어있는 대조군 벡터 (*Ctrl*, N = 6), *Csf3*과 인간 DNase1의 혼합물 (*hDnase1*, N = 12) (도 21에 나타냄)을 주사하였다. 추가로, $Dnase1^{-/-}Dnase1l3^{-/-}$ 마우스는, 삼중 아미노산 돌연변이 Q31R/T227K/A136F (*Q31R/T227K/A136F*, N = 6)를 함유하는, 인간 DNase1-변이형으로 코딩하는 유전자 및 *Csf3*으로의 주사를 수용하였다. *P*-값을 로그-랭크 시험을 사용하여 계산하였다.

도 25는 돌연변이 Q31R/T227K/A136F를 특징으로 하는 야생형 DNase1 (D1) 및 DNase1-변이형 ($D1^V$)의 비교를 나타낸다. 정제된 단백질을 지시된 양으로 분석하였다. 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: 0 ng). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 돌연변이 Q31R/T227K/A136F를 특징으로 하는 DNase1-변이형은 야생형 DNase1에 비해 대략 10-20배 더 효율적으로 크로마틴을 분해한다.

도 26은 아미노산 돌연변이 A164K, A136F, 및 A164K/A136F를 갖는 DNase1 변이형 ($D1^V$)과 야생형 DNase1 (D1) 및 야생형 (D1L3)의 비교를 나타낸다. 트랜스펙션된 HEK 세포의 배양물 상청액을 분석하였다. 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. A136F/A164K를 특징으로 하는 DNase1-변이형이 크로마틴을 가장 효율적으로 분해한다.

도 27A-도 27B는 돌연변이 A226_T227insK를 갖는 DNase1 변이형의 개발을 나타낸다. (도 26A) 인간 DNase1 (서열 번호: 1) 및 인간 DNase1L3 (서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다. DNase1L3에서의 중요 아르기닌 잔기가 강조되어 있다. DNase1와 DNase1L3 사이의 공유 아미노산이 강조되어 있고, 이는 DNase1의 아미노산 서열 ATP를 DNase1L3의 VKKS로 교체하기 위한 앵커로서 작용한다. (도 26B) 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 겔을 야생형 DNase1 (D1), 돌연변이 A226_T227insK를 특징으로 하는 DNase1 변이형 ($D1^V$), T227K, 및 A226_P228delinsVKKS로 로딩하였다. A226_T227insK는 감소된 dsDNA 분해 활성과 관련되지만, A226_P228delinsVKKS는 그렇지 않다.

도 28은 인간 DNase1 [4AWN]의 구조를 나타낸다. N-말단 베타-시트 및 C-말단 베타-시트 및 모티브 S272/D273/H274 (D1-단백질 패밀리 구성원에서 보존됨)가 강조되어 있다.

도 29는 상동 단백질의 빌딩 블록 엔지니어링의 개념을 나타낸다. 기술은, 공여자와 수용자 단백질 사이에서, 보존된 단일 또는 다중 가변 아미노산에 의해 플랭킹된, 단일 또는 다중 가변 아미노산을 전달한다.

도 30은 마우스 (서열 번호: 3 및 34), 래트 (서열 번호: 4 및 35), 침팬지 (서열 번호: 36 및 37), 및 인간 (서열 번호: 1 및 2)의 DNase1 및 DNase1L3의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. N-말단 신호 펩티드 및 보존 아미노산이 강조되어 있다. 가변 아미노산은 강조되어 있지 않고, DNase1로부터 DNase1L3으로, 또한 그 반대로 전달될 수 있는 빌딩 블록으로서 작용한다. 약어: AA, 아미노산.

도 31A-도 31B는 인간 DNase1 (D1) 및 인간 DNase1L3 (D1L3)에서의 빌딩 블록의 목록을 나타낸다. 도 31A는,

각각 N- 및 C-앵커로서 작용하는, D1 및 D1L3에서 보존된 아미노산을 나타낸다. 빌딩 블록은 D1 및 D1L3에서의 가변 아미노산이다. D1L3으로부터 D1로 빌딩 블록을 전달하는 돌연변이가 나타나 있다. 도 31B는 D1L3에서의 N- 및 C-앵커를 나타낸다. D1로부터 D1L3으로 빌딩 블록을 전달하는 돌연변이가 열거되어 있다. AA: 아미노산.

도 32는 상동 단백질의 빌딩 블록 엔지니어링의 적용을 나타낸다. 적용은 초기 스크리닝 단계로서, 상동 공여자와 수용자 단백질 사이의 빌딩 블록의 클러스터의 전달을 사용한다. 추가의 임의적 단계는 개별 빌딩 블록의 전달, 그 후 개별 아미노산의 전달이다. 최종 단계 (나타내지 않음)에서는, 다중 아미노산, 빌딩 블록, 및 빌딩 블록 클러스터가 조합되어 키메라 효소를 변성시킬 수 있다.

도 33은 DNase1L3 (D1L3)으로부터의 빌딩 블록을 특징으로 하는 DNase1 변이형 ($D1^V$)의 특성화를 나타낸다. 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 크로마틴 분해 활성 증가를 유발하는 빌딩 블록 치환이 어두운 음영으로 강조되어 있다. 이러한 효과를 갖지 않는 샘플은 밝은 음영으로 나타나 있다. 빌딩 블록 11, 12-14, 26, 41-48, 및 49의 조합을 특징으로 하는 DNase1 변이형은 야생형 DNase1L3과 유사한 크로마틴 분해 활성을 나타낸다.

도 34A-도 34B는 야생형 DNase1L3의 C-말단 테일을 갖지 않는 DNase1L3 변이형의 개발을 나타낸다. 도 34A는 인간 DNase1 (서열 번호: 1) 및 인간 DNase1L3 (서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다. DNase1L3의 C-말단 테일이 강조되어 있고, 그의 핵 국소화 신호가 박스화되어 있다. DNase1과 DNase1L3 사이의 공유 아미노산이 지시되어 있다. 보존 SDH 모티브 후에 위치하는 아미노산은 DNase1과 DNase1L3 사이에서 빌딩 블록 클러스터 60-62가 교환되었다. 도 34B는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내는 지모그래피를 보여준다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 겔을 야생형 DNase1 (D1), D1로부터의 BB 클러스터 60-62를 특징으로 하는 DNase1 변이형 ($D1^V$), D1로부터의 BB 클러스터 60-62를 특징으로 하는 DNase1L3 변이형 ($D1L3^V$)으로 로딩하였고, 2개 돌연변이 (K301A, K303A)를 갖는 $D1L3^V$은 NLS2를 불활성화시키도록 구성되었다. D1로부터의 BB 클러스터 60-62를 갖는 $D1L3^V$는 야생형 D1L3에 비해 증가된 크로마틴 분해 활성을 나타내었다.

도 35A-도 35B는 글리코실화된 DNase1L3 변이형 ($D1L3^V$)의 개발을 나타낸다. 도 35A는 인간 DNase1 (서열 번호: 1) 및 인간 DNase1L3 (서열 번호: 2)의 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 시퀀스 룰러는 아미노산 위치를 나타낸다. DNase1의 글리코실화 모티브 N40-X-T42 및 N128-X-T130이 강조되어 있다. 자리는 빌딩 블록 (BB) 4 및 빌딩 블록 클러스터 (BB) 23-25의 부분이다. DNase1과 DNase1L3 사이의 관련 공유 아미노산이 강조되어 있다. (도 35B) 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: Ctrl). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. 겔을 야생형 DNase1L3 (D1L3), D1로부터의 BB 4를 특징으로 하는 DNase1L3 변이형 ($D1L3^V$), 및 D1로부터의 BB 클러스터 23-25를 특징으로 하는 DNase1L3 변이형 ($D1L3^V$)으로 로딩하였다. D1L3에 대한 항체로의 웨스턴 블롯 (WB)은, $D1L3^V$가 증가된 양의 보다 큰 단백질을 나타냄을 검출하였다. 글리코실화된 DNase1L3 변이형 ($D1L3^V$)은 그의 크로마틴 분해 능력을 보유하였다.

도 36A-도 36F는 생체내에서의 NET에 대한 DNase1L3 (서열 번호: 2) 및 그의 변이형 (서열 번호: 17)의 치료적 효과를 나타낸다. 도 36A는 심실 내의 NET의 헤마톡실린-풍부 및 치밀 클롯을 갖는 마우스 심장의 H&E 염색을 나타낸다. 도 36B는, NET에 의한 혈관 폐색을 일으키는, NET의 유도로 시작하는 시간 라인을 나타낸다. 혈뇨 및 저체온증은 생체내 NET-클롯에 대한 외부적 징후이다. (도 36C) 실험 디자인의 개요: *Csf3*을 $Dnase1^{-/-}Dnase1l3^{-/-}$에서 발현시켜 NET의 혈관 클롯을 유도하였다. 혈뇨 및 저체온증을 나타낸 마우스를 비히클 (N = 3), 도르나제 알파 (D1, N = 3), 정제된 DNase1L3 (D1L3, N = 3), 또는 정제된 DNase1L3 변이형 (서열 번호: 17, $D1L3^V$, N = 3)의 주사에 의해 랜덤화하였다. 30분 후 폐 및 혈청을 수집하였다. 식염수 또는 D1은 아니었지만, D1L3 또는

D1L3^{V}로의 치료는, 폐에서 NET에 의한 혈관 폐색을 현저히 감소시켰고 (도 36D), 혈청 중의 DNA의 수준을 증가시켰다 (도 36E). 도 36F는 D1L3 치료를 수용한 마우스로부터의 혈청에서의 올리고-뉴클레오솜을 나타낸다. D1L3^{V}를 수용한 마우스는 보다 작은 모노- 및 디-뉴클레오솜을 나타내었다. D1 치료를 수용한 마우스의 혈청으로부터의 DNA 단리물은 다양한 크기의 희미한 DNA 도말을 나타내었지만, 비히클로 주사된 마우스의 혈청으로부터 DNA가 단리될 수 있었다.

도 37A-도 37C는 허혈-재관류 (IR) 손상의 래트 모델에서의 DNase1L3 변이형 (서열 번호: 17)의 치료적 효과를 나타낸다. (FIG: 37A) 실험 디자인의 개요: 수컷 야생형 래트의 1개 고환에 고환 비틀림이 적용되었다. 절차는 허혈성 조직 손상을 유발한다. 마우스를 랜덤화하였다. 고환의 비틀림-교정(de-torsion)을 수행한 후, 비히클 (N = 6), 도르나제 알파 (D1, N = 6), 또는 정제된 DNase1L3 변이형 (서열 번호: 17, D1L3^{V}, N = 6)을 주사하였다. 7일 후 비처리된 및 허혈 고환을 수집하였다. 도 37B는, 식염수 또는 D1은 아니었지만, D1L3^{V}로의 치료는 허혈 고환에서 위축을 현저히 감소시켰음을 보여준다. 도 37C에서는 거시적 조직 손상을 정량화하였다. 모든 비처리된 고환은 갈색을 띠고 혈관화되었고, 이는 건강 조직 (Ctrl, 스코어: 0)을 나타낸다. 고환 비틀림 후 재관류는 조직을 손상시켰고, 이는 백색을 띠었다 (IR, 스코어: 4). 식염수 또는 D1은 아니었지만, D1L3^{V}로의 치료는 조직 손상을 실질적으로 감소시켰고, 4/6 고환은 손상 징후를 나타내지 않았다. 스케일 바: 1cm.

도 38A-도 38C는 DNase1, DNase1L3, 및 그의 변이형의 발현 수준을 나타낸다. (도 38A) 야생형 DNase1 (D1), 그의 변이형 (D1^{V}, 서열 번호: 7), 야생형 D1L3, 및 그의 변이형 (D1L3^{V}, 서열 번호: 17)을 생성하는 CHO 세포의 안정적 풀을 생물반응기에서 배양하였다. 샘플을 주기적으로 수집하고, 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. D1 및 D1^{V}의 발현, 그러나 단지 낮은 수준의 D1L3 및 D1L3^{V}가 검출되었다. (도 38B) D1L3 및 D1L3^{V}의 강력한 발현이 피키아 파스토리스에서 달성되었다. (도 38C) 지모그래피는 어두운 원으로서 dsDNA 분해 활성을 나타내었다. dsDNA 분해 활성은 직경과 상관된다. 활성을 갖지 않는 샘플은 작은 흑색 스폿으로서 로딩 웰을 나타낸다 (예: D1L3, 0.0005 ng). 소화된 크로마틴으로부터 단리된 DNA의 아가로스 겔 전기이동 (AGE)은 고분자량 DNA로부터의 보다 낮은 또는 저분자량 DNA로의 이동 (이는 크로마틴 분해 활성과 상관됨)을 나타낸다. D1L3^{V}는 D1L3에 비해 대략 10배 더 효율적으로 크로마틴을 분해하였다.

도 39는 본 개시내용에 따른 특정 DNase 변이형을 나타낸다. 신호 펩티드를 갖는 DNase1 및 DNase1L3에서의 아미노산 돌연변이 뿐만 아니라 신호 펩티드가 없는 성숙 단백질이 열거되어 있다. 빌딩 블록 엔지니어링을 사용하여 생성된 돌연변이는 "+"로 표시되어 있고, 빌딩 블록은 괄호 안에 나타나 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 축적 및/또는 방출을 특징으로 하는 병태의 치료에 유용한 엔지니어링된 DNase 단백질, DNase1-단백질 패밀리의 구성원 (DNase1-유사 3 및 DNase1 포함)을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 NET가 관여되는 혈관 폐색의 예방 또는 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에서 입증되는 바와 같이, NET는 피브린 및 혈소판에 의존하지 않는 혈관 폐색에 대한 비정규적인 메커니즘에 참여한다.

[0028] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "호중구 세포외 트랩" 또는 "NET"는, 호중구, 단핵구, 대식세포, 호염기구, 호산구, 비만 세포, 암 세포, 손상된 세포 (예: 손상된 내피 세포) 등과 같은 (이에 제한되지는 않음) 세포에 의해 형성된 세포외 DNA를 포함하는 임의의 세포외 트랩 ("ET")을 지칭한다. 문맥에서 달리 지시하지 않는 한, 용어 NET 및 ET는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0029] 인간 및 마우스의 순환에서 나타나는 2종의 세포외 DNase 효소, DNase1 (D1) 및 DNase1-유사 3 (D1L3)이 존재한다. 이들 효소는 시험관내 및 생체내에서 NET를 분해하는 이들의 능력 및 메커니즘에 있어 결핍될 수 있고, 인간 및 마우스에서 비교적 저농도로 나타난다. 자연 효소는 재조합 치료, 또한 특히 전신 치료를 위한 이상적인 물리적, 효소적, 및/또는 약역학적 특성을 갖지 않는다.

[0030] D1 및 D1L3은, DNase1-유사 1 (D1L1) 및 DNase1-유사 2 (D1L2)와 함께, DNase1-단백질 패밀리에 속한다. D1 및 D1L3은, 인간, 영장류, 및 설치류를 포함한 다양한 종에서 발현된다. 인간 및 마우스에서, D1 및 D1L3은 49-52%의 단백질 유사성을 나타낸다. 그러나, 이들의 상동성에도 불구하고, D1 및 D1L3은 세포 기원, 억제제에 대한 민감성, 및 기질 친화도에 있어 상이하다. D1은 우선적으로 무단백질 DNA (예: 박테리아 DNA, 플라스미드 DNA)를 분열시키지만, D1L3은, 진핵 세포의 핵에서 통상적으로 나타나는, DNA 및 히스톤의 복합체, 크로마틴을 표적

화한다. D1 활성은 단량체 액틴으로의 결합에 따라 억제되고, 이는 생리학적 염 농도에 민감하다. 추가로, D1은 N40 (신호 펩티드가 없는 성숙 효소에서 N18에 상응함) 및 N128 (N106)에서 글리코실화되고, 이는 효소를 혈청 프로테아제에 의한 불활성화에 대해 저항성으로 만든다. 반면, D1L3은 글리코실화 및 액틴-결합 자리가 없고, 이는 각각 여러 프로테아제에 대한 그의 감수성 및 액틴에 대한 저항성을 유발한다.

[0031] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 대상체에서의 NET 축적을 감소시키거나 예방하기 위해, 치료용으로 보다 적합한 물리적, 약역학적, 및/또는 효소적 특성을 갖도록 엔지니어링된 D1L3 변이형을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 글리코실화, 증가된 기질 친화도를 제공하는 하나 이상의 아미노산 변경, 핵 국소화 신호의 불활성화, C-말단 테일의 전부 또는 일부의 결실, 페길화(pegylation), 및 담체 단백질 또는 모이어티에 대한 융합을 포함하는 재조합 D1L3 변이형을 제공한다. 다양한 구현예에서, D1L3 변이형은, 서열 번호: 2의 야생형 D1L3 단백질에 비해, 증가된 단백질 안정성, 증가된 프로테아제-저항성, 증가된 생체이용률, 순환에서 증가된 반감기, 및/또는 실질적으로 동일한 또는 보다 우수한 DNA 및/또는 크로마틴 및/또는 NET-분해 활성, 시험관내 발현 시스템 (예: 차이니즈 햄스터 난소 세포 및/또는 피키아 파스토리스)에서의 보다 높은 생성 수준을 갖는다.

[0032] 다양한 구현예에서, D1L3 변이형은, 본원에 기재된 바와 같은 서열 번호: 2에 대한 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는, 서열 번호: 2의 아미노산 서열에 의해 정의된 효소와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 서열 번호: 2에 의해 정의된 DNase 효소와 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같이, 야생형 DNase 효소와의 서열 동일성을 언급할 때, 또한 달리 언급되지 않는 한, 서열은 신호 펩티드가 없는 성숙 효소를 지칭한다. 또한, 달리 언급되지 않는 한, 아미노산 위치는, 명확성을 위해, 신호 펩티드를 포함한, 완전 번역된 DNase 서열에 대하여 번호부여된다. 따라서, 예를 들어, 서열 번호: 2의 효소와의 서열 동일성의 언급은 N-말단에서 M21을 갖는 성숙 효소와의 퍼센트 동일성을 지칭한다. 유사하게, 서열 번호: 1의 효소 (인간 D1)와의 서열 동일성의 언급은 N-말단에서 L23을 갖는 성숙 효소와의 퍼센트 동일성을 지칭한다.

[0034] 뉴클레오티드 및 아미노산 서열의 유사성, 즉 서열 동일성의 백분율은, 당업계에 공지된 서열 정렬을 통해 결정될 수 있다. 이러한 정렬은 여러 당업계에 공지된 알고리즘, 예컨대 카를린(Karlin) 및 알츠슐(Altschul)의 수학 알고리즘 (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), hmmalign (HMMER 패키지, http://hmmer.wustl.edu/) 또는 CLUSTAL 알고리즘 (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80)으로 수행될 수 있다. 예시적 알고리즘은 문헌 [Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410]의 BLASTN 및 BLASTP 프로그램에 도입되어 있다. BLAST 프로그램 활용시, 각각의 프로그램의 디폴트 파라미터가 사용된다.

[0035] 일부 구현예에서, 재조합 D1L3 단백질 변이형은 하나 이상의 글리코실화 공통 서열, 예를 들어, NX(T/S)를 포함한다. 인간 야생형 효소 (서열 번호: 2)는 공통 글리코실화 서열을 함유하지 않는다. 그러나, 글리코실화 공통 서열의 D1L3으로의 엔지니어링은 효소 활성에 대한 실질적인 영향 없이 글리코실화 (및 프로테아제 저항성)를 제공한다. 일부 구현예에서, 글리코실화 공통 서열은 야생형 서열 (예: 서열 번호: 2)로부터의 D38N 치환 및 N40T 또는 N40S 치환, 및/또는 A127N 치환 및 V129T 또는 V129S 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 D1L3 효소는 1, 2, 3, 또는 4개의 글리코실화 자리를 갖는다. 공통 서열은 단백질의 효소 활성에 영향을 주지 않는 위치에서 단백질 내로 도입될 수 있고, 일부 구현예에서는 효소의 구조 유지를 위해 중요한 효소의 부분 근처 (예를 들어, 아미노산 25 내지 289 이내, 또한 일부 구현예에서, 아미노산 24 내지 150 이내)에 위치한다.

[0036] 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 DNase 효소를 제공하며, 여기서 효소는 서열 번호: 2의 위치 38 및/또는 위치 127에 상응하는 위치에서 아스파라긴의 치환을 갖고, N38 및/또는 N127은 글리코실화된다. 일부 구현예에서, 위치 38 및/또는 127에서의 치환은 본원에 기재된 바와 같은 서열 번호: 1로부터의 빌딩 블록 치환을 통해 이루어진다.

[0037] 다양한 구현예에서, 하나 이상의 글리코실화를 갖는 D1L3 변이형은 야생형 D1L3 단백질 (서열 번호: 2)에 비해 혈청 프로테아제 분해에 대한 증가된 저항성 및/또는 증가된 혈청 반감기를 나타낸다.

[0038] 일부 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은 핵 국소화 신호 (NLS)의 불활성화를 포함한다. D1L3은, 둘 다 아팝토시스 동안 효소를 핵에 대해 표적화하는 2개의 핵 국소화 자리 (NLS1, NLS2)를 특징으로 한다. 실로, D1L3은 생체내에서 아팝토시스 및 괴사성 세포에서 핵 DNA의 단편화를 위해 요구된다. NLS1은 N-말단 근처 (서열 번호: 2에

대하여 대략 아미노산 위치 80 내지 96)에 위치한다. NLS2 (서열 번호: 2에 대하여 아미노산 위치 291 내지 304)는 C-말단 테일 (서열 번호: 2에 대하여 아미노산 위치 283 내지 305) 내에 매립되어 있고 이는 D1L3에 있어 독특하고 D1에는 존재하지 않는다. C-말단 테일은 세포외 DNA의 상이한 기질, 즉 아팝토시스 바디 내의 지질-캡슐화된 DNA 및 크로마틴을 분해하기 위해 D1L3에 대해 요구되는 것으로 여겨진다. 지질은 트랜스펙션 동안 DNA를 캡슐화한다. 간단히, cDNA, 무단백질 DNA, 및 양이온성 지질은 표적 세포의 혈장 막을 통해 침투하는 복합체를 형성한다. D1L3은 트랜스펙션을 방해하고, C-말단 테일이 이 기능에 있어 중요하다. D1L3의 생리학적 기질은, 아팝토시스 세포로부터의 크로마틴으로 채워진 세포외 지질 소포, 아팝토시스 바디이다. C-말단 테일은 D1L3이 아팝토시스 바디의 지질 막을 통해 침투하고 크로마틴 로드를 분해할 수 있게 한다. C-말단 테일은 또한, D1L3에 의한 무지질, 세포외 크로마틴의 분해를 위해 요구되는 것으로 여겨진다. 따라서, D1L3에 있어 독특한 분자적 특징인 C-말단 테일은, D1 및 D1L3의 별개의 기질 친화성의 원인이 되는 것으로 보인다.

[0039] 하나 이상의 NLS의 불활성화는 순환에서 효소의 유용성 및/또는 활성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, NLS 불활성화는 NLS1 및/또는 NLS2의 전부 또는 일부의 결실에 의한 것이다. 일부 구현예에서, NLS는 NLS1 및/또는 NLS2 내의 아미노산의 치환 및/또는 결실에 의해 불활성화된다. 일부 구현예에서, NLS2는 전체적으로 또는 부분적으로 결실된다. 일부 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은 C-말단 테일의 전부 또는 일부의 결실, 및/또는 C-말단 테일 내의 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함한다.

[0040] 특정 구현예에서, D1L3 변이형은 NLS1 도메인에서의 하나 이상의, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 아미노산 치환, 부가 (예: 삽입), 또는 결실을 함유한다. NLS2 도메인 또는 그의 일부가 결실될 수 있다. 특정 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은 C-말단 테일 도메인에서의 하나 이상의, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 아미노산 치환, 부가, 또는 결실을 함유한다. C-말단 테일 도메인 또는 그의 일부가 결실될 수 있다. 다양한 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은 C-말단 테일 도메인에 위치하는 NLS2 도메인에서의 하나 이상의, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 아미노산 치환, 부가, 또는 결실을 함유한다. NLS2 도메인 또는 그의 일부가 D1L3 단백질 변이형에서 결실될 수 있다.

[0041] 다양한 양태에서, 본 발명은, DNase1-단백질 패밀리 구성원의 효소 활성 변이형 (D1 및 D1L3의 변이형 포함)을 생성하기 위한 DNase1-단백질 패밀리 구성원과 같은 단백질 패밀리의 2개 구성원 사이에서의, "빌딩 블록"이라 불리는 단일 아미노산 또는 다중-인접 아미노산의 전달에 기초한 단백질 엔지니어링 기술을 제공한다. "빌딩 블록"은 DNase1-단백질 패밀리의 둘 이상의 구성원 사이의 가변적인 아미노산에 의해 정의된다. 이들 가변 아미노산은 DNase1-단백질 패밀리의 둘 이상의 구성원 사이에서 보존되는 아미노산 ("앵커")에 의해 플랭킹된다. 가변 단일 아미노산 또는 다중 근접 아미노산 ("빌딩 블록")은 보존 단일 아미노산 또는 다중 근접 아미노산 ("앵커") 사이에 이들을 이식함으로써 DNase1-단백질 패밀리의 구성원 사이에서 교환된다.

[0042] 이 접근은 본원에서 "빌딩-블록 단백질 엔지니어링"으로서 언급된다. 3개 이상의 아미노산이 전달되는 경우, 아미노산의 최대 1/3이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, 3 또는 6개의 아미노산이 빌딩 블록으로서 전달되는 경우, 각각 1개 또는 최대 2개의 잔기가 추가로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 4개 이상의 아미노산이 빌딩 블록 치환으로서 전달되는 경우, 전달된 아미노산의 최대 25%가, 예를 들어, 보존적 또는 비보존적 아미노산 변형을 가지며, 추가로 치환된다. 예를 들어, 4, 8, 또는 12개의 아미노산이 전달되는 경우, (각각) 1, 2, 또는 3개의 아미노산이 빌딩 블록 치환에서 추가로 치환될 수 있다.

[0043] 다양한 양태 (상기에 기재된 구현예와 관련된 것 포함)에서, D1L3 변이형은 D1로부터의 적어도 하나의 빌딩 블록 치환을 포함한다. 도 31은 D1과 D1L3 사이의 62개의 빌딩 블록 치환을 나타낸다.

[0044] D1로부터의 예시적 빌딩 블록 치환은 하기 중 하나 이상을 포함한다:

[0045] 서열 번호: 2의 1-20 (MSRELAPLLLLLLSIHSALA)의, 서열 번호: 1로부터의 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS)로의 치환; 서열 번호: 2의 21-25 (MRICS)의, 서열 번호: 1로부터의 23-27 (LKIAA)로의 치환; 서열 번호: 2의 28-30 (VRS)의, 서열 번호: 1로부터의 30-32 (IQT)로의 치환; 서열 번호: 2의 33-34 (ES)의, 서열 번호: 1로부터의 35-36 (ET)로의 치환; 서열 번호: 2의 36-45 (QEDKNAMDVI)의, 서열 번호: 1로부터의 38-47 (MSNATLVSYI)로의 치환; 서열 번호: 2의 47-51 (KVIK)의, 서열 번호: 1로부터의 49-53 (QILS)로의 치환; 서열 번호: 2의 52 (C)의, 서열 번호: 1로부터의 54 (Y)로의 치환; 서열 번호: 2의 54-58 (IILVM)의, 서열 번호: 1로부터의 56-60 (IALVQ)로의 치환; 서열 번호: 2의 60-61 (IK)의, 서열 번호: 1로부터의 62-63 (VR)로의 치환; 서열 번호: 2의 63-70 (SNNRICPI)의, 서열 번호: 1로부터의 65-72 (SHLTAVGK)로의 치환; 서열 번호: 2의 72-74 (MEK)의, 서열 번호: 1로부터의 74-76 (LDN)로의 치환; 서열 번호: 2의 77-84 (RNSRRGIT)의, 서열 번호: 1로부터의 79-84 (QDAPDT)로의 치환; 서열 번호: 2의 86 (N)의, 서열 번호: 1로부터의 86 (H)로의 치환; 서열 번호: 2의 88-89

(VI)의, 서열 번호: 1로부터의 88-89 (VV)로의 치환; 서열 번호: 2의 91-92 (SR)의, 서열 번호: 1로부터의 91-92 (EP)로의 치환; 서열 번호: 2의 96-97 (NT)의, 서열 번호: 1로부터의 96-97 (NS)로의 치환; 서열 번호: 2의 101 (Q)의, 서열 번호: 1로부터의 101 (R)로의 치환; 서열 번호: 2의 103 (A)의, 서열 번호: 1로부터의 103 (L)로의 치환; 서열 번호: 2의 105 (L)의, 서열 번호: 1로부터의 105 (V)로의 치환; 서열 번호: 2의 107-110 (KEKL)의, 서열 번호: 1로부터의 107-110 (RPDQ)로의 치환; 서열 번호: 2의 113-116 (VKRS)의, 서열 번호: 1로부터의 113-116 (AVDS)로의 치환; 서열 번호: 2의 118 (H)의, 서열 번호: 1로부터의 118 (Y)로의 치환; 서열 번호: 2의 120 (H)의, 서열 번호: 1로부터의 120 (D)로의 치환; 서열 번호: 2의 122-127 (YQDGDA)의, 서열 번호: 1로부터의 122-128 (GCEPCGN)로의 치환; 서열 번호: 2의 129 (V)의, 서열 번호: 1로부터의 130 (T)로의 치환; 서열 번호: 2의 131 (S)의, 서열 번호: 1로부터의 132 (N)로의 치환; 서열 번호: 2의 135-136 (FV)의, 서열 번호: 1로부터의 136-137 (AIV)로의 치환; 서열 번호: 2의 138 (W)의, 서열 번호: 1로부터의 139 (R)로의 치환; 서열 번호: 2의 140-143 (QSPH)의, 서열 번호: 1로부터의 141-144 (FSRF)로의 치환; 서열 번호: 2의 145-148 (AVKD)의, 서열 번호: 1로부터의 146-149 (EVRE)로의 치환; 서열 번호: 2의 150 (V)의, 서열 번호: 1로부터의 151 (A)로의 치환; 서열 번호: 2의 152 (I)의, 서열 번호: 1로부터의 153 (V)로의 치환; 서열 번호: 2의 156-157 (TT)의, 서열 번호: 1로부터의 157-158 (AA)로의 치환; 서열 번호: 2의 159-161 (ETS)의, 서열 번호: 1로부터의 160-162 (GDA)로의 치환; 서열 번호: 2의 163 (K)의, 서열 번호: 1로부터의 164 (A)로의 치환; 서열 번호: 2의 167 (E)의, 서열 번호: 1로부터의 168 (A)로의 치환; 서열 번호: 2의 169-170 (VE)의, 서열 번호: 1로부터의 170-171 (YD)로의 치환; 서열 번호: 2의 173 (T)의, 서열 번호: 1로부터의 174 (L)로의 치환; 서열 번호: 2의 176-178 (KHR)의, 서열 번호: 1로부터의 177-179 (QEK)로의 치환; 서열 번호: 2의 180-181 (KA)의, 서열 번호: 1로부터의 181-182 (GL)로의 치환; 서열 번호: 2의 183-186 (NFIF)의, 서열 번호: 1로부터의 184-187 (DVML)로의 치환; 서열 번호: 2의 198-201 (PKKA)의, 서열 번호: 1로부터의 199-202 (RPSQ)로의 치환; 서열 번호: 2의 203-204 (KN)의, 서열 번호: 1로부터의 204-205 (SS)로의 치환; 서열 번호: 2의 208 (R)의, 서열 번호: 1로부터의 209 (W)로의 치환; 서열 번호: 2의 210 (D)의, 서열 번호: 1로부터의 211 (S)로의 치환; 서열 번호: 2의 212 (R)의, 서열 번호: 1로부터의 213 (T)로의 치환; 서열 번호: 2의 214 (V)의, 서열 번호: 1로부터의 215 (Q)로의 치환; 서열 번호: 2의 218 (G)의, 서열 번호: 1로부터의 219 (P)로의 치환; 서열 번호: 2의 220-221 (QE)의, 서열 번호: 1로부터의 221-222 (SA)로의 치환; 서열 번호: 2의 225-228 (VKKS)의, 서열 번호: 1로부터의 226-228 (ATP)로의 치환; 서열 번호: 2의 230 (N)의, 서열 번호: 1로부터의 230 (H)로의 치환; 서열 번호: 2의 238-240 (LRG)의, 서열 번호: 1로부터의 238-240 (VAG)로의 치환; 서열 번호: 2의 241-246 (QEIVSS)의, 서열 번호: 1로부터의 241-246 (MLLRGA)로의 치환; 서열 번호: 2의 250 (K)의, 서열 번호: 1로부터의 250 (D)로의 치환; 서열 번호: 2의 252-254 (NSV)의, 서열 번호: 1로부터의 252-254 (ALP)로의 치환; 서열 번호: 2의 256 (D)의, 서열 번호: 1로부터의 256 (N)로의 치환; 서열 번호: 2의 259-260 (KA)의, 서열 번호: 1로부터의 259-260 (AA)로의 치환; 서열 번호: 2의 262 (K)의, 서열 번호: 1로부터의 262 (G)로의 치환; 서열 번호: 2의 264-267 (TEEE)의, 서열 번호: 1로부터의 264-267 (SDQL)로의 치환; 서열 번호: 2의 269-271 (LDV)의, 서열 번호: 1로부터의 269-271 (QAI)로의 치환; 서열 번호: 2의 275 (F)의, 서열 번호: 1로부터의 275 (Y)로의 치환; 서열 번호: 2의 279-280 (FK)의, 서열 번호: 1로부터의 279-280 (VM)로의 치환; 및 서열 번호: 2의 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)의, 서열 번호: 1로부터의 282 (K)로의 치환.

[0046] D1로부터의 이들 빌딩 블록 치환은 하기 돌연변이 중 하나 이상을 특징으로 하는 D1L3의 변이형을 제공한다: M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F_136VdelinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156_T157delinsAA, E159_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169_E170delinsYD, T173L, K176_R178delinsQEK, K180_A181delinsGL, N183_F186delinsDVML, P198_A201delinsRPSQ, K203_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220_E221delinsSA, V225_S228delinsATP, N230H, L238_R239delinsVA, Q241_S246delinsMLLRGA, K250D, N252_V254delinsALP, D256N, K259_A260delinsAA, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM, Q282_S305delinsK.

[0047] 용어 "delins"는, 결실 자리에서의 아미노산 또는 아미노산의 서열의 삽입을 갖는, 2개의 지시된 아미노산을 포함한 이들 사이의 결실을 지칭한다. 예를 들어, 표기 E91_P92delinsSR은, E91 내지 P92의 아미노산이 결실되고 아미노산 SR이 결실 자리에 삽입됨을 의미한다 (예: 생성된 아미노산 서열은 S91 및 R92를 가질 것임).

[0048] 용어 "ins"는 2개의 지시된 아미노산 사이의 아미노산의 삽입을 지칭한다. 예를 들어, 표기 E91_P92insSR은, 아미노산 SR이 E91과 P92 사이에 삽입되어, 서열 E91, S92, R93, 및 P94를 형성함을 의미한다.

[0049] 하나의 효소에서의 다중 돌연변이는 "/"로 분리되고, 예를 들어, T227K/A136F 또는 R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE이다.

[0050] 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 하나 이상의 인접 빌딩 블록 치환을 포함한다. 예를 들어, D1L3 변이형은 서열 번호: 2에 대하여 돌연변이 F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (서열 번호: 17)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 서열 번호: 2에 대하여 돌연변이 Q36_I45delinsMSNATLVSYI (서열 번호: 19)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 서열 번호: 2에 대하여 돌연변이 Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (서열 번호: 20)을 포함할 수 있다.

[0051] 예시적 구현예에서, D1L3 변이형은 서열 번호: 2에 대한 하기 돌연변이로부터 선택된 2 또는 3개 치환을 포함한다: Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N, F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK.

[0052] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하며, 서열 번호: 1의 아미노산 서열로부터의 적어도 하나의 빌딩 블록 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 DNase 효소를 제공한다. 서열 번호: 1과 2 사이의 빌딩 블록 치환은 도 31에 나타나 있고 번호부여되어 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 효소는 돌연변이 F275Y/F279_K280delinsVM/ Q282_S305delinsK를 포함하고, 또한 이는 임의로 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 효소는 돌연변이 Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, 또는 S131N을 포함하고, 임의로 서열 번호: 19 또는 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 갖는다.

[0053] 예시적 D1L3 변이형은 서열 번호: 17 내지 20의 아미노산 서열을 포함하는 것들을 포함한다. 본 발명은 일부 구현예에서, 서열 번호: 17 내지 20 중 임의의 하나에 대한 1 내지 10 (예: 1 내지 5)개의 아미노산 삽입, 결실, 또는 치환을 갖는 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 상동 DNase로부터의 (예: D1로부터의) 하나 이상의 부가적 블록 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 블록 치환은 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 아미노산을 대체할 수 있다. 일부 구현예에서, 블록 치환은 2 내지 20개의 아미노산, 예컨대 3 내지 15개의 아미노산, 또는 3 내지 10개의 아미노산을, 상동 DNase로부터의 유사한 빌딩 블록으로 대체한다.

[0054] D1L3 단백질의 엔지니어링된 변이형은 인간 D1L3의 아미노산 서열 (서열 번호: 2)에서의 하나 이상의 부가적 아미노산 치환, 부가 (삽입), 결실, 또는 절단을 포함할 수 있다. 아미노산 치환은 보존적 및/또는 비보존적 치환을 포함할 수 있다.

[0055] 예를 들어, "보존적 치환"은, 예를 들어, 관여된 아미노산 잔기의 극성, 전하, 크기, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양친매성 성질에서의 유사성에 기초하여 이루어질 수 있다. 20개의 자연 발생 아미노산은 하기 6개의 표준 아미노산 그룹으로 그룹화될 수 있다: (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. "보존적 치환"은 상기에 나타낸 6개의 표준 아미노산 그룹의 동일한 그룹 내에 열거된 또 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교환으로서 정의된다. 예를 들어, Glu에 의한 Asp의 교환은 이와 같이 변형된 폴리펩티드에서 하나의 음 전하를 보유한다. 추가로, 글리신 및 프롤린은 α-나선을 파괴하는 이들의 능력에 기초하여 서로에 대해 치환될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "비보존적 치환"은 상기에 나타낸 6개의 표준 아미노산 그룹 (1) 내지 (6)의 상이한 그룹에 열거된 또 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교환으로서 정의된다.

[0056] 일부 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은, 알부민, 트랜스페린, Fc, 또는 엘라스틴-유사 단백질과 같은, 반감기 연장 모이어티에 대한 N-말단 또는 C-말단 융합을 포함한다. 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 US 9,458,218을 참조한다. 일부 구현예에서, D1L3은 면역글로불린 힌지 영역에 의해 이량체화된다. 예를 들어, 본원에 기재된 엔지니어링된 효소는 또한 Fc-융합 도메인 (예: 면역글로불린의 힌지 및 CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 엔지니어링된 D1L3 단백질은 알부민, 예를 들어, 인간 알부민 또는 그의 단편에 융합된다. 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO 2015/066550; US 9,221,896을 참조한다. 알부민은 엔지니어링된 D1 단백질의 N-말단 또는 C-말단에서 연결될 수 있고, 이는 임의로 아미노산 링커를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, D1L3 및 D1은 Fc 힌지 영역에 의해 함께 이량체화되어, NET 분해에 대한 상승적 기능적 특성을 갖는 이량체 분자를 생성한다.

[0057] 일부 구현예에서, 재조합 D1L3 단백질 변이형은, 하나 이상의 위치 또는 C-말단에서 컨쥬게이션될 수 있는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 그 위치에서 네이티브 아미노산은, 펩티드에 대한 친수성 모이어티의 연결을 용이하게 하기 위해, 친수성 모이어티와의 가교에 적합한 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환된다. 다른 구현예에서, 친수성 기를 포함하도록 변형된 아미노산이 C-말단에서 펩티드에 부가된다. PEG 사슬(들)은 약 500 내지 약 40,000 달톤 범위의 분자량을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 사슬(들)은 약 500 내지 약 5,000 달톤 범위의 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, PEG 사슬(들)은 약 10,000 내지 약 20,000 달톤의 분자량을 갖는다.

[0058] 다양한 구현예에서, D1L3 단백질 변이형은, 야생형 D1L3 단백질에 비해 증가된 단백질 안정성, 증가된 혈청 유용성, 및 실질적으로 동일한 또는 보다 우수한 NET-분해 활성 (시험관내 또는 생체내에서 측정)을 갖는다. 다양한 구현예에서, D1L3 변이형은 야생형 D1L3에 대하여 하기 특성 중 하나 이상을 포함한다: 보다 높은 무단백질 DNA (네이크드 DNA) 분해 활성, 동일한 또는 실질적으로 동일한 (예: 적어도 50%) 염색체 DNA 분해 활성, 프로테아제 저항성, 증가된 반감기, 및 시험관내 발현 시스템 (예: 차이니즈 햄스터 난소 세포 및/또는 피키아 파스토리스)에서의 보다 높은 생성 수준.

[0059] DNA 단편화는 겔 전기이동 및 DNase 활성 검정과 같은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. NET, NET 분해, 및 DNA 단편화 활성의 정량화 방법은, 예를 들어, 하기 문헌에 기재되어 있다: Hakkim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2010, 107(21):9813-9818; Napirei et al. *Biochem J*, 2005, 389: 355-364. Fuchs et al., *J Cell Biol*, 2007, 176(2):231-241, Sisirak et al. *Cell*, 2016, 166:88-101, and Jimιnez-Alcαzar et al. *J Thromb* Haemost, 2015, 13, 732-742.

[0060] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 대상체에서의 NET 축적을 감소시키거나 예방하기 위해, 치료용으로 보다 적합한 물리적, 약역학적, 및/또는 효소적 특성을 갖도록 엔지니어링된 DNase1 (D1) 변이형을 제공한다. 일부 구현예에서, 변이형은 재조합 발현에 보다 적합하고, 이로써 상당한 제조 이점을 제공한다. 다양한 구현예에서, 엔지니어링된 D1 변이형은, 돌연변이된 DNA 결합 자리, 크로마틴 결합 자리의 부가, 돌연변이된 액틴 결합 자리, 글리코실화 자리의 돌연변이, 국소화 신호의 부가 (예: D1L3의 NLS1 또는 NLS2와 유사성 또는 동일성을 가짐), 및/또는 D1L3의 C-말단 테일과 유사한 C-말단 도메인 중 하나 이상을 제공하는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가, 또는 결실을 갖는, 서열 번호: 1의 아미노산 서열에 의해 정의된 성숙 효소와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. D1 변이형은, 본원에 기재된 바와 같은 서열 번호: 1에 대한 하나 이상의 아미노산 변형을 갖는, 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, D1L3 변이형은 서열 번호: 1의 효소와 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0061] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 인간 D1의 아미노산 서열 (서열 번호: 1)에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 부가, 결실, 또는 절단을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 기재된 바와 같은 보존적 및/또는 비보존적 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, D1 변이형은 서열 번호: 1의 효소에 대한 1 내지 20 (또는 1 내지 10, 또는 1 내지 5)개의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입을 가질 수 있다.

[0062] 일부 구현예에서, D1 변이형은 상동 DNase로부터의 (예: D1L3으로부터의) 하나 이상의 부가적 블록 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 블록 치환은 각각 상동 DNase로부터의 1 내지 24개의 아미노산, 예컨대 3 내지 15개의 아미노산, 또는 3 내지 10개의 아미노산을 대체할 수 있다. 일부 구현예에서, D1 변이형은 상동 DNase (예: D1L3)로부터의 2 내지 5개의 블록 치환을 포함한다. 일부 구현예에서 2 또는 3개의 근접 빌딩 블록 치환이 전달된다.

[0063] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 야생형 효소에 대하여 하기 특징 중 하나 이상을 포함하도록 엔지니어링된다: 실질적으로 동일한 또는 보다 높은 무단백질 DNA (네이크드 DNA) 분해 활성 (예: 적어도 50% 또는 그 초과), 보다 높은 염색체 DNA 분해 활성, 유사한 또는 향상된 프로테아제 저항성, 액틴 저항성, 증가된 혈청 반감기, 혈액으로부터 소변 또는 담즙으로의 개선된 침투, 또는 이러한 특성의 조합.

[0064] 일부 구현예에서, 엔지니어링된 D1 효소는 야생형 D1L3 단백질의 C-말단 도메인 (예: 서열 번호: 2의 아미노산 283 내지 305)과 적어도 50% (또는 적어도 70%, 80%, 90%) 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, D1 효소는 야생형 D1L3의 NLS1 (서열 번호: 2의 아미노산 35 내지 51)과 적어도 50% 또는 적어도 75% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 야생형 D1L3 단백질의 NLS2 (서열 번호: 2의 아미노산 296 내지 304)와 실질적인 서열 동일성을 갖는 핵 국소화 신호 2 (NLS2)를 포함한다.

[0066] 다양한 양태에서, 재조합 D1 변이형은 하기로부터 선택된 하나 이상의 빌딩 블록 치환을 포함한다: 서열 번호: 1로부터의 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS)의, 서열 번호: 2로부터의 1-20 (MSRELAPLLL LLLSIHSALA)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 23-27 (LKIAA)의, 서열 번호: 2로부터의 21-25 (MRICS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 30-32 (IQT)의, 서열 번호: 2로부터의 28-30 (VRS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 35-36 (ET)의, 서열 번호: 2로부터의 33-34 (ES)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 38-47 (MSNATLVSYI)의, 서열 번호: 2로부터의 36-45 (QEDKNAMDVI)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 49-52 (QILS)의, 서열 번호: 2로부터의 47-50 (KVIK)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 54 (Y)의, 서열 번호: 2로부터의 52 (C)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 56-60 (IALV Q)의, 서열 번호: 2로부터의 54-58 (IILVM)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 62-63 (VR)의, 서열 번호: 2로부터의 60-61 (IK)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 65-72 (SHLTAVGK)의, 서열 번호: 2로부터의 63-70 (SNNRICPI)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 74-76 (LDN)의, 서열 번호: 2로부터의 72-74 (MEK)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 79-84 (QDAPDT)의, 서열 번호: 2로부터의 77-84 (RNSRRGIT)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 86 (H)의, 서열 번호: 2로부터의 86 (N)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 88-89 (VV)의, 서열 번호: 2로부터의 88-89 (VI)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 91-92 (EP)의, 서열 번호: 2로부터의 91-92 (SR)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 96-97 (NS)의, 서열 번호: 2로부터의 96-97 (NT)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 101 (R)의, 서열 번호: 2로부터의 101 (Q)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 103 (L)의, 서열 번호: 2로부터의 103 (A)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 105 (V)의, 서열 번호: 2로부터의 105 (L)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 107-110 (RPDQ)의, 서열 번호: 2로부터의 107-110 (KEKL)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 113-116 (AVDS)의, 서열 번호: 2로부터의 113-116 (VKRS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 118 (Y)의, 서열 번호: 2로부터의 118 (H)로의 치환, 서열 번호: 1로부터의 120 (D)의, 서열 번호: 2로부터의 120 (H)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 122-128 (GCEPCGN)의, 서열 번호: 2로부터의 122-127 (YQDGDA)로의 치환, 서열 번호: 1로부터의 130 (TF)의, 서열 번호: 2로부터의 129 (V)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 132 (N)의, 서열 번호: 2로부터의 131 (S)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 136-137 (AI)의, 서열 번호: 2로부터의 135-136 (FV)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 139 (R)의, 서열 번호: 2로부터의 138 (W)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 141-144 (FSRF)의, 서열 번호: 2로부터의 140-143 (QSPH)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 146-149 (EVRE)의, 서열 번호: 2로부터의 145-148 (AVKD)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 151 (A)의, 서열 번호: 2로부터의 150 (V)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의153 (V)의, 서열 번호: 2로부터의 152 (I)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 157-158 (AA)의, 서열 번호: 2로부터의 156-157 (TT)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 160-162 (GDA)의, 서열 번호: 2로부터의 159-161 (ETS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 164 (A)의, 서열 번호: 2로부터의 163 (K)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 168 (A)의, 서열 번호: 2로부터의 167 (E)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 170-171 (YD)의, 서열 번호: 2로부터의 169-171 (VE)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 174 (L)의, 서열 번호: 2로부터의 173 (T)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 177-179 (QEK)의, 서열 번호: 2로부터의 176-178 (KHR)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 181-182 (GL)의, 서열 번호: 2로부터의 180-181 (KA)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 184-187 (DVML)의, 서열 번호: 2로부터의 183-187 (NFIF)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 199-202 (RPSQ)의, 서열 번호: 2로부터의 198-201 (PKKA)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 204-205 (SS)의, 서열 번호: 2로부터의 203-204 (KN)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 209 (W)의, 서열 번호: 2로부터의 208 (R)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 211 (S)의, 서열 번호: 2로부터의 210 (D)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 213 (T)의, 서열 번호: 2로부터의 212 (R)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 215 (Q)의, 서열 번호: 2로부터의 214 (V)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 219 (P)의, 서열 번호: 2로부터의 218 (G)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 221-222 (SA)의, 서열 번호: 2로부터의 220-221 (QE)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 226-228 (ATP)의, 서열 번호: 2로부터의 225-228 (VKKS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 230 (H)의, 서열 번호: 2로부터의 230(N)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 238-239 (VA)의, 서열 번호: 2로부터의 238-239 (LR)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 241-246 (MLLRGA)의, 서열 번호: 2로부터의 241-246 (QEIVSS)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 250-251 (D)의, 서열 번호: 2로부터의 250-251 (K)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 252-254 (ALP)의, 서열 번호: 2로부터의 252-254 (NSV)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 256 (N)의, 서열 번호: 2로부터의 256 (D)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 259-260 (AA)의, 서열 번호: 2로부터의 259-260 (KA)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 262 (G)의, 서열 번호: 2로부터의 262 (K)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 264-267 (SDQ)의, 서열 번호: 2로부터의 264-267 (TEEE)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 269-271 (QAI)의, 서열 번호: 2로부터의 269-271 (LDV)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 275 (Y)의, 서열 번호: 2로부터의 275 (F)로의 치환; 서열 번호: 1로부터의 279-280 (VM)의, 서열 번호: 2로부터의 279-280 (FK)로의 치환; 및 서열 번호: 1로부터의 282 (K)의, 서열 번호: 2로부터의 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)로의 치환.

[0067] D1L3으로부터의 이들 빌딩 블록 치환은 하기 돌연변이 중 하나 이상을 특징으로 하는 D1의 변이형을 제공한다: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136_I137delinsFV, R139W, F141_F144delinsQSPH, E146_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157_A158delinsTT, G160_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170_D171delinsVE, L174T, Q177_K179delinsKHR, G181_L182delinsKA, D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA, S204_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N, V238_A239delinsLR, M241_A246delinsQEIVSS, D250K, A252_P254delinsNSV, N256D, A259_A260delinsKA, G262K, S264_L267delinsTEEE, Q269_I271delinsLDV, Y275F, V279_M280delinsFK, K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

[0068] 일부 구현예에서, 재조합 D1 변이형은 서열 번호: 1에 대한 하기 변형을 포함한다: Y275F, V279_M280delinsFK, 및 K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (서열 번호: 16). 이러한 변이형은 C-말단 테일을 포함하고, DNA-지질 복합체에 대한 보다 높은 친화도를 나타낸다.

[0069] 일부 구현예에서, 재조합 D1 변이형은 서열 번호: 1에 대한 하기 아미노산 변형을 포함한다: Q79_T84delinsRNSRRGIT (예: 서열 번호: 10); H86N, 및/또는, V88_V89delinsVI, 및/또는 E91_P92delinsSR (예: 서열 번호: 11, 이는 3개 모두를 포함함); A136_I137delinsFV (예: 서열 번호: 12); R199_Q202delinsPKKA, 및/또는 S204_S205delinsKN, 및/또는 W209R, 및/또는 S211D, 및/또는 T213R, 및/또는 Q215V, 및/또는 P219G, 및/또는 S221_A222delinsQE (예: 서열 번호: 13, 이는 8개 모두를 포함함); 및 A226_P228delinsVKKS (예: 서열 번호: 14).

[0070] 일부 구현예에서, D1 변이형이 치환 H86N을 포함하는 경우, 변이형은 적어도 하나의 부가 변형, 예컨대 본원에 기재된 빌딩 블록 치환 또는 다른 점 돌연변이 (예컨대 양이온성 아미노산의 부가 또는 액틴에 대한 저항성을 제공하는 치환)를 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, D1 변이형은 하기의 서열 번호: 1에 대한 돌연변이를 제공하는 적어도 2개의 인접, 근접, 빌딩 블록 치환을 포함한다: H86N/V88_V89delinsVI (예: 서열 번호: 11); R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE (예: 서열 번호: 13); Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (서열 번호: 16).

[0072] 일부 구현예에서, 본 발명은, 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하며, 서열 번호: 2의 아미노산 서열로부터의 적어도 하나의 빌딩 블록 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 DNase 효소를 제공하고, 여기서 DNase 효소는 서열 번호: 1의 DNase 효소에 비해 증가된 크로마틴-분해 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 2로부터의 적어도 2개의 인접 빌딩 블록 치환을 포함한다. D1 (서열 번호: 1)과 D1L3 (서열 번호: 2) 사이의 빌딩 블록 치환은 도 31에 나타나 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형을 포함하고: Q79_T84delinsRNSRRGIT, 임의로 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형을 포함하고: H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR, 임의로 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형을 포함하고: A136_I137delinsFV, 임의로 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형 중 2개 이상을 포함하고: R199_Q202delinsPKKA, 및/또는 S204_S205delinsKN, 및/또는 W209R, 및/또는 S211D, 및/또는 T213R, 및/또는 Q215V, 및/또는 P219G, 및/또는 S221_A222delinsQE, 임의로 서열 번호: 13 (이는 8개 모두를 포함함)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형을 포함하고: A226_P228delinsVKKS, 임의로 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함한다.

[0078] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 하기 변형 중 2개 이상을 포함하고: Q79_T84delinsRNSRRGIT, 및/또는 H86N, 및/또는 V88_V89delinsVI, 및/또는 E91_P92delinsSR, 및/또는 A136_I137delinsFV, 및/또는

R199_Q202delinsPKKA, 및/또는 S204_S205delinsKN, 및/또는 W209R, 및/또는 S211D, 및/또는 T213R, 및/또는 Q215V, 및/또는 P219G, 및/또는 S221_A222delinsQE, 및/또는 A226_P228delinsVKKS, 임의로 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 1에 대한 2개 이상의 하기 변형을 포함하고: Y275F, 및/또는 V279_M280delinsFK, 및/또는 K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS, 임의로 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0080] 예시적 D1 변이형은 서열 번호:5, 서열 번호:6, 서열 번호:7, 서열 번호:8, 서열 번호:9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 및 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 것들을 포함한다. 본 발명은 일부 구현예에서, 서열 번호: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 중 임의의 하나에 대한 1 내지 10 (예: 1 내지 5)개의 아미노산 삽입, 결실, 또는 치환을 갖는 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, D1 변이형은 상동 DNase로부터의 (예: D1L3로부터의) 하나 이상의 부가적 블록 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 블록 치환은, D1 변이형의 2 내지 20개의 아미노산, 예컨대 3 내지 15개의 아미노산, 또는 3 내지 10개의 아미노산을, 상동 DNase (예: D1L3, 서열 번호: 2)로부터의 빌딩 블록 아미노산으로 대체할 수 있다. D1과 D1L3 사이의 빌딩 블록 치환은 도 31에 나타나 있다. 일부 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 15와 적어도 95% 또는 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0081] 다양한 구현예에서, 효소는 하기로부터 선택된 하나 이상의 특성을 나타낸다: 서열 번호: 1의 효소에 비해 유사한 또는 보다 높은 무단백질 DNA에 대한 친화도, 서열 번호: 1의 효소에 비해 보다 높은 크로마틴 분해 활성, 서열 번호: 1의 효소에 비해 액틴에 의한 억제에 대해 저항성인 효소 활성, 및 이들의 조합.

[0082] 일부 구현예에서, D1 변이형은, D1L3에 대해 기재된 바와 같이, 알부민, 트랜스페린, Fc, 또는 엘라스틴-유사 단백질과 같은, 반감기 연장 모이어티로의 N-말단 또는 C-말단 융합을 포함한다. 일부 구현예에서, D1 효소는 면역글로불린 힌지 영역에 의해 이량체화된다.

[0083] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 하기로부터 선택된 하나 이상의 특성을 나타낸다: 동일한 또는 보다 높은 무단백질 DNA (네이크드 DNA) 분해 활성, 보다 높은 염색체 DNA (크로마틴) 분해 활성, 유사한 또는 향상된 프로테아제 저항성, 액틴 저항성, 혈액으로부터 소변 및/또는 담즙으로의 유사한 또는 향상된 침투, 및 시험관내 발현 시스템 (예: 차이니즈 햄스터 난소 세포 및/또는 피키아 파스토리스)에서의 보다 높은 생성 수준, 및 이들의 조합.

[0084] 다양한 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하며, 하나 이상의 아르기닌 및/또는 리신 잔기의 치환, 삽입, 또는 부가를 포함하고, 여기서 DNase 효소는 서열 번호: 1의 효소에 비해 증가된 크로마틴-분해 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아르기닌 및/또는 리신 잔기는 서열 번호: 1의 위치 31, 41, 49, 52, 68, 76, 79, 81, 92, 109, 114, 115, 164, 177, 181, 200, 201, 204, 209, 213, 227, 239, 250, 259, 262, 및 280에 상응하는 위치에서의 치환으로부터 선택된 아미노산 치환이다. 이들 위치에서의 예시적 변형은 Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K, 및 K280M을 포함한다. 다양한 구현예에서, 효소는 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 아르기닌 및/또는 리신 잔기의 치환 및/또는 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, DNase 효소는, 임의로 Q31R, Q49R, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, W209R, 및 G262K로부터 선택된, 서열 번호: 1의 위치 31, 49, 76, 79, 92, 109, 164, 177, 200, 201, 204, 209, 213, 및 262에 상응하는 하나 이상의 위치에서의 아르기닌 또는 리신을 포함한다. 이들 위치/치환은 독립적으로, 크로마틴 분해에 대한 활성을 포함한, 보다 우수한 활성을 제공할 수 있다.

[0085] 다양한 구현예에서, 효소가 Q31R 또는 T227K의 치환을 포함하는 경우, 효소는 Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K, 및 K280M으로부터 선택된 적어도 2개의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 서열 번호: 1에 대한 Q31R 및 T227K를 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1의 위치 31, 49, 79, 및 209에 상응하는 위치에서의 아르기닌 또는 리신을 갖고, 임의로 하기 아미노산 치환을 포함할 수 있다: Q31R, Q49K, Q79R, 및 W209R. 이들 위치는 뮤린 D1에서 아르기닌 또는 리신을 보유하지만, 야생형 인간 D1에서는 그렇지 않고, 크로마틴-분해 활성을 인간 D1에게

전달할 수 있다.

[0087] 일부 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1의 위치 31, 49, 79, 177, 209, 및 262에 상응하는 위치에서의 아르기닌 또는 리신을 갖고, 임의로 아미노산 치환 Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K를 포함할 수 있다. 4개의 이들 위치는 래트 D1에서 아르기닌 또는 리신을 보유하지만, 야생형 인간 D1에서는 그렇지 않고, 함께 크로마틴 분해 활성을 인간 D1에게 전달할 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1의 위치 31 및 227에 상응하는 위치에서의 리신 또는 아르기닌을 갖는다.

[0089] 일부 구현예에서, DNase 효소는, 임의로 리신 (A164K)인, 서열 번호: 1의 위치 164에 상응하는 위치에서의 리신 또는 아르기닌을 갖는다.

[0090] 다양한 구현예에서, 엔지니어링된 D1 단백질은 액틴 결합 자리에서 하나 이상의 아미노산 변형 (예: 치환, 부가, 및 결실) (예: A136의 치환, 예컨대 A136F)을 함유하고, 이로써 액틴 결합을 저해하거나 막는다. 이와 같이, 엔지니어링된 D1 단백질은 액틴-저항성 또는 실질적으로 액틴-저항성일 수 있다. 문헌 [Ulmer et al., *PNAS USA* Vol. 93, pp 8225-8229 (1996)]을 참조한다. 따라서, 다양한 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1에 대한 위치 136에서의 아미노산 치환을 포함하고, 이는 임의로 A136F이다. 액틴 저항성을 제공하는 D1에 대한 돌연변이, 예컨대 위치 136에서의 돌연변이 (예: A136F, 또는 이 위치에서의 또 다른 벌키, 소수성, 시클릭 또는 방향족 아미노산의 치환)는, 양이온 잔기의 부가 또는 빌딩 블록 치환을 포함한 본원에 기재된 임의의 다른 돌연변이와 조합될 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, D1 변이형은 액틴-억제에 대해 저항성이고 크로마틴을 분해할 수 있다. 예를 들어, D1 변이형은 하기 아미노산 치환을 포함할 수 있다: 서열 번호: 1에 대한 Q31R, T227K, 및 A136F. 일부 구현예에서, DNase 효소는 하기 아미노산 치환을 포함한다: A164K 및 A136F.

[0092] 일부 구현예에서, DNase 효소는 서열 번호: 1에 대한 N40S 치환 및/또는 N128S 치환을 포함하는 글리코실화 공통 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서 효소는 하기 아미노산 치환을 포함한다: 서열 번호: 1에 대한 Q31R, N40S, A136F, N128S, 및 T227K.

[0093] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 글리코실화 자리에서 하나 이상의 아미노산 변형 (예: 치환, 부가, 삽입, 및 결실)을 함유하고, 이로써 지질 캡슐화된 DNA에 대한 친화도가 증가된다. 이와 같이, 엔지니어링된 D1 단백질은 트랜스펙션 반응에서 지질 캡슐화된 DNA를 분해할 수 있다. 문헌 [Wilber et al., *Mol Ther* 6, 35-42 (2002)]을 참조한다.

[0094] 다양한 구현예에서, D1 변이형은 글리코실화되거나, 또는 특히 긴 순환 반감기가 필요하지 않은 경우에는 비-글리코실화될 수 있다. 본원에 기재된 아미노산 변경은 글리코실화된 또는 비-글리코실화된 변이형과 관련하여 이루어질 수 있다.

[0095] 일부 구현예에서, D1 변이형은 액틴-억제에 대해 저항성이고 지질 소포 내에서 크로마틴을 분해할 수 있다. 예시적 D1 변이형은 하기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고: Q31R, T227K, A136F, N40D 또는 N40A, 및 N128D 또는 N128S, 여기서 아미노산은 서열 번호: 1에 따라 번호부여된다. 이러한 변이형은 글리코실화 자리를 갖지 않을 수 있고, 이는 제조 관점에서 유리하다.

[0096] 일부 구현예에서, D1 변이형은 액틴-억제에 대해 저항성이고 지질 소포 내에서 크로마틴을 분해할 수 있고, 서열 번호: 1에 대한 아미노산 변형 Q31R, T227K, A136F, N40D, 및 N128D를 포함한다.

[0097] D1에 대한 다른 변형은 문헌 [Pan et al. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11701-11708] 및 US 2014/0199329에 기재된 바와 같을 수 있고, 그 전체 개시내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0098] 엔지니어링된 D1 변이형은 야생형 D1 단백질 (서열 번호: 1)에 비해 증가된 또는 연장된 혈청 반감기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 엔지니어링된 D1은 Fc-융합 도메인 (예: 면역글로불린의 힌지 영역, 및/또는 및 CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함한다. 일부 구현예에서, 엔지니어링된 D1은 알부민, 예를 들어, 인간 알부민 또는 그의 단편에 융합된다. 알부민은, 임의로 아미노산 링커를 통해, 엔지니어링된 D1 효소의 N-말단 또는 C-말단에서 연결될 수 있다.

[0099] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 D1L3 및/또는 D1 변이형, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 다양한 구현예에서, 재조합 D1L3 단백질 변이

형은 비경구 또는 폐 투여를 위해 제제화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 관절내, 근육내, 국소 또는 피하 투여. 또는 본원에 기재된 다른 경로를 위해 제제화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 D1L3 및 D1 둘 다를 포함하고, 이들은 각각 본원에 기재된 임의로 엔지니어링된 변이형이다. 일부 구현예에서, 재조합 D1L3 변이형 및 재조합 D1 변이형은 비경구 또는 폐 투여를 위해 제제화된다.

[0100] 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 성분의 생물학적 활성의 유효성을 방해하지 않고 이것이 투여되는 환자에게 독성이 아닌 임의의 담체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 제약학적 담체의 예는 당업계에 널리 공지되어 있고 인산염 완충 식염수 용액, 물, 에멀젼, 예컨대 오일/물 에멀젼, 다양한 유형의 습윤제, 멸균액 등을 포함한다. 이러한 담체는 종래의 방법에 의해 제제화될 수 있고 적합한 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 멸균성이다. 이들 조성물은 아주반트, 예컨대 보존제, 유화제 및 분산제를 또한 함유할 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균 및 항진균제의 포함에 의해 보장될 수 있다.

[0101] 투여 경로는, 예를 들어: 피내, 근육내, 복강내, 관절내, 정맥내, 피하, 동맥내, 경구, 설하, 폐, 또는 경피를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여는 경구로 또는 비경구 주사 또는 주입에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 투여 경로는, 점안액 또는 구강 세척제를 포함한, 국소 경로이다.

[0102] 또한 다른 양태에서, 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 축적의 감소 또는 예방을 위한 제약 조성물의 제조 방법을 제공한다. 이들 구현예에서, 본 발명은, G-CSF 폴리뉴클레오티드의 이종 발현 (예: 간세포 세포에서) 또는 지속된 내인성 G-CSF 발현의 유도 (예: 미생물 화합물의 반복적 투여를 통함), 및 D1 및 D1L3 활성이 결핍된 유전자 변형된 마우스를 사용한다. 이 마우스 모델은 NET를 축적하고, NET-관련 혈관 폐색을 빠르게 발달시킨다. 이들 구현예에서, 본 발명은, 후보물질 NET 억제제 또는 후보물질 DNase 효소 (본 개시내용에 따른 D1L3 또는 D1 변이형 포함)를 유전자-변형 마우스에게 투여하고, NET의 축적을 감소시키는 NET 억제제 또는 DNase 효소를 선택하는 것을 포함한다. 선택된 억제제 또는 효소는 인간 환자로의 투여를 위해 (기재된 바와 같이) 제제화된다.

[0103] 당업자는 이중 녹아웃(knockout) *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase1l3*$^{-/-}$ 마우스를 생성하는 표준 방법을 인식한다. 상세한 설명은, 예를 들어, 유럽 출원 번호 EP 17152528.0에서 찾아볼 수 있다.

[0104] 일부 양태에서, 본 발명은 호중구 세포외 트랩 (NET) 분해를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 방법은, 치료 유효량의 본 개시내용에 따른 D1L3 및/또는 D1 (이는 본원에 기재된 변이형, 또는 일부 구현예에서는 D1L3 및 D1 조합 치료용을 포함한, 하나 이상의 야생형 효소를 포함할 수 있음)을 투여하는 것을 포함한다. D1L3 또는 D1은 재조합 단백질을 포함하는, 또는 일부 구현예에서는 코딩 DNA 또는 RNA 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0105] 일부 구현예에서, 방법은 치료 유효량의 D1L3 또는 그의 변이형 및 D1 또는 그의 변이형을 투여하는 것을 포함한다. D1L3 또는 그의 변이형, 및 D1 또는 그의 변이형은, 단일 제약 조성물 또는 별도의 제약 조성물로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, D1L3 또는 그의 변이형 대 D1 또는 그의 변이형의 비율은 100:1 내지 1:100 (질량 기준), 또는 10:1 내지 1:10 (질량 기준)의 범위이고, 임의로 약 1:1이다.

[0106] 일부 구현예에서, 대상체는 손상된 NET 분해를 나타내고/거나 병리적 NET 축적을 나타낸다. 일부 구현예에서, 대상체는 만성 또는 급성 염증성 장애를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 급성 또는 만성 감염을 갖는다.

[0107] 다양한 구현예에서, 본 발명은 NET의 존재 또는 축적을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료에 관한 것이다. 이러한 질환 또는 병태는 만성 호중구증가증 (예: 호중구 수의 증가), 호중구 응집 및 백혈구울혈과 관련된 질환, 혈전증 및 혈관 폐색 (예: 겸상 적혈구 질환), 허혈-재관류 손상 (예: 중장 염전, 고환 비틀림, 사지 허혈 재관류, 중요 기관 허혈-재관류, 기관 이식), 외과적 및 외상성 조직 손상, 급성 또는 만성 염증성 반응 또는 질환, 자가면역 질환 (예: 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 류마티스 관절염, 혈관염, 전신성 경화증), 심혈관 질환 (예: 심근 경색, 뇌졸중, 죽상경화증, 혈전용해 치료를 포함한 정맥 혈전색전증), 대사 질환 (예: 당뇨병), 전신성 염증 (예: 전신성 염증 반응 증후군 (SIRS), 패혈증, 패혈성 쇼크, 파종성 혈관내 응고 (DIC), 및 혈전성 미소혈관증 (TMA)), 호흡기의 염증성 질환 (예: 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 폐 손상 (ALI), 연기 유발 폐 손상, 수혈 유발 폐 손상 (TRALI), 급성 호흡 장애 증후군 (ARDS), 및 천식, 무기폐, 기관지염, 농흉), 신장 염증성 질환 (급성 신장 손상 (AKI) 및 만성 신장 질환 (CKD)을 포함한 급성 및 만성 신장 질환, 이식 조직 관련 염증성 질환 (예: 이식-대-숙주 질환) 및 암 (예: 백혈병, 종양 전이, 및 충실성 종양)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0108] 일부 구현예에서, 대상체는 도관 시스템을 폐색하는 NET를 갖거나 그의 위험이 있다. 본 발명은 췌장염,

담관염, 결막염, 유방염, 안구 건조 질환, 수정관의 폐색, 또는 신장 질환을 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 구현예에서, 방법은 치료 유효량의 D1L3 또는 그의 변이형, 및/또는 치료 유효량의 D1 또는 그의 변이형을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 대상체에게, 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 효소, 및 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 효소를 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열 및 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열을 포함한다.

[0109] 일부 구현예에서, 도관 시스템은 담관, 누관, 유관, 담낭관, 간관, 사정관, 이하선관, 악하선관, 주요 설하선관, 바르톨린관, 대뇌수도관, 췌장, 유선, 수정관, 수뇨관, 방광, 담낭, 및 간이다. 예를 들어, 대상체는 췌장염, 담관염 (예: 원발 경화 담관염), 결막염, 유방염, 안구 건조 질환, 수정관의 폐색, 또는 신장 질환을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, DNase 효소는 정맥내, 동맥내, 또는 복강내 투여에 의해 투여된다. 다양한 구현예에서, DNase는, 예를 들어 정맥내로 적용시, 담즙액에서와 같이, 다양한 도관 시스템에서 효소 활성 형태로 존재할 것이다.

[0110] 일부 구현예에서, 대상체는 내피 표면 (예: 수술 유착), 피부 (예: 상처/흉터) 상에, 또는 활막 관절 내에 (예: 통풍 및 관절염) 축적되는 NET를 갖거나 그의 위험이 있다. 본 발명은 수술 유착과 같은 (이에 제한되지는 않음) 내피 표면 상의 NET의 축적을 특징으로 하는 병태의 치료를 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 상처 및 흉터와 같은 (이에 제한되지는 않음) 피부 상의 NET의 축적을 특징으로 하는 병태의 치료를 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 통풍 및 관절염과 같은 (이에 제한되지는 않음) 활막 관절 내의 NET의 축적을 특징으로 하는 병태의 치료를 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0111] 일부 구현예에서, 대상체는 NET를 포함하는 혈관 폐색을 갖거나 그의 위험이 있다. 이러한 구현예에서, 방법은 치료 유효량의 D1L3 또는 그의 변이형, 및/또는 치료 유효량의 D1 또는 그의 변이형을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 대상체에게 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 효소를 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 효소는 서열 번호: 2에 의해 정의된 효소의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체에게 추가로, 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소와 같은, 서열 번호: 1에 의해 정의된 효소와 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 효소를 투여한다.

[0112] 일부 구현예에서, 대상체는, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO 2016/118476 및 US 9,642,822에 기재된 바와 같은 NET 관련 병태를 갖는다.

[0113] 다양한 구현예에서, 대상체는, D1 및 스트렙토도르나제를 포함한, 야생형 DNase로 치료되는 또는 치료된 질환을 갖는다. 이러한 질환 또는 병태는 혈전증, 뇌졸중, 패혈증, 폐 손상, 죽상경화증, 바이러스 감염, 겸상 적혈구 질환, 심근 경색, 귀 감염, 상처 치유, 간 손상, 심내막염, 간 감염, 췌장염, 일차 이식 장애, 사지 허혈 재관류, 신장 손상, 혈액 클롯팅, 알룸-유도 염증, 간신장 손상, 흉막 삼출, 혈흉증, 담관내 혈액 클롯, 후 공압 빈혈, 궤양, 이비인후과 병태, 경구 감염, 경미한 부상, 부비강염, 수술후 비성형, 불임, 방광 카테터, 상처 세정, 피부 반응 시험, 폐렴구균 수막염, 통풍, 족부 궤양, 낭포성 섬유증, 카르테게너 증후군, 천식, 엽성 무기폐, 만성 기관지염, 기관지확장증, 루푸스, 일차 섬모 이상운동증, 세기관지염, 농흉, 흉막 감염, 암, 안구 건조 질환, 하부 호흡기 감염, 만성 혈종, 알츠하이머병, 및 폐쇄성 폐 질환을 포함한다.

[0114] 특정 구현예에서, 본 발명은 D1의 결핍, D1L3의 결핍, 및 D1 및 D1L3의 결핍을 특징으로 하는 질환 또는 병태의 치료에 관한 것이다. 일부 경우에, 대상체는 *Dnase1* 및/또는 *Dnase113* 유전자에서의 돌연변이를 갖는다. 이러한 대상체는 또한 자가면역 질환 (예: SLE, 전신성 경화증) 또는 염증성 질환을 가질 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 D1 (예: 항-DNase1-항체 및 액틴) 및/또는 D1L3 (예: 항-DNase113-항체)의 획득된 억제제를 갖는다. 이러한 대상체는 또한 자가면역 질환 (예: SLE, 전신성 경화증) 또는 염증성 질환 (예: 패혈증 및 허혈-재관류 손상)을 가질 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 대상체는 낭포성 섬유증을 갖고, DNase 조성물은 폐 전달에 의해 투여된다.

[0116] 다양한 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 NET-관련 혈관 폐색의 증상의 위험이 있거나 이를 나타내는 경우, 단백질 또는 조성물 (예를 들어 D1L3, D1, 또는 D1L3 또는 D1의 변이형, 예컨대 본원에 기재된 변이형을 포함함)은 정맥내, 근육내, 피하, 또는 동맥내 투여될 수 있다.

[0117] 다양한 구현예에서, 대상체는 혈액, 혈장, 또는 혈청의 NET-분해 활성에 대해 모니터링된다. 예를 들어, 대상체는, NET에 의한 혈관 또는 도관 폐색, 또는 NET-관련 기관 손상의 위험을 감소시키기 위해, 약 1주 내지 약 4주 동안 모니터링될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는, 급성 감염 또는 염증 이벤트 동안 혈관내 NET 축적

(NET-관련 혈관내 폐색 포함)을 예방하거나 감소시키기 위해 필요에 따라, 1주 내지 1개월 (또는 1-2주) 동안에 걸쳐 1 내지 4회 투여를 수용할 수 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 1시간 내지 1개월 (또는 1-2주) 동안에 걸쳐 연속적 주입을 수용할 수 있다. 일부 경우에, 대상체는, 예를 들어 (비제한적으로), 패혈증, 뇌졸중, 또는 심근 경색과 같은 중요 질병의 경우, 매일 적어도 1회, 예를 들어, 1, 2, 3, 4회 또는 그 초과의 주입을 수용할 수 있다.

[0118] NET 관련 질환 또는 병태의 치료는 D1 변이형, D1L3 변이형, 또는 D1 변이형 및 D1L3 변이형을 포함하는 조합의 투여를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 D1 단백질의 변이형 중 둘 이상이 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 D1L3 단백질의 변이형 중 둘 이상이 투여된다.

[0119] 본 발명의 D1 단백질 변이형 및 D1L3 단백질 변이형은, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병 전과 같이, 예방적 치료로서 투여될 수 있다.

[0120] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "치료된"은, 목표가 원치않는 생리학적 상태, 장애 또는 질환을 둔화시키거나 (줄이거나), 유리한 또는 요망되는 임상적 결과를 얻는 것인, 치료적 치료를 지칭한다. 유리한 또는 요망되는 임상적 결과는, 증상의 경감; 병태, 장애 또는 질환의 정도의 감소; 병태, 장애 또는 질환의 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음); 병태, 장애 또는 질환의 발병의 지연 또는 진행의 둔화; 병태, 장애 또는 질환 상태의 개선; 및 차도 (부분적 또는 전체적) (검출가능함 또는 검출가능하지 않음), 또는 병태, 장애 또는 질환의 향상 또는 개선을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 치료는 과도한 수준의 부작용 없이 임상적으로 중요한 반응을 도출하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "치료된"은, 목표가 원치않는 생리학적 상태, 장애 또는 질환의 발병을 지연시키거나 중증도를 감소시키는 것인, 예컨대 대상이 질환에 취약한 사람 (예를 들어, 루푸스와 같은 질환에 대한 유전적 마커를 갖는 개인)인, 예방적 수단을 지칭한다.

[0121] 본 발명의 방법에서, 치료는 질환 또는 병태에 대한 긍정적 치료 반응을 제공하기 위해 사용된다. "긍정적 치료 반응"이란, 질환 또는 병태의 개선, 및/또는 질환 또는 병태와 관련된 증상의 개선으로 의도된다. 예를 들어, 긍정적 치료 반응은 질환의 하기 개선 중 하나 이상을 지칭할 것이다: (1) 호중구 세포외 트랩의 감소; (2) 혈관내 클롯의 감소; (3) 도관 클롯의 감소; (4) 활막 관절 내의 NET의 축적 감소; (5) 호중구 세포외 트랩의 분해 증가; (6) 세포외 무단백질 DNA의 분해 증가; (7) 세포외 염색체 DNA 또는 단백질-결합 DNA의 분해 증가; (8) 자가항체의 존재 하에 호중구 세포외 트랩의 분해 증가; (9) 조직/기관 염증의 감소; (10) 조직/기관 손상의 감소; (11) 조직/기관 위축의 감소; (12) 증가된 환자 생존율; 및 (13) 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상으로부터의 일부 경감.

[0122] 임의의 주어진 질환 또는 병태에서의 긍정적 치료 반응은 그 질환 또는 병태에 대해 특이적인 표준화된 반응 기준에 의해 결정될 수 있다. 스크리닝 기술, 예컨대 자기 공명 이미징 (MRI) 스캔, 초음파 스캔, 조직학, 및 순환에서의 NET의 카운팅을 사용하여 혈관 폐색의 변화 및 NET의 존재에 대한 임상 반응이 평가될 수 있다. 이들 긍정적 치료 반응에 추가로, 치료를 받는 대상체는 질환과 관련된 증상 개선의 유리한 효과를 경험할 수 있다.

[0123] 투여 요법은 최적의 요망되는 반응 (예: 치료적 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 분할된 용량이 시간에 따라 투여될 수 있거나, 또는 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 제제화될 수 있다. 투여량 단위 형태는 본원에서 사용되는 바와 같이 치료할 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합화된 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 필요한 제약학적 담체와 관련하여 요망되는 치료적 효과를 생성하기 위해 계산된 미리 정해진 양의 활성 화합물을 함유한다.

[0124] 다양한 구현예에서, 본 발명은, 유전적 치료를 위해 사용될 수 있는, 본원에 기재된 야생형 또는 D1L3 또는 D1 변이형을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 유전적 치료는 D1L3 및/또는 D1의 유전적 결핍 (예컨대 해로운 돌연변이)과 같은 만성 질병에 유용할 수 있다. 다양한 구현예에서, 발현 벡터는 DNA 또는 RNA를 포함한다. 다양한 구현예에서, 발현 벡터는 포유류 발현 벡터이다.

[0125] 일부 구현예에서, 발현 벡터는, 숙주 세포 (예: 원핵, 진핵, 또는 포유류 세포)에서 기능성인, 발현 제어 영역, 또는 그의 보체에 작동가능하게 연결된 단백질 변이형을 코딩하는 핵산을 포함한다. 발현 제어 영역은, 블록킹 및/또는 자극제가 발현 벡터에 의해 변환된 인간 세포에서 생성되도록, 작동가능하게 연결된 블록킹 및/또는 자극제의 발현을 구동시킬 수 있다.

[0126] 발현 제어 영역은, 작동가능하게 연결된 핵산의 발현에 영향을 주는, 조절성 폴리뉴클레오티드 (때로는 본원에

서 요소로서 언급됨), 예컨대 프로모터 및 인핸서이다. 본 발명의 발현 벡터의 발현 제어 영역은 인간 세포에서 작동가능하게 연결된 코딩 핵산을 발현할 수 있다. 구현예에서, 발현 제어 영역은 작동가능하게 연결된 핵산에 조절가능 발현을 부여한다. 신호 (때로는 자극제로서 언급됨)는 이러한 발현 제어 영역에 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 신호에 반응하여 발현을 증가시키는 이러한 발현 제어 영역은 종종 유도성으로서 언급된다. 신호에 반응하여 발현을 감소시키는 이러한 발현 제어 영역은 억제성으로서 언급된다. 전형적으로, 이러한 요소에 의해 부여된 증가량 또는 감소량은 존재하는 신호의 양에 비례하고; 신호의 양이 클수록, 발현의 증가 또는 감소가 크다.

[0127] 인간 세포에서 기능성인 발현 시스템은 당업계에 널리 공지되어 있고, 바이러스 시스템을 포함한다. 일반적으로, 인간 세포에서 기능성인 프로모터는 포유류 RNA 폴리머라제에 결합하고 mRNA로의 코딩 서열의 하류 (3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는, 통상적으로 코딩 서열의 5' 말단의 근위에 위치하는 전사 개시 영역을 갖고, 전형적으로 TATA 박스는 전사 개시 자리의 25-30 염기 쌍 상류에 위치한다. TATA 박스는 정확한 자리에서 RNA 합성을 시작하도록 RNA 폴리머라제 II를 지향시키는 것으로 여겨진다. 프로모터는 또한 전형적으로 상류 프로모터 요소 (인핸서 요소)를 함유할 것이며, 이는 전형적으로 TATA 박스의 100 내지 200 염기 쌍 상류 내에 위치한다. 상류 프로모터 요소는, 전사가 개시되고 한쪽 배향으로 작용할 수 있는 비율을 결정한다. 바이러스 유전자가 종종 고도로 발현되고 광범위한 숙주 범위를 갖기 때문에, 포유류 바이러스 유전자로부터의 프로모터가 특히 프로모터로서 사용된다. 예는 SV40 조기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 단순 헤르페스 바이러스 프로모터, 및 CMV 프로모터를 포함한다.

[0128] 적절한 경우, 예를 들어, 통합 서열과 같은 유전자 전달제가 사용될 수도 있다. 수많은 통합 서열이 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 하기 문헌 참조: Nunes-Duby *et al.*, Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk *et al.*, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). 이들은 재조합효소 및 유전자전위효소를 포함한다. 예는 Cre (Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), 람다 (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp (Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R (Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31 (예를 들어 하기 문헌 참조: Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004), 슬리핑 뷰티, 마리너 패밀리의 유전자전위효소 (Plasterk *et al.*, supra), 및 레트로바이러스 또는 렌티바이러스의 LTR 서열 및 AAV의 ITR 서열과 같은 바이러스 통합을 제공하는 성분을 갖는 AAV, 레트로바이러스, 및 항바이러스와 같은 바이러스의 통합을 위한 성분 (Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)을 포함한다. 추가로, 직접적 및 표적화된 유전적 통합 전략을 사용하여 키메라 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 삽입할 수 있고, 이는 CRISPR/CAS9, 아연 핑거, TALEN, 메가뉴클레아제 유전자-편집 기술을 포함한다.

[0129] 모든 인용 참조문헌은 명백히 그 전체가 본원에 포함된다.

[0130] **실시예**

[0131] **실시예 1: 숙주 DNase는 호중구 세포외 트랩에 의한 혈관 폐색을 막는다.**

[0132] 혈소판 및 피브린 클롯은 울혈 및 혈전증에서 혈관을 폐색시킨다. 여기서 본 발명자들은, 활성화된 호중구에 의해 방출된 항미생물 DNA-섬유, 호중구 세포외 트랩 (NET)에 기초한 혈관 폐색에 대한 비정규적인 메커니즘을 보고한다. 본 발명자들은, 두 DNase, DNase1 및 DNase1-유사 3이 뮤린 염증의 에피소드 동안 순환에서 NET를 분해함을 보인다. 두 DNase의 부재 하에, 혈관내 NET는 혈관을 막고 기관 손상을 유발하는 클롯을 형성한다. 중증 박테리아 감염을 갖는 환자에서의 혈관 폐색은 생체외에서 NET를 분해하는 결함 및 혈관내 NET-클롯의 형성과 관련된다. DNase1 및 DNase1-유사 3은 독립적으로 발현되고, 따라서 염증에서 NET의 해로운 효과에 대한 이중적 숙주 보호를 제공한다.

[0133] 염증은 침입하는 미생물을 통제하고 손상된 조직을 치유하기 위한 필수적 숙주 반응이다 (*1*). 통제되지 않는 지속적 염증은 과다 염증성 장애에서 조직 손상을 유발한다. 호중구는 급성 염증에서 우세한 백혈구이다. 감염 동안 호중구는, 박테리아를 부동화시키고 중화시키는 효소 및 독성 히스톤으로 장식된 DNA-필라멘트의 격자, 호중구 세포외 트랩 (NET)을 생성한다 (*2*). 숙주 방어에서 NET의 관련성은, 세포외 DNase가 여러 병원성 박테리아에서 독성 인자로서 작용한다는 사실에 의해 나타난다 (*3, 4*). 그러나, 부적절하게 방출된 NET는 그의 세포독성, 전염증성, 및 전혈전성 활성으로 인해 숙주 세포를 해칠 수 있다 (*5-7*). 실로, NET는 빈번히 염증성 또는 허혈성 기관 손상과 관련되고, DNase의 치료적 주입은 다양한 동물 모델에서 숙주 손상을 제한한다 (*8, 9*).

[0134] 숙주가 염증의 에피소드 동안 생체내에서 어떻게 NET를 분해하여 조직 손상을 제한하는지는 잘 이해되지 않는다. 보다 조기의 작업은, 혈청 내의 DNase1이 시험관내에서 NET의 DNA-백본을 소화시키는 것으로 나타났다 (*10*). 본 발명자들은, 지모그래피에 의해 야생형 마우스로부터의 혈청을 분석하고, 두 효소 활성 DNase, DNase1 및 DNase1-유사 3 [(DNase113)을 검출하였다 (도 1A). 두 효소 모두 DNase1 단백질 패밀리의 구성원이지만, 이들의 기원 및 기질 친화도에 있어 상이하다. DNase1은 비조혈 조직에 의해 발현되고, 우선적으로 무단백질 DNA를 분열시킨다 (*11,12*). 또한 DNase γ로서 공지된 DNase113은 면역 세포에 의해 분비되고 뉴클레오솜과 같은 DNA-단백질-복합체를 표적화한다 (*11,13*). 본 발명자는 DNase1 및 DNase113의 조합된 결핍으로 인해 혈청 내의 DNA-분해 활성을 갖지 않는 마우스를 생성하였다 (도 1A). 시험관내 생성된 NET는 DNase1/DNase113-/- 혈청으로의 노출 후 온전하게 남아있었지만, 야생형, DNase1-/-, 및 DNase113- /- 마우스로부터의 혈청은 NET를 분해하였다 (도 1B 및 도 1C). 본 발명자들은, DNase1/DNase113-/- 마우스의 간에서 DNase1 또는 DNase113의 cDNA를 안정적으로 발현하도록 수력학적 유전자 전달과 함께 간세포-특이적 발현 플라스미드를 사용하였다. 두 효소 모두 분비 단백질 신호 서열을 함유함을 고려하여 (*11*), 이 접근은 순환에서 DNase1 또는 DNase113의 활성 (도 1D) 및 NET를 분해하는 DNase1/DNase113-/- 마우스로부터의 혈청의 능력 (도 1E 및 도 1F)을 회복시켰다. 종합하면, 이들 데이터는, 독립적으로 발현된 두 숙주 효소, DNase1 및 DNase113이, 시험관내에서 NET를 분해함을 보여준다.

[0135] 생체내에서 NET-분해를 위한 DNase1 및 DNase113의 요건을 시험하기 위해, 본 발명자들은 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF)로 야생형, DNase1-/-, DNase113-/-, 및 DNase1/DNase113-/- 마우스를 만성적으로 자극하는 것을 목표로 하였다. G-CSF는 급성 염증의 특질인 호중구증가증을 촉발시키고, 호중구의 부분집단을 자극하여 생체외에서 NET를 자발적으로 방출시킨다 (*14*). 본 발명자들은, G-CSF를 코딩하는 CSF3의 cDNA를 간세포-특이적 발현 플라스미드로 클로닝하였다. 야생형 마우스에게 CSF3-플라스미드를 수력학적 주사하면, 혈장 내의 G-CSF의 수준이 만성적으로 상승되었다 (도 5A). 그 결과, 호중구 혈액 카운트가 꾸준히 증가하였고, 자발적으로 형성된 NET가 혈액 도말에서 검출되었다 (도 2A 및 도 2B). 본 발명자들은 또한, 중요 기관에서의 증가된 수의 체류 호중구 및 비장비대증을 관찰하였다 (도 5B 및 도 5C). 중요하게, CSF3-주사된 야생형 마우스는 정상적으로 성장하였고, 기관 손상이 발달하지 않았고, 곤란 또는 비정상적 거동의 거시적 징후를 나타내지 않았다 (도 5D 및 도 5E). 총체적으로, 이들 데이터는, 부수적 NET 형성을 갖는 만성 호중구증가증이 야생형 마우스에서는 잘 용인됨을 시사한다.

[0136] 다음으로, 본 발명자들은 DNase1-/-, DNase113-/-, 및 DNase1/DNase113-/- 마우스의 간에서 CSF3을 안정적으로 발현시켰다. DNase1 또는 DNase113의 단일 결핍을 갖는 마우스는 곤란의 징후를 나타내지 않았지만 (나타내지 않음), 조합된 결핍을 갖는 모든 마우스는 CSF3-주사 후 6일 내에 사망하였다 (도 2C). CSF3이 없는 대조군 플라스미드를 수용한 DNase1/DNase113-/- 마우스는 임의의 이상을 나타내지 않으면서 생존하였다 (도 2C, 나타내지 않음). 본 발명자들은 호중구증가증 및 NET를 유도하고 동시에 순환에서 DNase1 또는 DNase113을 회복시키기 위해 DNase1/DNase113-/- 마우스에서 CSF3과 DNase1 또는 DNase113을 공동-발현시켰다. 한쪽 DNase의 발현은 임의의 곤란 징후를 나타내지 않으면서 DNase1/DNase113-/- 마우스를 생존시키기에 충분하였다 (도 2D). *DNase1* 및 *DNase113*이 없는 대조군 플라스미드와 CSF3을 공동-발현하는 DNase1/DNase113-/- 마우스는 유전자 전달 후 5일 내에 사망하였다 (도 2D). 이들 마우스에서 사망 전에 빠르게 진행하는 저체온증이 선행되었고, 이는 엑시투스(exitus) 전 8시간 내에 주변 체온의 강한 감소로서 입증되었다 (도 2E). 저체온증에는 붉은 혈장 및 소변에 의해 나타나는 용혈성 빈혈 및 감소된 혈액 헤모글로빈이 동반되었다 (도 2F 및 도 2G). 혈액 도말에서 풍부한 분열적혈구는, 용혈성 빈혈이 적혈구 단편화에 의해 유발되었음을 나타내었다 (도 2H). 또한, 본 발명자들은 락테이트 데히드로게나제 (LDH), 간 트랜스아미나제, 및 신장 손상 마커 혈액 우레아 질소 및 크레아티닌의 상승된 혈장 수준을 검출하였고, 이는 다중 기관 손상을 나타내었다 (도 2I, 도 6A, 및 도 6B). *CSF3*과 *DNase1* 또는 *DNase113*의 공동발현은 체온 및 적혈구 및 기관의 온전성을 유지하였다 (도 2E 내지 도 2I; 도 6A 및 도 6B). 결론적으로, 이들 데이터는, DNase1 또는 DNase113이 만성 호중구증가증 동안 숙주 손상을 막기 위해 요구됨을 나타낸다.

[0137] 만성 호중구증가증을 갖는 DNase1/DNase113-/- 마우스의 조직학적 분석은, 폐, 간, 및 신장에서 혈관을 완전 또는 부분 폐색시킨 트랩핑된 적혈구를 갖는 혈관내 헤마톡실린-양성 클롯을 나타내었다 (도 3A 및 B; 도 6C 및 도 6D). 순환에서 DNase1 또는 DNase113의 발현은 이들 혈관 폐색을 막았다. 헤마톡실린-양성 클롯은, 개별 백혈구 핵의 어두운 보라색 염색으로 산발적으로 얼룩진 풍부한 밝은 보라색 염색 패턴을 나타내었고, 이는 용해된 DNA가 주요 클롯 성분임을 시사한다 (도 3A). 치밀 패킹된 크로마틴의 핵 분해 및 언폴딩이 NET-형성의 특질임을 고려하여 (*15*), 본 발명자들은 NET-마커에 대한 헤마톡실린-양성 클롯을 염색하였다. 본 발명자들은 형광

성 이중-가닥 DNA-개재 염료 및 크로마틴에 대한 항체로의 강력한 염색을 관찰하였다 (도 7A). 호중구 과립-유래된 효소 미엘로퍼옥시다제, 항미생물 카텔리시딘 펩티드, 및 NET-대용물 마커 시트룰린화 히스톤과 용해된 크로마틴의 공동-국소화는, 클롯이 NET로 구성되었음을 확인시켰다 (도 3C, 도 7B 및 도 7C). 정규적 혈전의 성분을 규명하기 위해, 본 발명자들은, 혈소판의 분비 소포 및 혈관 내피에 저장된 단백질, 피브린 및 폰 빌레브란트 인자 (vWF)에 대한 NET-클롯을 염색하였다. NET-클롯은 이들의 vWF 및 피브린 함량에 있어 매우 불균질하였다 (도 3D 및 도 3E). NET-클롯의 단면은 평균적으로 46%의 vWF로 커버되었으며, NET-클롯의 9%는 vWF에 대해 염색되지 않았다 (도 3E 및 도 3F). 피브린은 주로 부재하였고, 폐색된 혈관의 23% 미만에서 검출되었다 (도 3E). 이들 데이터는, NET가 시험관내에서 혈소판 및 적혈구를 부동화시키는 피브린-독립적 스캐폴드로서 작용한다는 발견과 일치한다 (*6*). 일부 클롯에서 vWF 및 피브린의 부재는, NET가 혈관 폐색에서 충분할 수 있음을 시사한다. 이 개념을 확증하기 위해, 본 발명자들은 시험관내에서 순수 호중구로부터 NET-클롯을 생성하는 것을 목표로 하였다. 본 발명자들은 혈액으로부터 호중구를 단리하고, 세포를 혈류을 모방하는 전단력에 노출시키면서 NET-형성을 유도하였다. 이 셋업에서, 본 발명자들은 육안으로 가시적인 DNase-민감성 클롯을 관찰하였고 (도 8A), 이는 뮤린 혈관구조 내의 NET-클롯의 외관과 유사하였다 (도 8B). 이제, 본 발명자들은 *CSF3*-발현 DNase1/DNase1l3-/- 마우스에서 순환으로부터 혈소판을 고갈시키고 약리학적으로 트롬빈을 억제하여 피브린 형성을 블록킹하였다. DNase1- 또는 DNase1l3- 발현과 달리, 항-혈전 치료는 이들 동물에서 사망을 막을 수 있었다 (도 3H). 총체적으로, 데이터는, NET의 클롯이 DNase1/DNase1l3-/- 마우스에서 만성 호중구증가증 동안 혈관을 막기에 충분함을 시사한다.

[0138] DNase1/DNase1l3-/- 마우스에서 NET-클롯의 형성은, 분열적혈구, 용혈성 빈혈, 및 혈관 폐색에 기인하는 장기 부전을 포함한, 환자에서의 감염-유도된 혈전 미소혈관증 (TMA) 및 파종성 혈관내 응고의 특징과 관련된다. 본 발명자들은 시가(Shiga) 독소-생성 대장균으로의 감염에 기인하는 용혈성-요독성 증후군을 갖는 TMA 환자 [STEC-HUS, (*16*)]로부터의 혈장을 분석하였다. 패혈증 및 패혈성 쇼크는 이들 환자에서 빈번한 합병증이었다 (*17*). 시험관내에서 생성된 NET는 급성 질환 상태에서 수집된 환자 혈장으로의 노출 후 온전하게 남아있었지만, 차도 환자로부터의 혈장은 NET를 분해하였다 (도 9A 및 도 9B). 데이터는 NET-분해에서의 획득된 및 일시적 결함을 나타내고, 이에 따라 이전 보고를 확장시킨다 (*18,19*). 중요하게, STEC-HUS 환자는, 잠재적으로 NET-분해를 회복시킨, DNase의 공급원, 건강 공여자로부터의 혈장의 주입을 포함하는 체제 (*17*)로 효과적으로 치료되었다.

[0139] 보고에 따르면 NET의 큰 응집물이 환자의 활막액 및 췌장관에서 형성되지만 (*21,22*), 다른 조직에서는 아직 기재된 바 없다. 따라서, 본 발명자들은 중증 염증성 질환을 갖는 환자에서 NET의 혈관내 응집물을 규명하는 것을 목표로 하였다. 본 발명자들은 급성 호흡 장애 증후군 및/또는 패혈증을 갖는 환자로부터의 부검에서 수집된 폐 조직을 스크리닝하였다 (도 10). 본 발명자들은 2명의 패혈증 환자의 혈관에서 헤마톡실린-양성 클롯을 검출하였다 (도 11A 및 도 11C). 두 경우 모두에, 클롯은 크로마틴 및 MPO로 구성되었고 (도 11B 및 도 11D), 이는 NET가 인간 패혈증에서 혈관내 클롯을 형성할 수 있음을 나타낸다.

[0140] 패혈증은 마우스에서 혈관내 NET-형성의 강력하고 빠른 촉발원이다(7). 따라서, 본 발명자들은, NET-분해의 결함이 질환을 악화시킬 수 있음을 가정하였다. 실로, 본 발명자들은, 야생형 마우스는 아니지만, DNase1 및 DNase1l3의 조합된 결핍을 갖는 마우스는 저용량 리포폴리사카라이드 및 열-사멸 대장균에 고도로 감수성이었음을 관찰하였다 (도 4A). 호중구 DNase1/DNase1l3-/- 마우스와 유사하게, 패혈성 DNase1/DNase1l3-/- 마우스의 혈액 분석은, 혈액 도말에서 혈장 LDH 및 분열적혈구의 증가된 수준 (도 4D 및 도 4E)과 함께, 용혈성 빈혈 및 혈뇨를 나타내었다 (도 4B 및 도 4C). 또한, 본 발명자들은 폐에서 풍부한 부분 또는 완전 폐색된 혈관을 관찰하였다 (도 4F 및 도 4G). 부분 폐색된 혈관의 상세 분석은 혈관 내강 내의 NET의 클롯을 나타내었다 (도 4H). 완전 폐색된 혈관에서 NET-클롯은 트랩핑된 적혈구 및 백혈구와 정체되었다 (도 4I; 도 12A 및 도 12B). 중요하게, DNase1/DNase1l3-/- 마우스에서 DNase1 또는 *DNase1l3*의 간 발현은 혈관 폐색을 막았고, 야생형 표현형을 회복시켰다. 종합하면, 이들 데이타는, 순환 DNase1 또는 DNase1l3이 패혈증에서 NET-클롯의 형성 및 숙주 손상을 막음을 나타낸다.

[0141] 요약하면, 혈소판 및 피브린은 울혈성 클롯 및 병리적 혈전을 생성하지만 (*23*), 본 발명자들의 데이터는 염증 상태에서 혈관 폐색에 대한 비정규적 메커니즘으로서 NET-클롯을 도입한다. 피브린 가닥과 유사하게, NET는 초대형이고 안정적 분자이다 (*6*). 만성 호중구증가증 또는 패혈증에서 나타나는 것과 같이 고농도에서, 혈관내 NET는 클롯을 형성할 수 있고, 이는 혈관을 막고 그에 따라 적열구 및 기관에 손상을 유발하기에 크기가 충분하다. 염증 동안 혈액 및 조직 온전성을 유지하기 위해, 숙주는 혈관내 NET에 대한 이중 보호 시스템으로서 DNase1 및 DNase1l3을 독립적으로 발현한다. 그러나, 이들 숙주 인자에서 획득된 및 유전적 결함은 NET의 분해

를 지연시키고, 그에 따라 질환을 촉진시킬 수 있다. 획득된 결함은 손상된 조직으로부터 외부화된 단량체 액틴에 의한 DNase1-억제 및 혈청 프로테아제에 의한 DNase1l3의 불활성화를 포함할 수 있다 (*11*). DNase1 및 DNase1l3에서의 돌연변이가 환자에서 규명되었고, 이는 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 전신성 자가면역 질환과 관련된다 (*24,25*). 흥미롭게도, DNase1 및 DNase1l3-결핍 마우스는 자발적으로 연령에 따라 SLE-유사 질환을 발달시킨다 (*13,26*). NET는 두드러진 자가항원으로 구성되고, SLE 환자로부터의 호중구는 증가된 NET 방출 능력을 갖는다 (*27*). 감소된 클리어런스(clearance) 능력은 반감기 NET를 증가시키고, 그에 따라 자가면역 질환을 촉진시킬 수 있다 (*10,27*). 결론적으로, 숙주 DNase에서의 결함은 과다 염증성 질환에서 NET의 해로운 영향을 야기할 수 있다.

[0142] 그 결과, DNase1- 및 DNase1l3 매개 NET-분해는 염증 병태를 앓고 있는 환자에 대한 매력적인 치료 기회를 제공한다. DNase1 및 DNase1l3이 동일한 또는 별개의 메커니즘에 의해 NET를 분해하는지를 시험하기 위해, 본 발명자들은 고정액을 사용하여 NET에서 단백질을 가교시켰다. 고정된 NET는 DNase1l3-/- 혈청에 의해 효율적으로 분해되었지만, DNase1-/- 혈청에 의해서는 분해에 대해 저항성이었다 (도 13A 및 도 13B). 이들 결과와 함께, 재조합 DNase1 또는 DNase1l3에 대한 NET의 노출은, 두 DNase가 나이브 NET를 분해하지만 (도 13C 및 도 13D), 고정된 NET는 DNase1l3 활성에 대해 저항성임을 보여주었다 (도 13E 및 도 13F). 총체적으로, 이들 시험관내 데이터는, DNase1 및 DNase1l3이 별개의 메커니즘으로 NET를 분해함을 시사한다.

[0143] 마지막으로, 본 발명자들은 마우스의 순환에서 DNase1 및 DNase1l3의 활성을 인간과 비교하였다. DNase1 및 DNase1l3 활성을 구별하기 위해, 본 발명자들은 정상적 건강 공여자 (NHD)로부터의 혈장에서 DNase1 활성을 블록킹하는 인간 DNase1에 대한 항체 (α-hDNase1)를 생성하였다 (도 14A). 헤파린은 DNase1l3의 공지된 억제제이고, 이를 사용하여 DNase1l3에 의한 DNA-분해 활성을 블록킹하였다 (도 14B). 뮤린 혈장은 인간 혈장에 비해 대략 10배 더 높은 총 DNase 활성 (도 14C), DNase1 활성 (도 14D), 및 DNase1l3 활성 (도 14E)을 나타내었다. 또한, 인간 혈장에서는 아니지만, 뮤린 혈장에서 DNase1l3은 NET를 효율적으로 분해한다 (도 14F 및 도 14G). 데이터는, 인간 순환에서 DNase1l3의 농도는 NET를 분해하기에 충분하지 않음을 시사한다. 따라서, 환자에서 DNase1l3 매개 NET-분해를 가능하게 하는 것은, 염증성 질환을 위한 신규하고 유망한 치료적 전략이다.

[0144] **물질 및 방법**

[0145] **환자 혈장**

[0146] 시트로산화 혈장 샘플을 독일에서 STEC-HUS 발생 2011년 동안 환자로부터 얻었다 (*16*). 본 발명자들의 연구에서의 포함 기준은 STEC/장출혈 대장균 또는 혈성 설사의 양성 규명, 혈소판 카운트 ≤150 × 109 /L 또는 1주 내에 ≥25%만큼 감소, 용혈의 증거 (정상 한계 초과의 LDH, 정상 한계 미만의 합토글로빈, 또는 분열적혈구의 존재) 및 급성 신장 손상 단계 ≥1이었다.

[0147] **인간 조직**

[0148] 인간 조직을 5% 인산염 완충 포르말린 중에서 실온에서 밤새 고정시켰다. 모든 조직은 부검에서 수집되고, 원래 진단 목적으로 본 발명자들에게 제출되어 국가 윤리 원칙에 따라 연구되었다. 환자의 사망 원인은 도 10에 나타내었다.

[0149] **마우스**

[0150] 모든 마우스는 C57BL/6 유전적 백그라운드 상에 있다. 본 발명자들은 이전에 기재된 DNase1-/- 및 DNase1-유사 3-/- 마우스를 교차시켜 (*26,28*) DNase1/DNase1l3-/- 마우스를 생성하였다. DNase1-/- 마우스의 이 균주는 최근에 미토콘드리아 샤페론을 코딩하는 *DNase1* 중첩 유전자 *Trap1/Hsp75*에서 표적외 돌연변이를 함유하는 것으로 보고되었다 (*29*). 따라서, 본 발명자들은 대조군 실험을 위한 DNase1/DNase1l3-/- 마우스를 생성하기 위해 대안적 DNase1-/- 균주 (*30*)를 포함시켰다 (도 15A-도 15C).

[0151] **변성 폴리아크릴아미드 겔 전기이동 지모그래피 (DPZ)에 의한 DNase1의 검출**

[0152] 본 발명자들은, 변형과 함께 이전에 기재된 바와 같이 DPZ를 수행하였다 (*19*). 간단히, 나트륨 도데실 술페이트 (SDS)-폴리아크릴아미드 겔을, DNA가 없는 4% (v/v) 스태킹 겔 및 200 μg/ml의 연어 정소 DNA (Sigma-Aldrich, 독일)를 함유하는 10% (v/v) 분리 겔로 제조하였다. DNase1의 검출을 위해, 0.5 μl의 뮤린 혈청을 14.5 μl의 물 및 5 μl SDS 겔-로딩 완충제 (BioRad, 독일)의 혼합물과 혼합하였다. 혼합물을 5분 동안 비등시키고, 겔 상에 로딩하였다. 전기이동을 트리스(Tris)/글리신 전기이동 완충제 (25 mM 트리스, 192 mM 글리신, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.7)를 사용하여 120 V에서 수행하였다. 전기이동 후, 5% (w/v) 분유, 10 mM 트리스/HCl

pH 7.8, 3 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 100 U/mL 페니실린, 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 함유하는 리폴딩 완충제 중에서 37℃에서 밤새 겔을 인큐베이션시킴으로써 단백질을 리폴딩하였다. 겔을 분유가 없는 리폴딩 완충제로 전달하고, 37℃에서 추가의 24시간 동안 인큐베이션시켰다. DNA를 1x SYBR Safe (Thermo Scientific, 독일)로 형광 라벨링하고, 겔의 형광 이미지를 형광 스캐너 (Molecular Imager FX, BioRad, 독일)를 사용하여 기록하였다.

[0153] **DPZ에 의한 DNase113의 검출**

[0154] DNase113의 검출을 위해, 2 μl의 혈청을 12 μl의 물, 5 μl SDS 겔로딩 완충제, 및 1 μl of 베타-메르캅토에탄올 (BME, Sigma-Aldrich)과 혼합하였다. BME는 DNase1의 디술파이드 브릿지를 환원시키고, 이는 그의 불활성화를 유발한다 (*11*). 혼합물을 5분 동안 비등시키고, 겔 상에 로딩하였다. DNase1에 대해 기재된 바와 같이 전기이동을 수행하였다. 겔을 50℃에서 30분 동안 10 mM 트리스/HCl pH 7.8로 2회 세척함으로써 SDS를 제거하였다. 10 mM 트리스/HCl pH 7.8, 1 mM BME, 100 U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 함유하는 리폴딩 완충제 중에서 37℃에서 48시간 동안 겔을 인큐베이션시킴으로써 단백질을 리폴딩하였다. 이어서, 겔을 3 mM CaCl2 및 3 mM MnCl2로 보충된 리폴딩 완충제 중에서 37℃에서 추가의 48시간 동안 인큐베이션시켰다. DNase113에 의한 무단백질 DNA의 효율적인 분해를 가능하게 하기 위해 Mn^{2+}의 첨가가 요구된다 (*11*). DNA를 DNase1에 대해 기재된 바와 같이 라벨링하고 이미지화하였다.

[0155] **단일 방사상 효소 확산 (SRED) 검정에 의한 총 DNase 활성의 검출**

[0156] 총 DNase 활성을 측정하기 위해, 본 발명자들은 연어 정소로부터의 55 μg/ml DNA를 Mn^{2+} 함유 완충제 (20 mM 트리스-HCl pH 7.8, 10 mM $MnCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 및 2x SYBR Safe) 중에 용해시켰다. DNA 용액을 50℃에서 10분 동안 가열하고, 동일한 부피의 2% 초순수 아가로스 (Thermo Scientific)와 혼합하였다. 혼합물을 플라스틱 트레이에 붓고, 고화시까지 실온에서 저장하였다. 2 μl의 뮤린 혈청을 1.0 mm 직경의 웰로 로딩하였다. 겔을 습윤 챔버 내에서 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 겔의 DNA 형광을 형광 스캐너로 기록하였다.

[0157] **시험관내 NET-분해 검정**

[0158] NET-분해를 이전에 기재된 바와 같이 분석하였다 (*19*). 무혈청 DMEM 중의 정제된 인간 호중구를, 웰 당 5 x 10^4 세포의 농도로 0.001% 폴리리신 (Sigma)으로 코팅된 멸균 96-웰 플레이트 (Falcon, BD Technologies, 독일)로 시딩하였다. NET-형성을 유도하기 위해, 호중구를 5% CO_2 및 습기와 함께 37℃에서 4 시간 동안 100 nM 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA; Sigma-Aldrich)로 활성화시켰다. 본 발명자들은 인산염 완충 식염수 (PBS)를 첨가하고, 96-웰 플레이트를 4℃에서 밤새 저장하였다. NET를 PBS로 세척하고, 0.5% Triton X-100을 함유하는 PBS로 5분 동안 처리하고, 다시 PBS로 세척하였다. NET를, 2가 양이온을 갖는 HBSS (HBSS+; Thermo Scientific) 중의 10 μM PPACK (Santa Cruz, Heidelberg, 독일)로 보충된 10% 뮤린 혈청 또는 10% 시트로산화 인간 혈장과 인큐베이션시켰다. NET를 5% CO2 및 습기와 함께 37℃에서 3시간 동안 분해시켰다. 본 발명자들은 상청액을 폐기하고 실온에서 1시간 동안 PBS 중의 2% PFA를 첨가하여 NET-분해를 중단시켰다. PFA를 폐기하고, PBS 중의 2 μM의 형광 DNA 염료 SytoxGreen (Thermo Scientific)를 첨가하여 분해되지 않은 NET를 형광 라벨링하였다. 형광 염색된 NET의 이미지를 역상 형광 현미경 (Axiovert 200M, Zeiss, 독일)으로 획득하였다. 본 발명자들은 플레이트 판독기 (여기: 485 nm; 방출: 535 nm)로 형광 강도를 기록함으로써 또는 ImageJ 소프트웨어 (NIH, 미국)를 사용하여 현미경검사 사진에서 NET의 면적 커버리지를 측정함으로써 분해되지 않은 NET를 정량화하였다.

[0159] **생체내 발현 벡터의 제조**

[0160] 본 발명자들은 pLIVE 플라스미드 (Mirus Bio, 미국)를 사용하여 마우스에서 단백질을 발현시켰다. 벡터는 단백질의 오래 지속되는 간세포-특이적 발현을 가능하게 한다. 본 발명자들은 뮤린 *DNase1*, *DNase113*, 및 *CSF3*을 갖는 pLIVE 플라스미드를 생성하였다. 뮤린 *DNase1*에 대하여, cDNA (진뱅크 수탁 번호(Genbank Accession Number) NM010061)의 PCR을, SalI 및 XhoI 제한 자리를 함유하는 프라이머 DNase1-F 5'-GTCGACATGCGGTACACAGG (서열 번호: 27) 및 DNase1-R 5'-CTCGAGTCAGATTTTTCTGAGTGTCA (서열 번호: 28)의 쌍을 사용하여 수행하였다. *DNase113*에 대하여, cDNA (진뱅크 수탁 번호 AF047355)의 PCR을, BamHI 및 SacI 제한 자리를 함유하는 프라이머 DNase113-F 5'-GAAGTCCCAGGAATTCAAAGATGT (서열 번호: 29) 및 DNase113-R 5'-GCGTGATACCCGGGAGCGATTG (서열 번호: 30)의 쌍을 사용하여 수행하였다. 두 cDNA를 T4 리가제 (New England Biolabs, 독일)를 사용하여 pLIVE 벡터의 다중-클로닝 자리 (MCS)로 클로닝하였고, 이는 적절한 효소로 전소화되었다. DNase113을 함유하는

pLIVE 벡터를 프라이머 mutDNase113-F 5'-AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA (서열 번호: 31) 및 그의 상보적 mutDNase1113-R 5'-TGCAGGGACATGGTGGCCGGGAGTCGACT (서열 번호: 32)의 쌍으로 자리-지향된 돌연변이생성에 적용시켜 공통 Kozak 서열을 매칭시키고 단백질 발현을 최적화하였다. *CSF3*의 cDNA를 함유하는 pLIVE 벡터의 생성은 외부에 위탁하였다 (Eurofins Genomics, 독일). *CSF3*의 cDNA (진뱅크 수탁 번호 BC120761)를 제한 자리 SalI 및 XhoI 사이의 MCS에 삽입하였다. 모든 생성된 벡터의 서열을 이중 가닥 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다. 대조군으로서 본 발명자들은 부가적 삽입이 없는 모체 pLIVE 플라스미드를 사용하였다. PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit를 사용하여 모든 플라스미드를 정제하고, High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns를 사용하여 내독소의 잠재적 오염물을 제거하였다 (둘 다 Thermo Scientific).

[0161] **뮤린 DNase1 및 DNase113의 시험관내 발현**

[0162] 다른 부분에 기재된, DNase1 또는 DNase113에 대한 cDNA를 함유하는 플라스미드를, 10% 녹아웃 혈청 대체물 (Thermo Scientific)로 보충된 DMEM 배지 (Thermo Scientific)로 무혈청 조건에서 리포펙타민 3000 (Thermo Scientific)으로 인간 배아 신장 (HEK) 세포로 트랜스펙션시켰다. 72시간 후, 상청액을 수집하고, 500 xg로 10분 동안 원심분리하고, 멸균 여과시키고, 3K 컬럼 (Amicon Ultra, Millipore, Darmstadt, 독일)으로 초원심분리에 의해 농축시켰다.

[0163] **생체내 유전자 발현**

[0164] *DNase1*, *DNase113*, *CSF3*을 함유하는 pLIVE-플라스미드, 또는 비어있는 대조군 플라스미드를 수력학적 꼬리 정맥 주사를 통해 마우스에 투여하였다. 간단히, 50 μg의 플라스미드를 마우스의 체질량의 10%와 동등한 부피로 0.9% 식염수 중에서 희석하였다. 마우스를 이소플루란으로 마취시키고, 이어서 플라스미드 용액을 꼬리 정맥을 통해 5 내지 8초에 걸쳐 정맥내 주사하였다. 드문 경우에, 마우스는 최초 24시간 내에 주사로부터 완전히 회복되지 않았고, 이들 동물은 연구로부터 배제되었다. 공동발현 연구를 위해, 50 μg의 *CSF3*-플라스미드를 50 μg의 비어있는 대조군 플라스미드, 또는 *DNase1* 및 *DNase113*을 함유하는 플라스미드와 혼합하였다. 두 플라스미드 모두를 함유하는 용액을 수력학적 꼬리 정맥 주사를 통해 투여하였다.

[0165] **만성 호중구증가증**

[0166] 4주 또는 8-12주령의 암컷 마우스에 *CSF3*을 함유하는 50 μg의 pLIVE-플라스미드를 주사하여 G-CSF 과발현 및 호중구증가증을 유도하였다. 마우스를 주사 후 최초 1주 동안 8시간마다, 또한 그 후 매일 모니터링하였다. 비접촉 적외선-온도계 (Etekcity, 독일)에 의해 항문주위 영역에서 온도를 측정하였다. 생존 연구를 위해, 마우스를 안락사시키고, 동물이 곤란 징후 (자발적 운동 없음, 감긴 눈, 가끔 숨가쁨)를 나타낸 경우, "비생존"으로서 스코어링하였다. 모든 경우에, 이들 곤란 징후에는 빠르게 진행하는 및 중증 저체온증 (플라스미드 주사 전 체온에 비해 ≥4℃의 체온 감소로서 정의됨) 및 혈뇨가 동반되었다. 비-저체온 마우스는 임의의 곤란 징후를 나타내지 않았고, 실험 종료시에 안락사시켰다. 기관, 혈액, 및 소변 수집을 위해, 본 발명자들은 3마리의 D1/D1L3-/- 마우스의 4개 그룹을 분석하였다. 각 그룹의 마우스에게 *CSF3*과 비어있는 혈장, *DNase1*, 또는 *DNase113*의 혼합물을 주사하였다. 마우스의 각 그룹을, 그룹의 제1 동물이 곤란 징후, 중증 저체온증, 및 혈뇨를 나타낸 경우, 바이오샘플 수집을 위해 안락사시켰다. 이 시점을 "엑시투스"로서 정의하였고, 이는 주사 후 3 내지 6일 내에 나타났다.

[0167] **혈소판 고갈**

[0168] 마우스는 2 μg/g 혈소판-고갈 항체 또는 이소타입 대조군 항체 (both Emfret, 독일)의 복강내 주사를 수용하였다. 이 처리는 순환으로부터 혈소판의 > 95%를 고갈시킨다. 처리를 *CSF3*의 주사 24시간 후에 시작하고, 실험 완료시까지 48시간마다 반복하였다.

[0169] **트롬빈 억제**

[0170] 분말화된 다비가트란 에텍실레이트 (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, 독일)를 40 mg/g의 용량으로 정상 차우 분말 (Altromin, 독일)과 혼합하였다. 분말을 증류수와 혼합하여 펠릿을 제조하고, 실온에서 건조시켰다. 다비가트란의 공급은 CSF3 주사 후 24 시간에 시작되었다. 1일 동안 다비가트란 식이가 공급된 WT 마우스는, 다비가트란 없이 정상 차우를 수용한 마우스에 비해 6.48±1.19배 (평균± SD, N=4) 증가된 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간을 나타내었다 (스튜던트 t-시험; $P < 0.001$).

[0171] **패혈증에 대한 박테리아의 제조**

[0172] 대장균 (XEN 14, Perkin Elmer)을, 50 μg/ml 카나마이신을 함유하는 용원성 브로쓰 배지 내에서 밤새 성장시켰

다. 박테리아를 4000 x g로 10분 동안 원심분리하여 펠릿화하고, PBS로 세척하고, 그에 재현탁시켰다. 1.5 x 10^9 박테리아/ml의 분취액을 70℃에서 15분 동안 인큐베이션시켜 박테리아를 열-사멸시켰다. 분취액을 추가 사용시까지 -20℃에서 저장하였다.

[0173] **패혈증**

[0174] 8-15주령의 수컷 마우스는 0.9% 식염수 중의 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 혈청형 티피무리움(*thyphimurium*) (Sigma-Aldrich)으로부터의 1 μg/g의 LPS의 복강내 주사를 매일 3회 수용하였다. 제3 LPS 주사와 함께, 마우스는 1.5 x 107 열-사멸 대장균/g의 정맥내 주사를 수용하였다. 나타낸 생존 시간은 대장균의 주사 후 시간을 나타낸다. 안락사시 혈액 및 기관을 수집하였다. 도 4A-도 4I에 나타낸 완전한 분석을 수행하기에는 2마리 동물 (1x D1/D1L3-/- + *Ctrl*, 1x D1/D1L3-/- + *D1L3*)로부터 불충분한 샘플이 얻어졌다. 마우스를 안락사시키고, 동물이 중증 곤란 징후 (터치에 대한 무반응)를 나타낸 경우, "비생존"으로서 스코어링하였다. 모든 비생존 마우스는 혈뇨 및 사지의 창백을 나타내었다. 모든 생존 마우스를 열-사멸 대장균의 정맥내 주사 24시간 후 안락사시키고 "생존"으로서 스코어링하였다.

[0175] **뮤린 혈액, 혈장, 및 조직 수집**

[0176] 혈액을 턱밑 천자에 의해 또는 후안와 공동(retroorbital sinus)에 의해 수집하였다. 혈액을 200 μl 혈청 튜브 (Monovette; Sarstedt, 독일) 및 200 μl EDTA 튜브 (GK 150, KABE labortechnik, 독일) 내로 수집하였다. 3000 x g로 15분 동안 원심분리 후 혈액의 상청액을 수집하여 혈장을 얻었다. 혈액을 실온에서 1시간 동안 클롯팅시킨 후 3000 x g로 15분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 및 혈장 샘플을 추가 사용시까지 -20℃에서 분취액 중에서 저장하였다. 기관 분석을 위해, 마우스를 PBS의 심장내 주입에 의해 관류시켰다. 기관을 수집하고, 4℃에서 4% PFA 중에서 24시간 동안 고정시켰다. 고정된 기관을 파라핀 중에 매립시켰다.

[0177] **혈액 및 혈장의 분석**

[0178] 제조업체의 지시에 따라 표준화된 키트 (Biotron Diagnostics, 미국 캘리포니아주)를 사용하여 혈장 중의 LDH, AST, ALT, 크레아티닌 및 BUN을 정량화하였다. 마우스 G-CSF를 Quantikine ELISA Kit (R&D, 영국)로 정량화하였다. EDTA 혈액 중의 헤모글로빈을 자동화된 혈구계 (Idexx ProCyte Dx Hematology Analyzer, 네덜란드)에 의해 정량화하였다. FACS에 의해 호중구를 정량화하기 위해, 전혈을 0.2 μg의 피코에리트린-라벨링된 항-마우스 CD11b (M1/70, Biolegend, 독일) 및 0.5 μg의 Alexa Fluor 488 항-마우스 Ly6G (1AB, Biolegend, 독일)와 15분 동안 아이스 상에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 혈액을 0.5 ml PBS로 희석하고, FACSCalibur (BD Bioscience, 미국)로 분석하였다. EDTA-항응고화된 혈액의 혈액 도말을 폴리리신-코팅된 슬라이드 (Hecht Assistant, 독일) 상에서 제조하였다. 통풍-건조 후 드라이 아이스 상에서 1μM SytoxGreen으로 보충된 메탄올 중에서 1분 동안 인큐베이션시키고, 시판 키트 (In Vitro Diagnostikum, 독일)를 사용하여 Giemsa로 염색하였다.

[0179] **면역형광 염색**

[0180] 파라핀-매립된 섹션을 왁스제거하고, 재수화시키고, 시트레이트 완충제 (10 mM 나트륨 시트레이트, 0.1% 트윈 (Tween), pH 6) 중에서 100℃에서 25분 동안 항원 복구에 적용하였다. 그 후, 섹션을 2.5% 정상 염소 혈청 (Vector, 영국)으로 30분 동안 블록킹한 후 마우스-온-마우스 블록킹 키트 (Vector)로 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 섹션을 MPO (A0398, Agilent, 독일), CRAMP (PA-CRLP-100, Innovagen, 스웨덴), 시트룰린화 히스톤 3 (ab5103, Abcam, 영국), 피브린 [클론 59D8], 또는 히스톤 H2A, H2B, 및 DNA의 복합체에 대한 1차 항체 2 μg/ml와 4℃에서 밤새 인큐베이션시켜 크로마틴을 검출하였다 (*2*). 섹션을 AlexaFluor488 또는 AlexaFluor555 (모두 Thermo Scientific)와 컨쥬게이션된 항-토끼 및 항-마우스 IgG 항체와 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, DNA를 2분 동안 1 μg/ml DAPI로 라벨링하였다. 자가형광을 수단 블랙 (70% 에탄올 중 0.1%)과의 25-분 인큐베이션에 의해 켄칭시키고, 섹션을 Fluoromount G (Southern Biotech, 미국)로 모니터링하였다. 형광 라벨링된 섹션의 이미지를 역상 형광 현미경 (Axiovert 200M, Zeiss, 독일) 또는 공초점 현미경 (TCS SP5, Leica, 독일)으로 획득하였다. NET-클롯의 이미지를 소프트웨어 (ImageJ)를 사용하여 정량화하였다. NET-클롯의 3% 미만의 vWF 또는 피브린 염색 영역은 음성으로 고려되었다.

[0181] **면역조직화학**

[0182] 항원 복구 후, 탈파라핀된 섹션을 2.5% 정상 말 혈청 (Vector)으로 30분 동안 블록킹하였다. 섹션을 호중구 엘라스타제에 대한 1차 항체 (ab68672, Abcam) 2 μg/ml와 4℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 세척 후, 섹션을 제조

업체의 지시에 따라 항-토끼 IgG-AP 키트 (ImmPRESS, Vector)를 사용하여 염색하였다. 섹션을 헤말룸 (Merck, 독일)으로 대비염색하고 여기에 Neo-Mount 배지 (Merck)를 마운팅하였다. 염색된 섹션의 이미지를 역상 현미경 (Axiovert 200M, Zeiss)을 사용하여 획득하였다.

[0183] **시험관내에서 NET-클롯의 생성**

[0184] 정제된 인간 호중구를, 2% BSA로 보충된 DMEM 중의 3 x 10^7 세포 / ml로 조직 배양 플레이트로 시딩하였다. 세포를 5% CO_2와 습기 및 회전 조건 (300 rpm)으로 37℃에서 4시간 동안 0.1 μM PMA로 활성화시켰다. 본 발명자들은 대조군으로서 10 U/ml 재조합 인간 DNase1 (도르나제 알파, Roche, 독일)의 존재 하에 PMA로 활성화된 호중구 및 비자극된 호중구를 사용하였다. NET-클롯을 4℃에서 밤새 2% PFA로 고정시켰다. 고정된 NET-클롯을 파라핀 중에 매립시키고, 섹션을 상기에 기재된 바와 같이 NET에 대해 염색하였다.

[0185] **통계적 평가**

[0186] 데이터는 평균 ± 표준 편차로서 나타내었다. 통계 분석은 프리즘(Prism) 소프트웨어 (GraphPad, 미국)를 사용하여 수행하였고, 이는 스튜던츠 t-시험, 일원 및 이원 ANOVA 후, 본페로니의 다중 비교 시험, 및 로그-랭크 시험을 포함하였다. 결과는 $P < 0.05$에서 유의한 것으로 고려되었다.

[0187] **무비**

[0188] 만성 호중구증가증은 야생형 마우스에서 용인된다. 생성된 무비는, CSF3-발현 플라스미드 (CSF3) 또는 CSF3이 없는 대조군 플라스미드 (Ctrl)의 주사 1주 후 야생형 마우스를 나타낸다. 두 동물 모두 정상적 거동을 나타내고 곤란 징후를 나타내지 않는다.

[0189] 만성 호중구증가증은 DNase1 및 DNase1l3이 없는 마우스에서 곤란을 유발한다. 무비는, CSF3과 대조군 플라스미드 (CSF3/Ctrl), DNase1 (CSF3/D1,), 또는 DNase1l3 (CSF3/D1L3)을 공동-발현하는 DNase1/DNase1l3-/- 마우스를 보여준다. 순환 DNase, DNase1 또는 DNase1l3을 발현하는 마우스는 정상적 거동을 나타낸다. 순환 DNase가 없는 마우스 (CSF3/Ctrl)는 곤란 징후 (자발적 운동 없음, 감긴 눈, 가끔 숨가쁨)을 나타낸다.

[0190] **참조문헌**

[0191] 1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, Acute and chronic inflammation. In Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 2.

[0192] 2. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535 (2004).

[0193] 3. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. 207, 1853-1862 (2010).

[0194] 4. V. Thammavongsa, D. M. Missiakas, O. Schneewind, Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. 342, 863-866 (2013).

[0195] 5. S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. 13, 463-469 (2007).

[0196] 6. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wrobleski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 15880-15885 (2010).

[0197] 7. A. Warnatsch, M. Ioannou, Q. Wang, V. Papayannopoulos, Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. Science 349, 316-320 (2015).

[0198] 8. B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 13, 34-45 (2013).

[0199] 9. S. K. Jorch, P. Kubes, An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat. Med. 23, 279-287 (2017).

[0200] 10. A. Hakkim, B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, A. Zychlinsky. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 9813-9818 (2010).

[0201] 11. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). FEBS J. 276, 1059-1073 (2009).

[0202] 12. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. Biochem. J. 380, 929-937 (2004).

[0203] 13. V. Sisirak, B. Sally, V. D'Agati, W. Martinez-Ortiz, Z. B. Ozcakar, J. David, A. Rashidfarrokhi, A. Yeste, C. Panea, A. S. Chida, M. Bogunovic, Ivanov, II, F. J. Quintana, I. Sanz, K. B. Elkon, M. Tekin, F. Yalcinkaya, T. J. Cardozo, R. M. Clancy, J. P. Buyon, B. Reizis, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. Cell 166, 88-101 (2016).

[0204] 14. M. Demers, D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, D. D. Wagner, Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 13076-13081 (2012).

[0205] 15. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 176, 231-241 (2007).

[0206] 16. C. Frank, D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Muller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, G. Krause, HUS Investigation Team, Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany. N. Engl. J. Med. 365, 1771-1780 (2011).

[0207] 17. S. A. Braune, D. Wichmann, M. C. von Heinz, A. Nierhaus, H. Becker, T. N. Meyer, G. P. Meyer, M. Muller-Schulz, J. Fricke, A. de Weerth, W. W. Hoepker, J. Fiehler, T. Magnus, C. Gerloff, U. Panzer, R. A. Stahl, K. Wegscheider, S. Kluge. Clinical features of critically ill patients with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Crit. Care. Med. 41, 1702-1710 (2013).

[0208] 18. M. Jimenez-Alcazar, M. Napirei, R. Panda, E. C. Kohler, J. A. Kremer Hovinga, H. G. Mannherz, S. Peine, T. Renne, B. Lammle, T. A. Fuchs, Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. J. Thromb. Haemost. 13, 732-742 (2015).

[0209] 19. J. Leffler, Z. Prohaszka, B. Mikes, G. Sinkovits, K. Ciacma, P. Farkas, M. Reti, K. Kelen, G. S. Reusz, A. J. Szabo, M. Martin, A. M. Blom, Decreased neutrophil extracellular trap degradation in shiga toxin-associated haemolytic uraemic syndrome. J. Innate Immun. 9, 12-21 (2017).

[0210] 20. M. Leppkes, C. Maueroder, S. Hirth, S. Nowecki, C. Gunther, U. Billmeier, S. Paulus, M. Biermann, L. E. Munoz, M. Hoffmann, D. Wildner, A. L. Croxford, A. Waisman, K. Mowen, D. E. Jenne, V. Krenn, J. Mayerle, M. M. Lerch, G. Schett, S. Wirtz, M. F. Neurath, M. Herrmann, C. Becker, Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. Nat. Commun. 7, 10973 (2016).

[0211] 21. C. Schauer, C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhofer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, R. Holmdahl, V. Krenn, T. Harrer, I. Jeremic, R. Bilyy, G. Schett, M. Hoffmann, M. Herrmann, Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nat. Med. 20, 511- 517 (2014).

[0212] 22. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock. In Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 4.

[0213] 23. M. Al-Mayouf, A. Sunker, R. Abdwani, S.A. Abrawi, F. Almurshedi, N. Alhashmi, A. Al Sonbul, W.

Sewairi, A. Qari, E. Abdallah, E., M. Al-Owain, S. Al Motywee, H. Al-Rayes, M. Hashem, H. Khalak, L. Al-Jebali, F. S. Alkuraya. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. 43, 1186-1188 (2011).

[0214] 24. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. 28, 313-314 (2001).

[0215] 25. M. Napirei, H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, T. Moroy, Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. Nat. Genet. 25, 177-181 (2000).

[0216] 26. S. Gupta, M. J. Kaplan, The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. Nat. Rev. Nephrol. 12, 402-413 (2016).

[0217] 27. R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, D. Kitamura, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. PloS one 8, e80223 (2013).

[0218] 28. J. Rossaint, J. M. Herter, H. Van Aken, M. Napirei, Y. Doring, C. Weber, O. Soehnlein, A. Zarbock, Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. Blood 123, 2573-2584 (2014).

[0219] 29. A. Bradley, K. Anastassiadis, A. Ayadi, J. F. Battey, C. Bell, M. C. Birling, J. Bottomley, S. D. Brown, A. Burger, C. J. Bult, W. Bushell, F. S. Collins, C. Desaintes, B. Doe, A. Economides, J. T. Eppig, R. H. Finnell, C. Fletcher, M. Fray, D. Frendewey, R. H. Friedel, F. G. Grosveld, J. Hansen, Y. Herault, G. Hicks, A. Horlein, R. Houghton, M. Hrabe de Angelis, D. Huylebroeck, V. Iyer, P. J. de Jong, J. A. Kadin, C. Kaloff, K. Kennedy, M. Koutsourakis, K. C. Lloyd, S. Marschall, J. Mason, C. McKerlie, M. P. McLeod, H. von Melchner, M. Moore, A. O. Mujica, A. Nagy, M. Nefedov, L. M. Nutter, G. Pavlovic, J. L. Peterson, J. Pollock, R. Ramirez- Solis, D. E. Rancourt, M. Raspa, J. E. Remacle, M. Ringwald, B. Rosen, N. Rosenthal, J. Rossant, P. Ruiz Noppinger, E. Ryder, J. Z. Schick, F. Schnutgen, P. Schofield, C. Seisenberger, M. Selloum, E. M. Simpson, W. C. Skarnes, D. Smedley, W. L. Stanford, A. F. Stewart, K. Stone, K. Swan, H. Tadepally, L. Teboul, G. P. Tocchini- Valentini, D. Valenzuela, A. P. West, K. Yamamura, Y. Yoshinaga, W. Wurst, The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. Mamm. Genome 23, 580-586 (2012).

[0220] **실시예 2: 치료를 위한 DNase1L3 및 변이형의 개발 및 사용**

[0221] **도입**

[0222] 통제되지 않는 염증은 과다 병태를 유발한다 (*1*). 호중구 세포외 트랩 (NET)은 독성 단백질로 장식된 DNA 필라멘트이다 (*2*). NET는 미생물 감염에 대하여 보호하지만, 과도한 NET 형성은 염증 및 자가면역 질환을 촉발하고 악화시킨다 (*3*). 혈액에서 나타나는 DNA-분해 효소, DNase1 (D1)은, 시험관내 및 생체내에서 NET를 무력화하기 위해 폭넓게 사용되고 있다. 실로, 낭포성 섬유증 (CF)을 위한 FDA-승인 약물 (도르나제 알파), 재조합 인간 D1의 주입은, 다양한 질환 모델에서 NET의 병리적 영향을 막고 (*3*), 이는 예방적 치료를 위한 D1의 사용을 지지한다.

[0223] *DNase1-유사 3은 NET-관련 질환에 대한 신규 약물 후보물질임*

[0224] 실시예 1에서, 본 발명자들은, D1에 추가로, DNase1-유사 3 (D1L3) 또한 NET를 분해함을 확인하였다. 두 효소 모두 염증 반응 동안 혈액 및 조직 항상성을 유지한다. 간단히, 본 발명자들은, NET가, 멸균 뿐만 아니라 감염 조건 하에, 염증의 특질인 호중구증가증 동안 혈관 내에 생성됨을 보여주었다. D1 및 D1L3은 NET를 분열시키고, 따라서 NET의 DNA-필라멘트의 혈관 클롯으로의 응집을 막는다. D1 및 D1L3의 부재 하에, NET의 클롯은 혈류를 막고 기관 손상 및 사망을 유발한다. NET-클롯은 혈소판 또는 피브린에 대해 독립적으로 형성되고, 따라서 종래의 항-혈전 치료에 대해 저항성이다. 따라서, 본 발명자들은 혈관 폐색에 대한 신규한 메커니즘으로서 NET의 클롯을, 또한 NET에 대한 새로운 예방적 치료로서 D1L3을 알아내었다 (실시예 1 참조).

[0225] D1 및 D1L3은, DNase1-유사 1 (D1L1) 및 DNase1-유사 2 (D1L2)와 함께, DNase1-단백질 패밀리에 속한다 (*4*). D1 및 D1L3은, 인간, 영장류, 및 설치류를 포함한 다양한 종에서 발현된다. D1은 위장관 및 외분비샘에서 우세하게 발현되지만 (*5*), 조혈 세포, 즉 대식세포 및 수지상 세포는 D1L3을 생성한다 (*6, 7*). 본 발명자들은 마우

스 및 인간의 혈청에서 저농도의 두 DNase를 확인하였지만 (실시예 1, 도 14), 순환에서 D1 및 D1L3의 기원은 알려져 있지 않다 (7, 8). D1은 우선적으로 무단백질 DNA (예: 박테리아 DNA, 플라스미드 DNA)를 분열시키지만, D1L3은, 진핵 세포의 핵에서 통상적으로 나타나는, DNA 및 히스톤의 복합체, 크로마틴을 표적화한다 (*7, 9, 10*). D1 활성은 단량체 액틴으로의 결합에 따라 억제되고, 이는 생리학적 염 농도에 민감하다 (*11-13*). 추가로, D1은 N40 (신호 펩티드가 없는 성숙 효소에서 N18에 상응함) 및 N128 (N106)에서 글리코실화되고, 이는 효소를 혈청 프로테아제에 의한 불활성화에 대해 저항성으로 만든다 (*9*). 반면, D1L3은 글리코실화 및 액틴-결합 자리가 없고, 이는 각각 여러 프로테아제에 대한 그의 감수성 및 액틴에 대한 저항성을 유발한다 (*9*).

[0226] D1은 위장관의 체액 및 소변에서 최초로 발견되었고, 이는 식품 섭취로부터 DNA의 소화에 참여한다. 본 발명자들은 본 개시내용의 과정에서, 전신 투여된 DNase1 (예: 복강내 또는 정맥내 주사를 통해)이 순환에서 비교적 짧은 반감기를 갖고 효소 활성 형태로 소변으로, 또한 예상외로 담즙으로 분비됨을 관찰하였다. 그의 담즙액으로의 분비는, 전신 DNase1 치료를 통해 담관에서 세포외 DNA 및/또는 NET를 표적화할 기회를 열어준다.

[0227] D1L3은 프로그래밍된 세포 사망과 관련하여 최초로 기재되었다 (*14*). D1L3은 2개의 핵 국소화 자리 (NLS1, NLS2)를 특징으로 한다. NLS2는 D1L3에 있어 독특하고 D1에는 존재하지 않는 C-말단 테일 내에 매립되어 있다. 두 NLS 모두 아팝토시스 동안 효소를 핵에 대해 표적화한다 (*14*). 실로, 세포내 D1L3은 생체내에서 아팝토시스 및 괴사성 세포 내에서 핵 DNA의 단편화를 필요로 한다 (*15*). D1L3은, 세포외 DNA, 즉 지질-캡슐화된 DNA (트랜스펙션에서 나타나는 것 등), 및 아팝토시스 바디 내의 크로마틴을 분해하기 위해 그의 C-말단 테일을 필요로 한다 (*7, 10*). 트랜스펙션에서, cDNA 및 양이온성 지질은 표적 세포의 혈장 막을 통해 침투하는 복합체를 형성한다. D1L3은 트랜스펙션을 방해하고, C-말단 테일이 이 기능에 있어 중요하다 (*10*). D1L3의 생리학적 기질은, 아팝토시스 세포로부터의 크로마틴으로 채워진 지질 소포, 아팝토시스 바디이다 (*7*). 여기서, C-말단 테일은 D1L3이 아팝토시스 바디의 지질 막을 통해 침투하고 크로마틴 로드를 분해할 수 있게 한다. 중요하게, C-말단 테일은 또한, D1L3에 의한 무지질 세포외 크로마틴의 분해를 위해 요구된다(7). C-말단 테일은 세포외 공간에서 D1L3의 기능에 있어 중요한 것으로 믿어진다.

[0228] hD1은 동물 모델, 주로 마우스에서 NET를 효과적으로 표적화하지만, 각각 CF (*16*) 및 기종 (*17*)의 임상 시험에서는 제한된 치료적 효과를 나타내거나 치료적 효과를 나타내지 않았다. NET는 CF에서 형성되고 (*18*), 이는 야생형 hD1이 환자에서 NET를 표적화하기에 최적이 아님을 나타낸다. 과다활성 변이형이 D1의 치료적 한계를 피하기 위해 생성되었지만, 이들의 임상적 제조는 도전적이다 (*12*). 특히, NET-DNA는 히스톤을 함유하고, 크로마틴과 같이 구조적으로 조직화된다 (*2*). 따라서, 본 발명자들은, 크로마틴의 효율적인 분해가 NET에 대한 최적 치료를 위해 요구됨을 추측한다.

[0229] 기종 환자의 hD1 및 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA, 알테플라제)의 조합 치료가 기재되었다 (*17*). tPA는 D1이 시험관내에서 크로마틴을 분해할 수 있기 때문에 (*19*), 데이터는 본 발명자들의 가설과 일치한다. 본원에 참조로 포함되는 US 9,642,822는 추가로, NET를 치료 표적화하기 위한 tPA 및 D1의 조합 치료를 개시한다 (*20*). 그러나, tPA로의 치료는 통상적으로 그의 피브린용해 활성으로 인해 증가된 출혈 위험과 관련된다 (*17*). D1L3은 환자를 출혈 위험에 놓이게 하지 않으면서 NET를 표적화하기 위한 보다 안전한 전략을 제공할 수 있지만, D1L3 단백질로의 치료는 탐구되지 않았다.

[0230] *아미노산 전달을 통한 DNase1 및 DNase1-유사 3 변이형의 엔지니어링*

[0231] 본 실시예에서, 본 발명자들은 세포외 크로마틴 (NET 포함)에 대한 치료를 위해 엔지니어링된 D1 및 D1L3의 변이형을 생성하였다. 변이형을 디자인하기 위해, 본 발명자들은, 인간 D1L3이 크로마틴을 분해하는 능력은 인간 D1에 부재하는 개별 아미노산 및/또는 아미노산 서열에 의해 코딩됨을 가정하였다. 또한, 본 발명자들은, 인간 D1L3으로부터의 이들 개별 아미노산 및/또는 아미노산 서열의 D1로의 전달이 증가된 크로마틴-분해 활성을 갖는 과다활성 D1 변이형을 생성함을 추측하였다. 유사하게, 효소적 특성 (예: 글리코실화)이 D1로부터 D1L3으로 전달될 수 있다. 본 발명자들의 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 종래의 아미노산 돌연변이를 사용하였고, DNase1-단백질 패밀리로부터의 DNase의 변이형을 엔지니어링하기 위한 신규한 빌딩-블록 (BB) 기술을 개발하였다.

[0232] D1 및 D1L3의 변이형을 생성하기 위해, 본 발명자들은 시험관내 발현 시스템 [예: 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 세포, 피키아 파스토리스]을 사용하였다. 효소 활성을 판독치로서 고분자량 (HMW)-DNA의 분해를 사용하여 특성화하였다 (도 16). 본 발명자들은 하기 두가지 유형의 HMW-DNA를 선택한다: (a) 연어 정소로부터 단리된 이중-가닥 DNA (dsDNA). HMW-dsDNA의 분해를 지모그래피에 의해 분석하였다; (b) HEK293 세포로부터의 정제된 핵의 크로마틴. 그의 분해를 분석하기 위해, HMW-크로마틴을 먼저 DNase 변이형과 인큐베

이션시킨 후, DNA 단리 및 아가로스 겔 전기이동 (AGE)을 통한 가시화가 이어졌다. 크로마틴 분해를 저분자량 (LMW)-DNA에 의해 검출하였다. 이 셋업에서, 야생형 인간 D1 (서열 번호: 1)은 야생형 D1L3 (서열 번호: 2)에 비해 대략 100배 더 높은 dsDNA 분해 활성을 갖지만, 야생형 D1L3은 야생형 D1에 비해 대략 100배 더 효율적으로 크로마틴을 분해한다 (도 16). 본 발명자들은, 크로마틴 분해에 있어 D1 및 D1L3의 상승적 효과를 확인하였지만, dsDNA는 그렇지 않았다. D1 및 D1L3이 10:1 또는 1:1의 비율로 혼합되는 경우, 본 발명자들은, 각각의 D1 또는 D1L3 단독에 비해, 증가된 크로마틴 분해를 관찰하였다 (도 16). 따라서, 본 발명자들은 D1 및/또는 D1L3 변이형에 대해 스크리닝하였고, 이는 증가된 크로마틴 및/또는 dsDNA 분해 활성을 나타낸다.

[0233] D1-단백질 패밀리의 구성원에 대한 생체내-발현 시스템을 사용하여, 혈관내 NET를 분해하도록 선택된 D1 및 D1L3 변이형을 추가로 시험하였다. 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 PCT/EP2018/051444를 참조한다. 시스템은 하기 두 성분을 기반으로 한다: (a) 수용자 마우스에서 D1, D1L3, 및 그의 변이형의 cDNA로의 간세포의 안정적인 생체내 트랜스펙션을 가능하게 하는 발현 플라스미드, 및 (b) 혈청에서 DNase 활성의 부재를 특징으로 하는 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 결핍 마우스. 간단히, 후보물질 DNase의 cDNA를 간 발현 벡터로 클로닝한다. 다음으로, 벡터를, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF)에 대해 코딩하는 뮤린 *Csf3*의 cDNA와 함께 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 결핍 마우스에서 공동-발현시킨다. *Csf3*의 발현은 부수적 혈관내 NET-형성을 갖는 호중구증가증을 유도하고, 이는 또한 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스에서 혈관 내의 소화되지 않은 NET의 응집 및 사망을 유발한다. 약물 후보물질을 규명하기 위해, 본 발명자들은 NET를 효율적으로 분해하고 그에 따라 이 모델에서 이환 및 사망을 막는 D1, D1L3, 및 그의 변이형을 스크리닝하였다.

[0234] **결과**

[0235] *종래의 아미노산 치환을 통한 DNase1 변이형의 엔지니어링*

[0236] 본 발명자들의 중심 가설은, 크로마틴을 분해하는 인간 D1L3의 능력이 D1에 존재하지 않는 아미노산에 의해 매개된다는 것이다. 서열 정렬은, 인간 D1 및 인간 D1L3에서 아미노산의 44%가 동일함을 보여주었다 (도 17). 본 발명자들은 D1 및 DL3 변이형을 생성하기 위해 단지 가변 아미노산 (56% 비공유 아미노산)을 독점적으로 돌연변이시켰다.

[0237] D1L3은 9.35의 등전점을 갖는 양이온성 단백질이지만, D1 및 다른 구성원은 보다 염기성인 단백질이다. 따라서, 본 발명자들은, D1L3의 양이온성 성질이 효소가 크로마틴을 분해할 수 있게 함을 추측하였다. 서열 정렬을 통해, 본 발명자들은, D1에 부재하는 가변 아미노산에서의 37개의 아르기닌 또는 리신 잔기를 규명하였다 (도 17). 이들 아미노산 잔기는 서열 번호: 2에 대하여 아미노산 위치 29 (신호 펩티드를 갖는 위치 9), 39 (9), 47 (7), 50 (30), 66 (46), 74 (54), 77 (57), 80 (60), 81 (61), 92 (72), 109 (89), 114 (94), 115 (95), 163 (143), 176 (156), 180 (160), 199 (179), 200 (180), 203 (183), 208 (188), 212 (192), 226 (206), 227 (207), 239 (219), 250 (230), 259 (239), 262 (242), 280 (260), 285 (265), 291 (271), 292 (272), 297 (277), 298 (278), 299 (279), 301 (281), 303 (283), 304 (284)에 위치한다.

[0238] D1L3에서 26개의 이들 부가적 아르기닌 또는 리신 잔기는 D1 (서열 번호: 1)에서 하기 아미노산 위치에 상응한다: 31 (신호 펩티드를 갖는 위치 9), 41 (19), 49 (40), 52 (30), 68 (46), 76 (54), 79 (57), 81 (59), 92 (70), 109 (87), 114 (92), 115 (93), 164 (142), 177 (155), 181 (159), 200 (178), 201 (179), 204 (182), 209 (187), 213 (191), 227 (205), 239 (217), 250 (228), 259 (237), 262 (240), 및 280 (260). 추가로, D1L3은 아르기닌 또는 리신 잔기의 3 자리 삽입을 특징으로 한다: R80, K226 및 3개의 아르기닌 및 6개의 리신 잔기를 특징으로 하는 C-말단 테일 (서열 번호: 2에서 아미노산 위치 282 이후).

[0239] 본 발명자들은, 야생형 D1로 하기 돌연변이를 도입함으로써 D1L3 내지 D1의 코어 바디의 부분인 아르기닌 및 리신 잔기를 전달하여, D1의 28개 변이형을 생성하는 것을 목표로 하였다 (도 18): 서열 번호: 1에 대하여 Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K, 및 K280M.

[0240] 본 실시예에서, 본 발명자들은 28개 중 23개의 아미노산 치환을 함유하는 D1 변이형을 생성할 수 있었다. 본 발명자들은 HEK293 세포에서 이들 D1-변이형의 cDNA를 발현시키고, 배양물 상청액에서 dsDNA 및 크로마틴 분해 활성을 분석하였다. 본 발명자들은 하기 아미노산 변형이 크로마틴 분해 활성을 부분적으로 증가시킴을 관찰하였지만, dsDNA 분해에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다 (도 19): Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R. 흥미롭게도, 각각 인간 D1의 아미노산의 79% 및 78%를 공유하는 마우스

및 래트 D1 (서열 번호: 4)은, Q31R, Q49K, 및 Q79K를 포함한, 분석된 아미노산 치환 중 여럿을 특징으로 한다 (도 20). 뮤린 D1 및 인간 D1을 발현하는 HEK293 세포로부터의 상청액의 분석은, 인간 D1에 비해, 증가된 크로마틴 분해 활성을 갖는다 (도 21). 본 발명자들은 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스에게 *Csf3* 및 뮤린 D1 (*mDnase1,* 서열 번호: 3), 인간 D1 (*hDnase1,* 서열 번호: 1), 또는 비어있는 대조군 플라스미드 (*Ctrl*)의 혼합물을 주사하였다. 대조군 플라스미드를 수용한 마우스는 7일 내에 사망하였지만, 뮤린 D1의 발현은 적어도 28일 동안 완전한 보호를 제공하였다 (도 21). 예상외로, 인간 D1의 발현은 사망으로부터의 단지 부분적 보호를 나타내었고, 동물의 절반 초과가 14일 내에 사망하였고 (도 21), 이는 인간 D1이 뮤린 D1에 비해 혈관내 NET 분해에 있어 덜 효율적임을 나타낸다. 이제, 본 발명자들은 인간 D1에서 Q31R, Q49K, Q79R, 및 W209R을 돌연변이시켜 뮤린-유사 D1-변이형 (서열 번호: 5)을 생성하였다. 6개 돌연변이 모두 (Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, G262K) 래트-유사 D1-변이형 (서열 번호: 6)을 생성하도록 이루어졌다. 두 설치류-유사 D1 변이형 모두를 간세포 발현 벡터로 클로닝하고 *Csf3*과 함께 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스로 전달하였다. 본 발명자들은, D1의 뮤린- 및 래트-유사 변이형으로의 유전자 치료가 NET 매개 혈관 폐색 및 사망에 대한 완전한 보호를 제공하였음을 관찰하였다 (도 22). 중요하게, 설치류-유사 인간 D1-변이형의 시험관내 발현은 증가된 크로마틴 분해 활성을 나타내었다 (도 22). 총체적으로, 데이터는, (a) 인간 D1이 생체내에서 제한된 NET 분해 능력을 갖고; (b) 인간 D1L3으로부터 인간 D1로의 다중 양이온성 아미노산 전달은 과다활성 변이형을 생성함을 보여준다.

[0241] D1의 과다활성 변이형을 생성하기 위해 여러 시도가 이루어졌다 (*6, 12, 13, 21-29*). 본 발명자들은, 야생형 인간 D1의 282개 중 82개 아미노산을 변경시킨 184개의 돌연변이를 확인하였다 (도 23). 야생형 인간 D1 및 인간 D1L3의 아미노산 서열의 정렬은, 야생형 인간 D1L3에 이미 존재하는 인간 D1에서의 3개의 기능획득 돌연변이를 나타내었다 (도 23): Q31R (신호 펩티드가 없는 D1에서 Q9R에 상응함), T227K (T205K), 및 A136F (A114F). 돌연변이 Q31R 및 T227K는 hD1의 DNA-결합 특성을 변경시키고 그에 따라 과다활성을 유발할 수 있지만, A136F는 단량체 액틴에 의한 억제에 대한 저항성을 부여한다 (*21-24, 26, 29*).

[0242] 본 발명자들은 Q31R/T227K/A136F의 조합을 갖는 새로운 D1-변이형 (서열 번호: 7)을 디자인하였고, 그의 효소 활성을 야생형 D1 (서열 번호: 1)과, 뿐만 아니라 Q31R, T227K, A136F에서의 단일 돌연변이, 또는 Q31R 및 T227K에서의 조합 돌연변이를 갖는 D1-변이형 (서열 번호: 8)과 비교하였다. 본 발명자들은 트랜스펙션된 HEK293 세포의 배양물 상청액에서 dsDNA 및 크로마틴-분해 활성을 특성화하였다. 본 발명자들은 Q31R 및 T227K의 단일 또는 조합 돌연변이를 갖는 D1-변이형 사용시 dsDNA-분해 활성에 있어 큰 차이가 없음을 관찰하였다 (도 24). 흥미롭게도, 크로마틴은 각각 A136F 돌연변이체 및 Q31R/T227K/A136F의 조합 돌연변이에서 부분적으로 및 완전히 분해되었다 (도 24). 다음으로, 본 발명자들은, D1의 Q31R/T227K/A136F 변이형이 호중구 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$에서 NET 매개 치명적 혈관 폐색을 막을 수 있는지를 시험하였다. DNase가 없는 대조군 플라스미드를 수용한 모든 마우스는 사망하였지만, D1-변이형 (서열 번호: 7)을 발현하는 모든 마우스는 곤란 징후를 나타내지 않으면서 실험 종료시까지 생존하였다 (도 24). 정제된 단백질 사용시, 본 발명자들은, 삼중 아미노산 치환이 dsDNA 분해 활성에서의 검출가능한 차이 없이 야생형 D1에 비해 대략 10-20배로 크로마틴 분해 활성을 증가시킴을 관찰하였다 (도 25). NET 및 핵으로부터의 크로마틴은 액틴을 함유한다 (*30, 31*). 데이터는, D1 변이형에 의한 크로마틴 분해가 양이온성 아미노산 치환 뿐만 아니라 액틴 저항성을 부여하는 돌연변이 (야생형 D1L3에 존재하는 두가지 특징)를 필요로 함을 시사한다. 이 개념을 추가로 확증하기 위해, 본 발명자들은 돌연변이 A164K 및 A136F의 조합을 특징으로 하는 D1 변이형 (서열 번호: 9)을 생성하였다. 실로, 본 발명자들은, 두 돌연변이 모두를 갖는 D1 변이형에서 크로마틴 분해 활성의 강한 증가를 관찰하였고 (도 26), 이는 본 발명자들의 가설을 지지한다.

[0243] *DNase1-단백질 패밀리 구성원의 빌딩 블록 엔지니어링의 개발*

[0244] D1L3은 부가적 아미노산: Q282 후에 시작하는 C-말단 테일 (NH_2-SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS-COOH) (서열 번호: 33), 및 S79/R80 및 K226에서의 효소 내의 2개의 자리를 함유하는 3개의 자리를 특징으로 한다 (도 17). D1L3의 C-말단 테일의 23개 아미노산은 D1의 C-말단에 부착되었다 (*10, 28*). 본 발명자들은, DNase1의 위치 226에서의 아르기닌-잔기의 삽입 (A226_T227insK)은 dsDNA 분해에 대한 감소된 효소 활성을 갖는 D1-변이형을 생성함을 관찰하였지만, 이러한 효과가 치환 T227K에서는 관찰되지 않았다 (도 27). 따라서, K/R-잔기의 삽입은 D1 기능 감소 위험을 함께 갖는다. 대전된 아미노산의 삽입은 국소 단백질 구조에 영향을 줄 수 있다. D1이 하나의 아미노산 사슬을 포함하는 구상(globular) 효소임을 고려하여 [도 28, (*27*)], 이러한 국소 변경은 전체 효소를 불활성으로 만들 수 있음을 생각할 수 있다. 실로, D1 아미노산 서열 전반에 걸친 수많은 비보존적 돌연변이는 효소를

불활성화시킨다 (*12, 25, 26*). 본 발명자들은, 단일 아르기닌 및 리신 단기 뿐만 아니라 이웃한 아미노산 서열을 이식하는 것에 의한 국소 단백질 구조의 전달은 불활성화 위험을 감소시킴을 가정하였다. 본 발명자들은 삽입에 대한 앵커로서 사용될 수 있는 A226_T227insK 부근의 보존 아미노산을 D1 및 D1L3 내에서 검색하였다. 본 발명자들은 각각 N-말단 및 C-말단 앵커로서 D1에서의 D223/T224/T225 모티프 및 보존 T229를 규명하였다 (도 27). 본 발명자들은 D1 내의 3개 아미노산 (ATP)을 D1L3으로부터의 K226을 포함한 4개 아미노산 (VKKS)으로 대체하였다 (가상환경에서(in silico)). HEK239 세포에서 새로운 D1-변이형 (A226_P228delinsVKKS)의 cDNA의 발현은 야생형 D1과 비교시 유사한 dsDNA-분해 활성을 갖는 기능적으로 활성인 효소를 나타내었다 (도 27). 데이터는, 보존 아미노산 사이의 가변 아미노산이 D1과 D1L3 사이에서 상호교환가능함을 시사한다.

[0245] 본 발명자들은 D1-단백질 패밀리의 하나의 구성원으로부터 또 다른 것으로의 효소적 특성의 전달을 위한 빌딩 블록-기술을 개념화하였다. 하기 기본적 단계가 기술을 특성화한다 (도 29):

[0246] (1) 공여자 및 수용자 DNase의 단백질-단백질 정렬을 제공함.

[0247] (2) 전달을 위한 가변 아미노산 또는 아미노산 서열 (빌딩 블록)을 규명함.

[0248] (3) 각각 빌딩 블록 상류 및 하류에 위치하는 공여자 및 수용자 DNase에서의 보존 아미노산 (앵커)을 규명함.

[0249] (4) 수용자 DNase에서의 C- 및 N-앵커 사이의 빌딩 블록에 대해 코딩하는 cDNA를, 공여자 DNase에서의 앵커 사이의 cDNA로 대체함.

[0250] (5) 키메라 DNase의 cDNA를 합성한 후, 바람직하게는 공여자 및 수용자 DNase 둘 다 결핍된 수용자 유기체 (예: CHO 세포 또는 $Dnase1^{-/-}Dnase113^{-/-}$ 마우스)로 시험관내/생체내 발현시킴.

[0251] *빌딩 블록 기술을 통한 DNase1 변이형의 엔지니어링*

[0252] 인간, 마우스, 래트, 및 침팬지로부터의 D1 및 D1L3의 다중-종 정렬 (도 30)은, N- 및 C-말단 앵커가 이들 종 사이에서 보존됨을 보여주었다. 이들 앵커 아미노산 또는 아미노산 서열은, 빌딩 블록 #49로서 상기 언급된 실험으로부터의 D1 (ATP) 및 D1L3 (VKKS)에서의 아미노산 서열을 포함하는 가변 아미노산 및 아미노산 서열의 62개 빌딩 블록을 플랭킹한다 (도 31).

[0253] D1L3으로부터 D1로의 이들 빌딩 블록의 전달은 하기 돌연변이를 갖는 D1-변이형을 생성한다 (도 31): 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136_I137delinsFV, R139W, F141_F144delinsQSPH, E146_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157_A158delinsTT, G160_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170_D171delinsVE, L174T, Q177_K179delinsKHR, G181_L182delinsKA, D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA, S204_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N, V238_A239delinsLR, M241_A246delinsQEIVSS, D250K, A252_P254delinsNSV, N256D, A259_A260delinsKA, G262K, S264_L267delinsTEEE, Q269_I271delinsLDV, Y275F, V279_M280delinsFK, 및 K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

[0254] 빌딩 블록이 D1로부터 D1L3으로 전달되는 경우에는 하기 D1L3-변이형이 생성된다 (도 31): M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F_136VdelinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156_T157delinsAA, E159_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169_E170delinsYD, T173L, K176_R178delinsQEK, K180_A181delinsGL, N183_F186delinsDVML, P198_A201delinsRPSQ, K203_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220_E221delinsSA, V225_S228delinsATP, N230H, L238_R239delinsVA, Q241_S246delinsMLLRGA, K250D, N252_V254delinsALP, D256N, K259_A260delinsAA, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM, 및 Q282_S305delinsK.

[0255] 다음으로, 본 발명자들은, 다중 인접 빌딩 블록 (클러스터)의 전달로 시작하여, 개별 빌딩 블록의 전달로 계속되고, 개별 아미노산 또는 다중 빌딩 블록의 조합의 새로운 키메라 효소로의 전달로 종료되는, D1L3 활성을 갖는 D1-변이형을 엔지니어링하기 위한 순차적 접근을 개념화하였다 (도 32). 이 접근은 개시 스크리닝에서 D1-D1L3-키메라의 수를 감소시킨다.

[0256] 본 발명자들의 방법을 시험하기 위해, 본 발명자들은, D1L3으로부터의 개별 빌딩 블록 또는 빌딩 블록 클러스터의 클러스터를 포함하는 총 19개의 D1-변이형을 디자인하였다 (도 31). 이들 D1-변이형은 하기 아미노산 돌연변이를 특징으로 한다: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS/I30_T32delinsVRS/E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK/Y54C/I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK/S65_K72delinsSNNRICPI/L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT/R101Q/L103A/V105L, R107_Q110delinsKEKL/A113_S116delinsVKRS/Y118H/D120H, G122_N128delinsYQDGDA/T130S/N132S, A136_I137delinsFV, R139W/F141_F144delinsQSPH/E146_E149delinsAVKD/A151V/V153I/A157_A158delinsTT/G160_A162delinsETS/A164K, A168E/Y170_D171delinsVE/L174T, Q177_K179delinsKHR/G181_L182delinsKA/D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N/V238_A239delinsLR/M241_A246delinsQEIVSS/D250K/A252_P254delinsNSV, N256D/A259_A260delinsKA/G262K/S264_L267delinsTEEE/Q269_I271delinsLDV, 및 Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

[0257] 다음으로, 본 발명자들은 cDNA를 발현 벡터로 클로닝하였고, 이는 HEK293 세포로 트랜스펙션되었다. 세포 상청액의 분석은 모든 샘플에 의한 dsDNA 분해를 나타내었다 (도 33). 또한, 본 발명자들은, D1L3으로부터 D1로의 빌딩 블록 (BB) 11 (서열 번호: 10 참조), BB 12-14 (서열 번호: 11 참조), BB 26 (서열 번호: 12 참조), BB 41-48 (서열 번호: 13 참조), 및 BB 49 (서열 번호: 14 참조)의 전달이 증가된 크로마틴 분해 활성을 갖는 효소를 제공함을 관찰하였다. 모든 이들 키메라 효소는 야생형 D1에 비해 동일한 또는 보다 큰 dsDNA 기질 분해 활성을 나타내었다. D1L3으로부터의 빌딩 블록 11 (서열 번호: 2에서 RNSRRGI) 및 49 (서열 번호: 2에서 VKKS)는 각각, D1에 존재하지 않는 R80/R81 및 K227을 함유한다. D1L3-BB 클러스터 41-48 (서열 번호: 2로부터 PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE)은 D1에서의 그의 대응부 (서열 번호: 1의 RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA)에 비해 5개의 부가적 아르기닌 및 리신 잔기를 특징으로 한다. 이들 부가적 양이온성 아미노산이 과다활성의 원인이 될 수 있다. D1-빌딩 블록 12-14 및 26은 서열 번호: 1에서 아미노산 서열 H86 내지 R95 및 A136 내지 V138을 함유하고, 이는 D1-억제제 액틴의 결합을 위해 요구되는 아미노산 잔기를 포함한다. 따라서, 액틴과 상호작용하지 않는, D1L3으로부터의 각각의 빌딩 블록으로의 이들 아미노산 서열의 대체는, D1의 액틴-저항성 변이형을 생성할 가능성이 있다. 본 발명자들은 이제, 하나의 신규 D1-변이형에서 BB 11, 14, 26, 41-19를 조합하였다 (서열 번호: 15). 본 발명자들은, 이들 기능획득 BB의 조합이 D1 변이형의 크로마틴 분해를 야생형 D1L3의 수준까지 증가시킴을 관찰하였다 (도 33). 따라서, BB 기술은 과다활성 D1 변이형을 생성하기 위한 강력한 방법을 제공한다.

[0258] *빌딩 블록 기술을 통한 DNase1-유사 3 변이형의 엔지니어링*

[0259] D1L3의 BB 클러스터 60 내지 62는 그의 C-말단 테일로부터의 아미노산을 포함한다 (도 33). 테일은 L281 후에 시작되고 (도 34) 아미노산 서열 QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (서열 번호: 40)을 포함하고, 이는 2-부분 NLS를 포함한다. D1L3은 트랜스펙션 시약 및 아팝토시스 바디를 포함한 지질 소포 내의 DNA 분해를 위한 C-말단 테일을 필요로 한다 (*7, 10, 28*). 또한, C-말단 테일은 D1L3에 의한 무지질 및 무세포 크로마틴의 분해를 위해 요구된다 (*7*). 두 결과는 Q282 이후 아미노산이 없고 따라서 이들 기질 분해에 있어 불활성인 D1L3-변이형에 기초한 것이다. 윌버트(Wilbert) 등은 D1의 C-말단에 D1L3의 C-말단 연장을 부착하였고, 따라서 지질 소포 내에서의 DNA의 분해 능력을 D1에 전달하였다 (*10, 28*). 여기서, 본 발명자들은, C-말단 D1L3으로부터 D1로의, 또한 그 반대의 전달을 위한 본 발명자들의 BB 기술을 사용하였다. 본 발명자들은, N-앵커로서, D1에서 말단 베타-시트의 전방에 위치하는 보존 S272/D273/H274 모티프를 사용하였고 (도 28), D1과 D1L3 사이에서 말단 3개 빌딩 블록을 교환하였다 (도 34). 이 접근은, 돌연변이 Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS로 인한 D1L3의 C-말단 연장을 특징으로 하는 D1-변이형 (서열 번호: 16) 및 돌연변이 F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK로 인한 절단된 D1L3-변이형 (서열 번호: 17)을 생성하였다. 본 발명자들은 HEK293 세포에서 변이형 및 야생형 효소 둘 다를 발현시키고, 상청액에서 DNase 활성을 특성화하였다. 예상외로, 본 발명자들은, D1L3의 C-말단을 갖는 D1-변이형이 크로마틴을 분해하지 않았지만, 야생형 효소의 C-

말단이 없는 D1L3-변이형은 여전히 크로마틴을 분열시킬 수 있었음을 관찰하였다 (도 34). 사실상, 본 발명자들은, 이 D1L3 변이형으로 증가된 크로마틴 분해 활성을 관찰하였다. 이 결과를 확증하기 위해, 본 발명자들은 생체내에서 D1L3의 절단된 변이형을 시험하였고, 그의 발현이 호중구 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 마우스에서 NET 매개 사망으로부터 보호함을 관찰하였다 (도 34). 결론적으로, C-말단의 결실은 무지질 및 무세포 크로마틴을 분해하는 D1L3의 기능을 억제하지 않고 오히려 증가시킨다.

[0260] 혈청 프로테아제, 특히 플라스민은, D1L3을 분해하지만, D1은 분해하지 않는다 (*9*). 프로테아제 활성에 대한 D1L3의 민감성은 임상 실용에서의 그의 사용을 제한할 것이다. 글리코실화된 단백질은 프로테아제에 대한 증가된 보호를 나타낸다 (*32*). 소프트웨어 분석을 사용하여, 본 발명자들은 인간 및 뮤린 D1L3에서 글리코실화에 대한 공지된 공통 서열을 규명할 수 있었다. 인간 D1의 소프트웨어 분석은, 가상환경에서 및 시험관내에서 관찰시, 2개의 글리코실화 자리를 나타내었다 (*9*). 본 발명자들은, D1L3의 글리코실화된 변이형이 혈청 프로테아제에 대한 개선된 저항성으로 인해 순환에서 반감기를 증가시킬 수 있음을 가정하였다. 글리코실화 자리는 N-X-T/S의 최소 공통 서열을 필요로 한다. D1은 2개의 공지된 N-글리코실화 자리, N40 (신호 펩티드가 없는 N18) 및 N128 [(신호 펩티드가 없는 N106, (*9*)]을 함유한다. D1-글리코실화 자리 N40-X-T42 및 N128-X-T130의 아미노산은 D1L3에서 D38-X-N40 및 A127-X-V129에 상응한다. 따라서, D1L3의 글리코실화된 버전은 아미노산 돌연변이 D38N, N40T, A127N, 및 V129T (서열 번호: 18 참조)를 특징으로 할 것을 필요로 한다. 이들 아미노산 치환을 삽입하기 위해 종래의 점 돌연변이를 사용하는 것 대신에, 본 발명자들은 BB 기술을 사용하여 D1-글리코실화 자리 N40-X-T42 (이는 BB4 (서열 번호: 1에서 MSNATLVSY) 내에 있음), 및 N128-X-T130 (이는 BB 클러스터 23-25 (서열 번호: 1에서 GCEPCGNDTFN) 내에 있음)를, D1로부터 D1L3으로 전달하였다 (도 35). 따라서, 본 발명자들은, 각각 돌연변이 Q36_I45delinsMSNATLVSYI (서열 번호: 19) 및 Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (서열 번호: 20)을 특징으로 하는 2개의 새로운 D1L3 변이형을 생성하였다. 본 발명자들은 이들 D1L3 변이형을 WT 효소와 함께 HEK293 세포에서 발현시켰다. 다음으로, 본 발명자들은 WT 효소의 C-말단 테일에서 에피토프를 표적화하는 폴리클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 상청액을 분석하여 WT 효소 뿐만 아니라 D1L3 변이형을 검출하였다. 예상과 같이, D1L3 변이형은, WT 효소와 비교할 때, 아마도 글리코실화에 대한 보다 고분자량의 밴드를 나타내었다. (도 35). N40 또는 N128에서 글리코실화를 갖는 D1L3 변이형은 이들의 크로마틴 분해 활성을 보유하였다 (도 35). 결론적으로, 데이터는, BB 기술을 사용하여 D1로부터 D1L3으로 글리코실화 자리를 전달할 수 있고, 이는 환자에서 증가된 프로테아제-저항성 및 반감기를 갖는 D1L3 변이형을 생성할 수 있음을 시사한다.

[0261] *DNase1-유사 3 및 그의 변이형으로의 치료*

[0262] 마지막으로, 본 발명자들은 생체내에서 D1L3의 치료적 효과를 시험하였다. NET의 혈관 클롯의 조직학적 분석은 크로마틴의 치밀 응집물을 보여주고 (도 36A), 이는 D1에 대한 무히스톤 분열 자리가 생체내에서 드물게 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은, 야생형 D1L3으로의 급성 치료가 야생형 D1에 비해 혈관내 NET 분해에 있어 더 효과적임을 가정하였다. 본 발명자들의 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 결핍 마우스에서 *Csf3*을 발현시켜 NET의 혈관 클롯을 유도하였다. 중요하게, 엑시투스 전에, NET에 의한 혈관 폐색을 갖는 마우스는 혈뇨 및 저체온증을 발달시키고, 이는 비-침입적으로 검출될 수 있다. 따라서, 동물 모델은, NET에 대한 급성 치료에 대한 약물 후보물질을 시험하기 위해, NET를 형성한 마우스를 규명하고 그에 따라 선택할 수 있게 한다 (도 36B). 여기서, 본 발명자들은 NET에 대한 급성 치료에 대하여 정제된 야생형 인간 D1 (도르나제 알파; 서열 번호: 1), 야생형 인간 D1L3 (서열 번호: 2), 및 과다활성 D1L3 변이형 [D1L3^{V}; (서열 번호: 17)]을 시험하였다. 본 발명자들은 *Csf3*을 *Dnase1*$^{-/-}$*Dnase113*$^{-/-}$ 결핍 마우스로 주사하였다. 72시간 후, 최초 개별 동물은 저체온증 및 혈뇨를 발달시키기 시작하였다. 본 발명자들은 포함 기준으로서 4℃ 이상의 체온 강하 및 적색 소변의 존재를 사용하였다. 이들 표현형을 발달시킨 마우스를 상이한 치료 그룹으로 랜덤화하였다. 동물은 1 mg/kg의 D1, D1L3, 또는 비히클의 꼬리 정맥을 통한 정맥내 주사의 단일 용량을 수용하였다. 30분 후, 동물을 안락사시켜 바이오샘플 (혈액 및 기관)을 수집하였다. 폐의 혈관구조 내의 NET의 클롯의 정량화는, 비히클 또는 D1 치료를 수용한 마우스에서 NET가 혈관을 폐색시켰음을 보여주었다 (도 36D). 중요하게, D1L3 및 D1L3^{V}가 주사된 마우스는 NET의 클롯을 나타내지 않거나 거의 나타내지 않았다 (도 36D). 환자에서, 순환 DNA는 모노-뉴클레오솜에서의 DNA의 크기 [180개 염기 쌍, (*33*)]를 갖고, 이는 이것이 크로마틴에서 고분자량 DNA의 분해 생성물임을 나타낸다. 순환 DNA는 통상적으로 혈관내 NET 형성의 대용물 마커로서 사용되지만, 또한 손상된 및 괴사성 조직으로부터 유래될 수 있다 (*34*). 본 발명자들은 형광 DNA 프로브를 사용하여 혈청 내의 DNA를 정량화하였

다. 본 발명자들은, D1 또는 비히클은 아니지만, D1L3 및 D1L3^{V}의 주사는 순환 DNA의 수준의 강한 증가를 유발함을 관찰하였다 (도 36E). 순환 DNA의 단리 및 가시화는 다량체 180개 염기 쌍 단편을 보여주었고, 이는 D1L3 치료를 수용한 마우스에서 혈청 내의 모노- 및 올리고-뉴클레오솜의 존재를 나타낸다 (도 36F). D1L3^{V}를 수용한 마우스는 단지 모노- 및 디-뉴클레오솜을 나타내었다. 데이터는 생체내에서의 D1L3^{V}의 과다활성을 확인시켜준다. D1 치료를 수용한 마우스의 혈청으로부터의 DNA 단리물은 다양한 크기의 희미한 DNA 도말을 나타내었지만, 비히클로 주사된 마우스의 혈청으로부터 DNA가 단리될 수 있었다 (도 36F). 따라서, D1L3은, NET와 관련된 질환의 예방을 위해서 뿐만 아니라 급성 치료를 위해서 사용될 수 있다.

[0263] 본 발명자들은 추가로, 허혈-재관류 손상의 모델에서의 D1L3^{V}의 치료적 응용을 탐구하였다 (도 37A). 간단히, 수컷 야생형 래트의 1개 고환을 본 발명자들에 의해 이전에 기재된 바와 같이 고환 비틀림에 적용하였다 (*35*). 절차는 허혈성 조직 손상을 유발한다. 고환의 랜덤화 및 비틀림-교정 후, 래트는 비히클 도르나제 알파 (D1, 1mg/kg), 또는 정제된 DNase1L3 변이형 (서열 번호: 17, D1L3^{V}, 1mg/kg)의 매일 3회 주사를 수용하였다. 7일 후, 허혈 고환 및 비처리된 고환을 수집하였다. 식염수 또는 D1은 아니었지만, D1L3^{V}로의 치료는 고환 위축을 현저히 감소시켰다 (도 37B). 또한, 식염수 또는 D1은 아니었지만, D1L3^{V}로의 치료는 조직 손상을 실질적으로 감소시켰고, 대부분의 동물은 손상 징후를 나타내지 않았다 (도 37C). 총체적으로, 데이터는 허혈-재관류 손상에 대한 강력한 치료로서 D1L3을 규명한다.

[0264] *DNase1 변이형, DNase1-유사 3 및 변이형의 약물 개발*

[0265] 모든 단백질 치료의 거의 70%는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO)를 사용하여 생성된다 (*36*). 실로, 야생형 DNase1 (도르나제 알파)은 CHO 세포에서 생성된다. 중요한 이점에도 불구하고, CHO에서의 세포 라인 개발 및 대규모 생성은 상당한 정도의 변동성 및 세포 성장 특징을 예측 및 모델링하기 위한 신뢰성 있는 방법의 부재로 인해 여전히 큰 도전으로 남아있다 (*36*). 중요하게, CHO 세포는 D1의 과다활성 변이형을 안정적으로 생성할 수 없었고, 이는 이들의 임상 제조를 막았다 (*12*). D1L3의 제조 특성은 알려져 있지 않다. 따라서, 본 발명자들은 야생형 D1 (서열 번호: 1), 과다활성 D1 변이형 (서열 번호: 7), 야생형 D1L3 (서열 번호: 2) 및 과다활성 D1L3 변이형 (서열 번호: 17)을 생성하는 안정적인 CHO 세포 라인을 개발하였다. 본 발명자들은 생물반응기에서 세포 라인을 배양시키고 야생형 D1 및 D1 변이형을 갖는 안정적 단백질 발현을 관찰하였고, 이들 중 후자는 강하게 증가된 발현 수준을 가졌으며 (도 38), 이는 CHO에서의 과다활성 D1 변이형의 생성의 실행가능성을 보여준다. 예상외로, 본 발명자들은 야생형 D1L3 및 D1L3 변이형의 단지 부수적 단백질 수준을 관찰하였고 (도 38), 이는 D1L3 및 그의 변이형의 임상 제조에 대한 주요 도전을 가리킨다.

[0266] 대규모 생물반응기에서의 높은 세포 밀도로 인해, 세포는 자원에 대해 경쟁하고 세포 스트레스에 놓여, 포유류를 포함한 다세포 유기체에 의해 사용되는 세포 사망 프로그램, 아팝토시스라 불리는 세포 사망을 증가시킨다 (*37*). D1L3은 아팝토시스 바디에서 DNA를 표적화한다 (*7*). 본 발명자들은, 낮은 수준의 D1L3은 이들 아팝토시스 소포에 의한 효소의 스캐빈징에 기인한다고 추측하였다. 이들 한계를 극복하기 위해, 본 발명자들은, 단백질 분비 능력을 갖는 확립된, FDA 승인된 및 일반적으로 안정한 것으로 인식되는 (GRAS) 유기체, 피키아 파스토리스, 미생물 발현 시스템을 사용하여 D1, D1L3 및 이들의 변이형의 생성을 시험하였다 (*38, 39*). 이 접근의 핵심적 한계는, 피. 파스토리스에 의해 생성된 단백질이 종종 과다글리코실화되고 향상된 면역원성을 초래할 수 있다는 점이다 (*40*). D1L3 및 그의 변이형의 조성물은 비-글리코실화되고 피. 파스토리스에서의 발현에 대해 최적이다. 본 발명자들은 각각 N40S 및 N128S에서 D1 및 그의 변이형에서의 글리코실화 자리를 돌연변이시켜 데글리코실화된 단백질 (서열 번호: 21, 23)을 생성하였다. 피. 파스토리스에서의 단백질 발현은 일반적으로, 관심 단백질을 다양한 기원의 분비 신호 펩티드에 커플링함으로써 달성된다. 본 발명자들은 면역원성 키메라 단백질의 생성을 피하기 위해 이 단계를 생략하였다. 본 발명자들은, D1 및/또는 D1L3의 네이티브 신호 펩티드가 피. 파스토리스에 의해 인식됨을 추측하였다. 코돈-최적화를 수행한 후, 본 발명자들은 피. 파스토리스에서의 cDNA를 발현시켰다 (서열 번호: 22, 24-26). 본 발명자들은 D1 및 D1 변이형 (나타내지 않음)의 발현을 달성하였다. 중요하게, 이 접근은 또한 D1L3 및 D1L3 변이형의 발현을 가능하게 하였고, 이들 중 후자는 증가된 발현 수준을 나타낸다 (도 38). 본 발명자들은 단백질을 정제하였고, D1L3이 증가된 활성을 가짐을 확인하였다 (도 38). 결론적으로, 데이터는, 피. 파스토리스와 같은 비포유류 발현 시스템의 사용이 D1L3 및 그의 변이형의 임상 제조를 가능하게 함을 시사한다.

[0267] **논의**

[0268] 두 DNA-분해 효소는 실험 모델 및 환자에서 치료적으로 폭넓게 사용되고 있다. 스트렙토콕쿠스종(*Streptococcus spp.*)으로부터의 분비 DNase, 스트렙토도르나제는 피부 동종이식, 방광 클롯, 상처 죽은조직제거(wound debridement), 뇌막염의 질환 모델에서 시험되고 있다. DNase1 (췌장 DNase1 포함)은 암, 낭포성 섬유증, 루푸스, 혈전증, 뇌졸중, 패혈증, 폐 손상, 죽상경화증, 바이러스 감염, 겸상 적혈구 질환, 심근 경색, 귀 감염, 상처 치유, 간 손상, 심내막염, 간 감염, 췌장염, 일차 이식 장애, 사지 허혈 재관류, 신장 손상, 혈액 클롯팅, 천식, 알룸-유도 염증, 간신장 손상의 실험 모델에서 치료적으로 사용되고 있다. 스트렙토도르나제는 또한, 흉막 삼출, 혈흉증, 담관내 혈액 클롯, 후 공압 빈혈, 궤양, 이비인후과 병태, 경구 감염, 경미한 부상, 부비강염, 수술후 비성형, 불임, 방광 카테터, 상처 세정, 피부 반응 시험을 갖는 환자의 치료를 위해 사용되고 있다. 중요하게, DNase1는 폐렴구균 수막염, 통풍, 족부 궤양, 낭포성 섬유증, 카르테게너 증후군, 천식, 엽성 무기폐, 만성 기관지염, 기관지확장증, 루푸스, 일차 섬모 이상운동증, 세기관지염, 농흉, 흉막 감염, 암, 안구 건조 질환, 하부 호흡기 감염, 만성 혈종, 알츠하이머병, 및 폐쇄성 폐 질환을 갖는 환자에서 치료적으로 시험되고 있다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 D1L3, 그의 변이형, 뿐만 아니라 D1 변이형을 DNase 치료를 위한 신규한 후보물질로서 규명하였다 (도 39).

[0269] **방법**

[0270] *크로마틴 분해 활성의 검출*

[0271] 크로마틴 분해 활성을 측정하기 위해, 본 발명자들은 샘플을 HEK293으로부터 단리된 핵 (반응 당 1,500,000 - 3,000,000), 20 mM 트리스-HCl pH 7.4, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 50 mM NaCl 및 프로테아제 억제제와 혼합하였다. 샘플을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 이들을 10분 동안 65℃까지 가열하였다. 본 발명자들은 제조업체의 프로토콜에 따라 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 DNA 단리를 진행하였다. 이어서, 용리제를 아가로스 겔 상에 로딩하고, DNA 단편을 겔 전기이동에 의해 분리하였다. 겔의 DNA 형광을 형광 스캐너로 기록하였다.

[0272] 추가의 방법은 실시예 1에 기재되어 있다.

[0273] **참조문헌**

[0274] 1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, in *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 2.

[0275] 2. V. Brinkmann *et al.*, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1532-1535 (2004).

[0276] 3. T. A. Fuchs, A. Hakkim, C. F. Urban, in *Inflammation: Fundamental Mechanisms*, K. Ley, Ed. (World Scientific, 2018), chap. 6.

[0277] 4. D. Shiokawa, S. Tanuma, Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* **40**, 143-152 (2001).

[0278] 5. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J* **380**, 929-937 (2004).

[0279] 6. W. F. Baron *et al.*, Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. *Gene* **215**, 291-301 (1998).

[0280] 7. V. Sisirak *et al.*, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* **166**, 88-101 (2016).

[0281] 8. M. Jimenez-Alcazar *et al.*, Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **13**, 732-742 (2015).

[0282] 9. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). *FEBS J* **276**, 1059-1073 (2009).

[0283] 10. A. Wilber, M. Lu, M. C. Schneider, Deoxyribonuclease I-like III is an inducible macrophage

barrier to liposomal transfection. *Mol Ther* **6**, 35-42 (2002).

[0284] 11. W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, K. C. Holmes, Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44 (1990).

[0285] 12. C. Lam *et al.*, Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt- and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells. *Biotechnol Prog* **33**, 523-533 (2017).

[0286] 13. C. Q. Pan *et al.*, Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem* **273**, 18374-18381 (1998).

[0287] 14. D. Shiokawa, Y. Shika, S. Tanuma, Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. *Biochem J* **376**, 377-381 (2003).

[0288] 15. R. Mizuta *et al.*, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* **8**, e80223 (2013).

[0289] 16. H. J. Fuchs *et al.*, Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* **331**, 637-642 (1994).

[0290] 17. N. M. Rahman *et al.*, Intrapleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection. *N Engl J Med* **365**, 518-526 (2011).

[0291] 18. V. Papayannopoulos, D. Staab, A. Zychlinsky, Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One* **6**, e28526 (2011).

[0292] 19. M. Napirei, S. Wulf, H. G. Mannherz, Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* **50**, 1873-1883 (2004).

[0293] 20. D. D. Wagner *et al.* (Children's Medical Center Corporation, Boston, MA (US), United States, 2017), vol. US 9,642,822 B2.

[0294] 21. R. A. Lazarus, C. Q. Pan. (Genentech Inc., United States, 2002), vol. US 6,391,607 B1.

[0295] 22. R. A. Lazarus, C. Q. Pan. (Genentech Inc., 2008), vol. US 7,407,785 B2.

[0296] 23. R. A. Lazarus, S. Shak, J. S. Ulmer. (Genentech Inc., 2001), vol. US 2001/0041360 A1.

[0297] 24. C. Q. Pan, R. A. Lazarus, Hyperactivity of human DNase I variants. Dependence on the number of positively charged residues and concentration, length, and environment of DNA. *J Biol Chem* **273**, 11701-11708 (1998).

[0298] 25. C. Q. Pan, D. V. Sinicropi, R. A. Lazarus, Engineered properties and assays for human DNase I mutants. *Methods Mol Biol* **160**, 309-321 (2001).

[0299] 26. C. Q. Pan, J. S. Ulmer, A. Herzka, R. A. Lazarus, Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* **7**, 628-636 (1998).

[0300] 27. G. Parsiegla, C. Noguere, L. Santell, R. A. Lazarus, Y. Bourne, The structure of human DNase I bound to magnesium and phosphate ions points to a catalytic mechanism common to members of the DNase I-like superfamily. *Biochemistry* **51**, 10250-10258 (2012).

[0301] 28. M. C. Schneider, A. Wilber. (United States, 2004), vol. US 2004/0138156.

[0302] 29. J. S. Ulmer *et al.*, Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8225-8229 (1996).

[0303] 30. B. T. Bettinger, D. M. Gilbert, D. C. Amberg, Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 410-415 (2004).

[0304] 31. C. F. Urban *et al.*, Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. *PLoS Pathog* **5**, e1000639 (2009).

[0305] 32. D. Russell, N. J. Oldham, B. G. Davis, Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydr Res* **344**, 1508-1514 (2009).

[0306] 33. T. A. Fuchs, J. A. Kremer Hovinga, D. Schatzberg, D. D. Wagner, B. Lammle, Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **120**, 1157-1164 (2012).

[0307] 34. M. Jimenez-Alcazar, N. Kim, T. A. Fuchs, Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost* **43**, 553-561 (2017).

[0308] 35. M. Boettcher *et al.*, Degradation of Extracellular DNA by DNase1 Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urology* **109**, 223 e221-223 e227 (2017).

[0309] 36. A. D. Bandaranayake, S. C. Almo, Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters* **588**, 253-260 (2014).

[0310] 37. Y. K. Han, Y. G. Kim, J. Y. Kim, G. M. Lee, Hyperosmotic stress induces autophagy and apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering* **105**, 1187-1192 (2010).

[0311] 38. J. L. Cereghino, J. M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *FEMS microbiology reviews* **24**, 45-66 (2000).

[0312] 39. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 5301-5317 (2014).

[0313] 40. R. Daly, M. T. Hearn, Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR* **18**, 119-138 (2005).

[0314] **야생형 DNase의 서열**

[0315] **서열 번호: 1**

[0316] 인간 DNase1 (P24855), 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0317] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0318] **서열 번호: 2**

[0319] 인간 DNase1L3 (Q13609), 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0320] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0321] **서열 번호: 3**

[0322] 뮤린 DNase1 (P49183): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0323] MRYTGLMGTLLTLVNLLQLAGTLRIAAFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRYDIAVIQEVRDSHLVAVGKLLDELNRDKPDTYRYVVSEPLGRKSYKEQY
LFVYRPDQVSILDSYQYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVQEFAIVPLHAAPTEAVSEIDALYDVYLDVWQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWS
SIRLRTSPIFQWLIPDSADTTVTSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDFQAEYGLSNQLAEAISDHYPVEVTLRKI

[0324] **서열 번호: 4**

[0325] 래트 DNase1 (P21704), 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0326] MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRYDIAVVQEVRDTHLVAVGKLLDELNRDIPDNYRYIISEPLGRKSYKEQY
LFVYRPSQVSVLDSYHYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVREFAIVPLHSAPTEAVSEIDALYDVYLDVRQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWS
SIRLRTSPIFQWLIPDSADTTATSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDFQAEYRLTNQMAEAISDHYPVEVTLRKT

[0327] **서열 번호: 34**

[0328] 뮤린 DNase1L3 (O55070): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0329] MSLHPASPRLASLLLFILALHDTLALRLCSFNVRSFGASKKENHEAMDIIVKIIKRCDLILLMEIKDSSNNICPMLMEKLNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNT
YKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHDYQDGDTDVFSREPFVVWFHSPFTAVKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELVDVYTDVRSQWKTENFIFMGDFNAGCSYVPK
KAWQNIRLRTDPKFVWLIGDQEDTTVKKSTSCAYDRIVLCGQEIVNSVVPRSSGVFDFQKAYDLSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVSLKKRKK
GNRS

[0330] **서열 번호: 35**

[0331] 래트 DNase1L3 (O89107): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0332] MSLYPASPYLASLLLFILALHGALSLRLCSFNVRSFGESKKENHNAMDIIVKIIKRCDLILLMEIKDSNNNICPMLMEKLNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNT
YKEQYAFLYKEKLVSVKAKYLYHDYQDGDTDVFSREPFVVWFQAPFTAAKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELADVYTDVRRRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPK
KAWKNIRLRTDPNFVWLIGDQEDTTVKKSTSCAYDRIVLRGQEIVNSVVPRSSGVFDFQKAYELSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSRKSVSLKKKKK
GSRS

[0333] **서열 번호: 36**

[0334] 침팬지 DNase1 (H2QAH1): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0335] MRSMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLRTSPAFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLQGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0336] **서열 번호: 37**

[0337] 침팬지 DNase1L3 (H2QMU7): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0338] MSRELTPLLLLLLSIHSTLALRICSFNVRSFGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0339] **서열 번호: 38**

[0340] 인간 DNase1-유사 1 (NM_006730): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0341] MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEVVDSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYF
YRSHKTQVLSSYVYNDEDDVFAREPFVAQFSLPSNVLPSLVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLEVSQHWQSKDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEP
GFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLHGERCRSLLHTAAAFDFPTSFQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLLLSLLSPQLCPAA

[0342] **서열 번호: 39**

[0343] **인간 DNase1-유사 2 (**NM_001374): 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0344] MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVRDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYL
FVYRKDAVSVVDTYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGD
FNADCSYVRAQDWAAIRLRSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRSLKPQSATVHDFQEEFGLDQTQALAISDHFPVEVTLKFHR

[0345] **인간 DNase1L3의 C-말단 테일**

[0346] **서열 번호: 33**

[0347] 아미노산 서열:

[0348] SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0349] **DNase1 변이형의 서열**

[0350] **서열 번호: 5**

[0351] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0352] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0353] **서열 번호: 6**

[0354] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0355] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVKEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYKLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0356] **서열 번호: 7**

[0357] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0358] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0359] **서열 번호: 8**

[0360] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0361] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0362] **서열 번호: 9**

[0363] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0364] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVKEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0365] **서열 번호: 10**

[0366] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0367] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYHYVVSEPLGRNSYKE
RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQ
WSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0368] **서열 번호: 11**

[0369] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0370] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYNYVISSRLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0371] **서열 번호: 12**

[0372] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0373] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY

LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0374] **서열 번호: 13**

[0375] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0376] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPKKAWK
NIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0377] **서열 번호: 14**

[0378] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0379] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTVKKSTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0380] **서열 번호: 15**

[0381] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0382] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNSYKE
RYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPKKA
WKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0383] **서열 번호: 16**

[0384] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0385] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0386] **DNaseIL3 변이형의 서열**

[0387] **서열 번호: 17**

[0388] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0389] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

[0390] **서열 번호: 18**

[0391] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0392] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQENKTAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDNDTFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0393] **서열 번호: 19**

[0394] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0395] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKN
IRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0396] **서열 번호: 20**

[0397] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0398] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQY
AFLYKEKLVSVKRSYHYHDGCEPCGNDTFNREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWK
NIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0399] **피키아 파스토리스에서 사용된 서열**

[0400] **서열 번호: 21**

[0401] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0402] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSSATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0403] **서열 번호: 22**

[0404] 서열 번호: 21의 코돈-최적화된 cDNA (**출발 코돈**, 신호 펩티드):

[0405] ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAAGGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTCAAACCTTTGGC
GAGACTAAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCAGATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACT
GCCGTCGGTAAGCTGCTAGACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAAACTCCTACAAGGAGAGATAC
CTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCAGCT
ATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTAT
GATGTCTACCTGGACGTTCAGGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCA
AGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCACTCCCACTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTC
GCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCATCTCT
GATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

[0406] **서열 번호: 23**

[0407] 아미노산 서열 (신호 펩티드; 성숙 단백질):

[0408] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSSATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERY
LFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWS
SIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0409] **서열 번호: 24**

[0410] 서열 번호: 23의 코돈-최적화된 cDNA (**출발 코돈**, 신호 펩티드):

[0411] ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAAGGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCTTTGGC
GAGACTAAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCAGATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACT
GCCGTCGGTAAGCTGCTAGACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAAACTCCTACAAGGAGAGATAC
CTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCATTC
ATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTAT
GATGTCTACCTGGACGTTCAGGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCA
AGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAAGCCCACTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTC
GCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCATCTCT
GATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

[0412] **서열 번호: 25**

[0413] 서열 번호: 2의 코돈-최적화된 cDNA (**출발 코돈**, 신호 펩티드):

[0414] ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCT
AAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGC
CCCATCCTTATGGAAAAGCTGAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATAT
GCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTCGTT
GTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGAA
GTTTACACCGACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTCATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGATGCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAAC

ATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTG
CGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCAACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCC
GACCACTTCCCTGTAGAGTTTAAGCTGCAATCCTCCAGAGCATTCACTAACTCTAAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCTAAGAGATCG

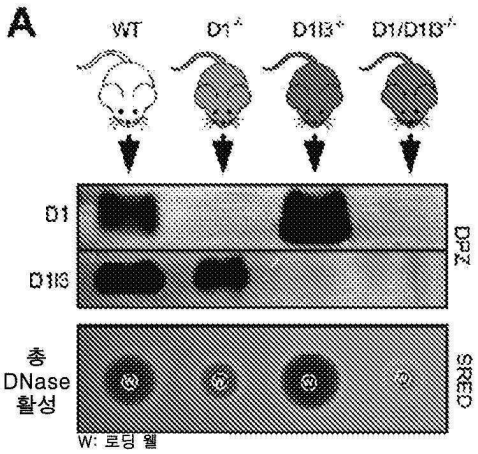
[0415] **서열 번호: 26**

[0416] 서열 번호: 17의 코돈-최적화된 cDNA (**출발 코돈**, 신호 펩티드):

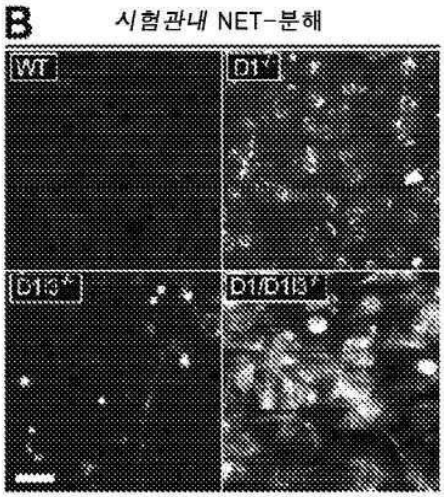
[0417] ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCT
AAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGC
CCCATCCTTATGGAAAAGCTGAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATAT
GCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTCGTT
GTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGAA
GTTTACACCGACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTCATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGATGCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAAC
ATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTG
CGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCAACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCC
GACCACTACCCTGTAGAGGTCATGTTGAAG

도면

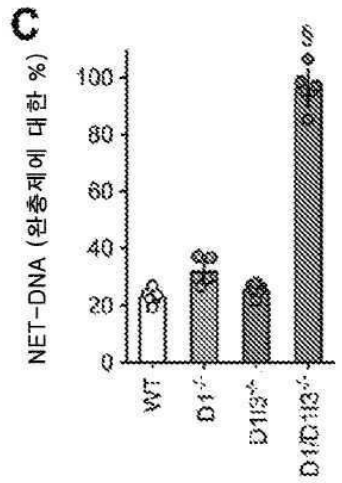
도면1a



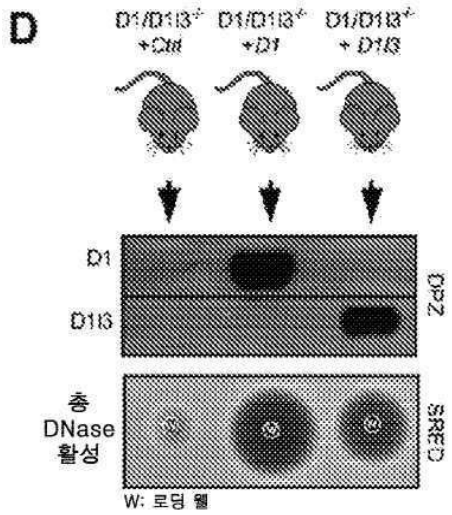
도면1b



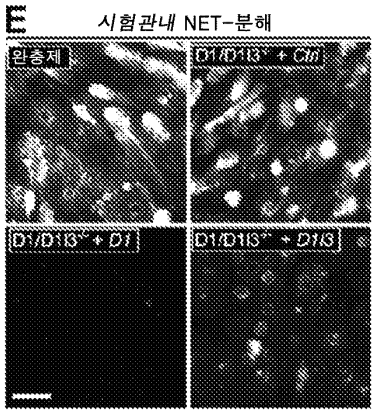
도면1c



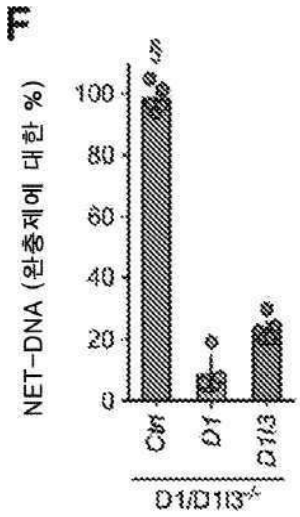
도면1d



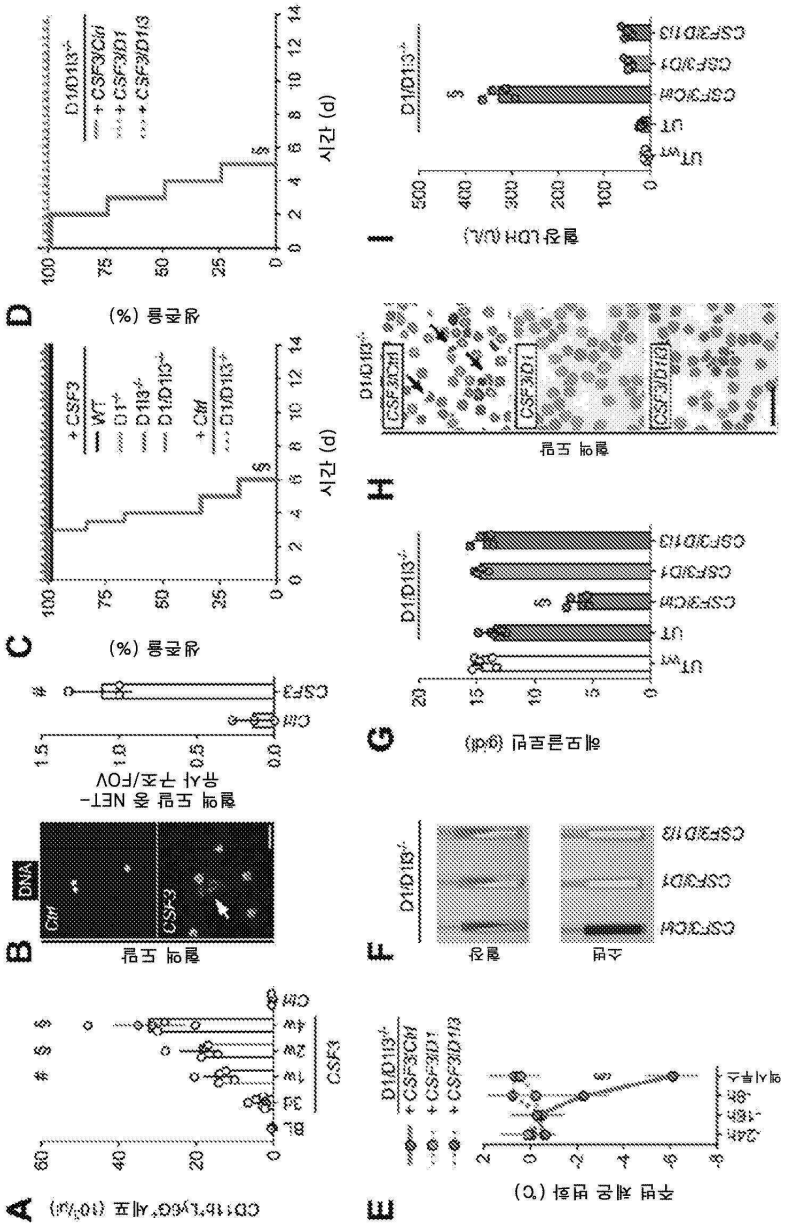
도면1e



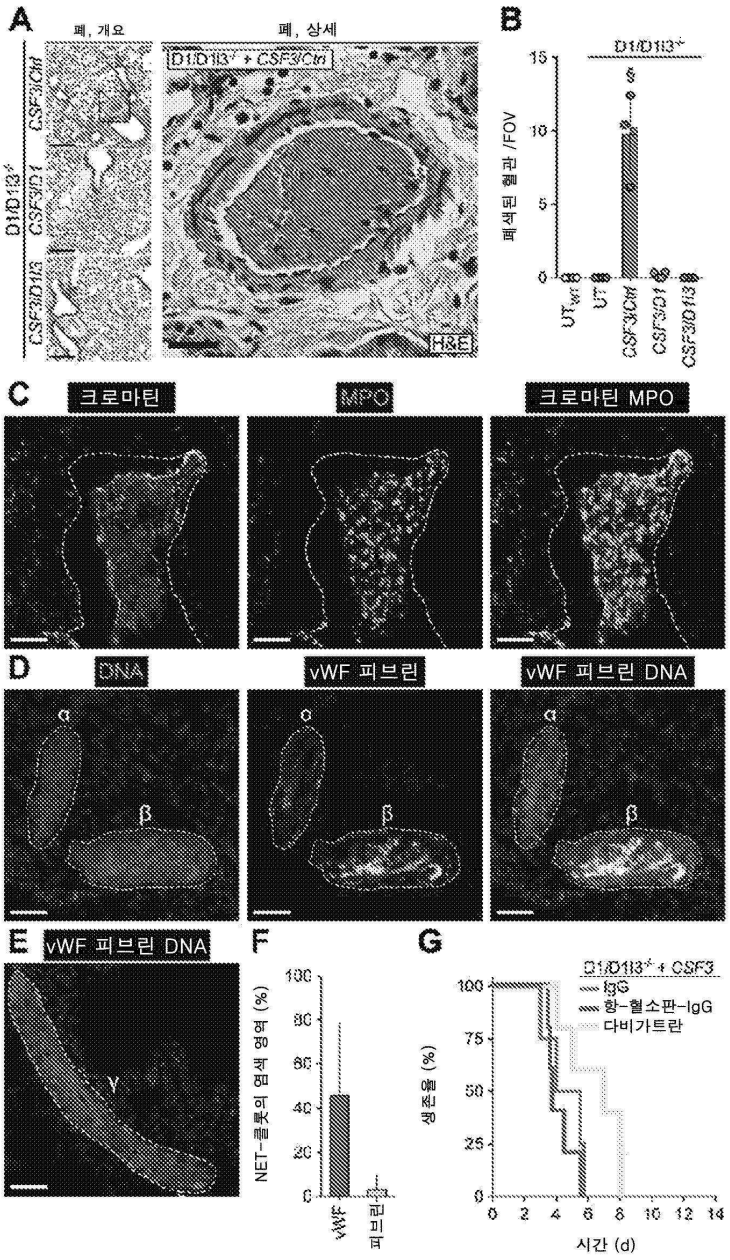
도면1f



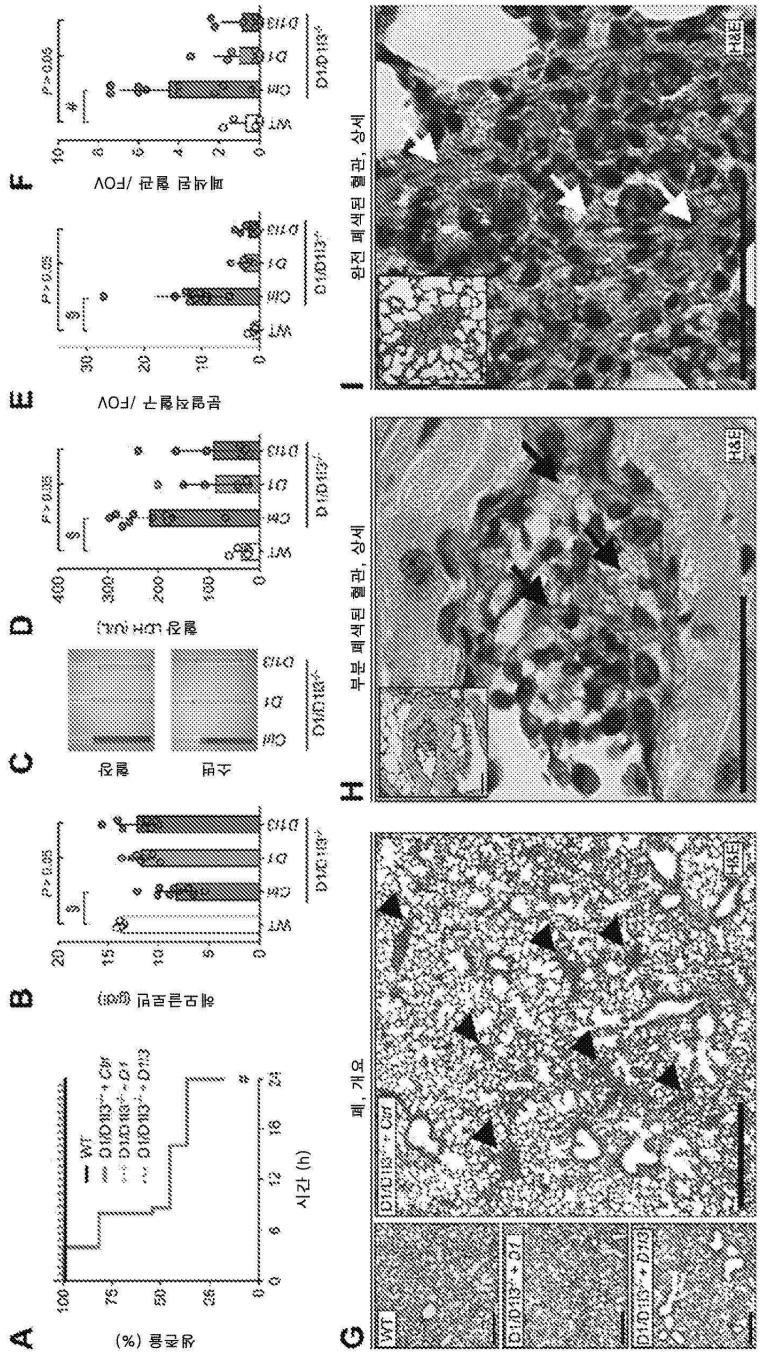
도면2



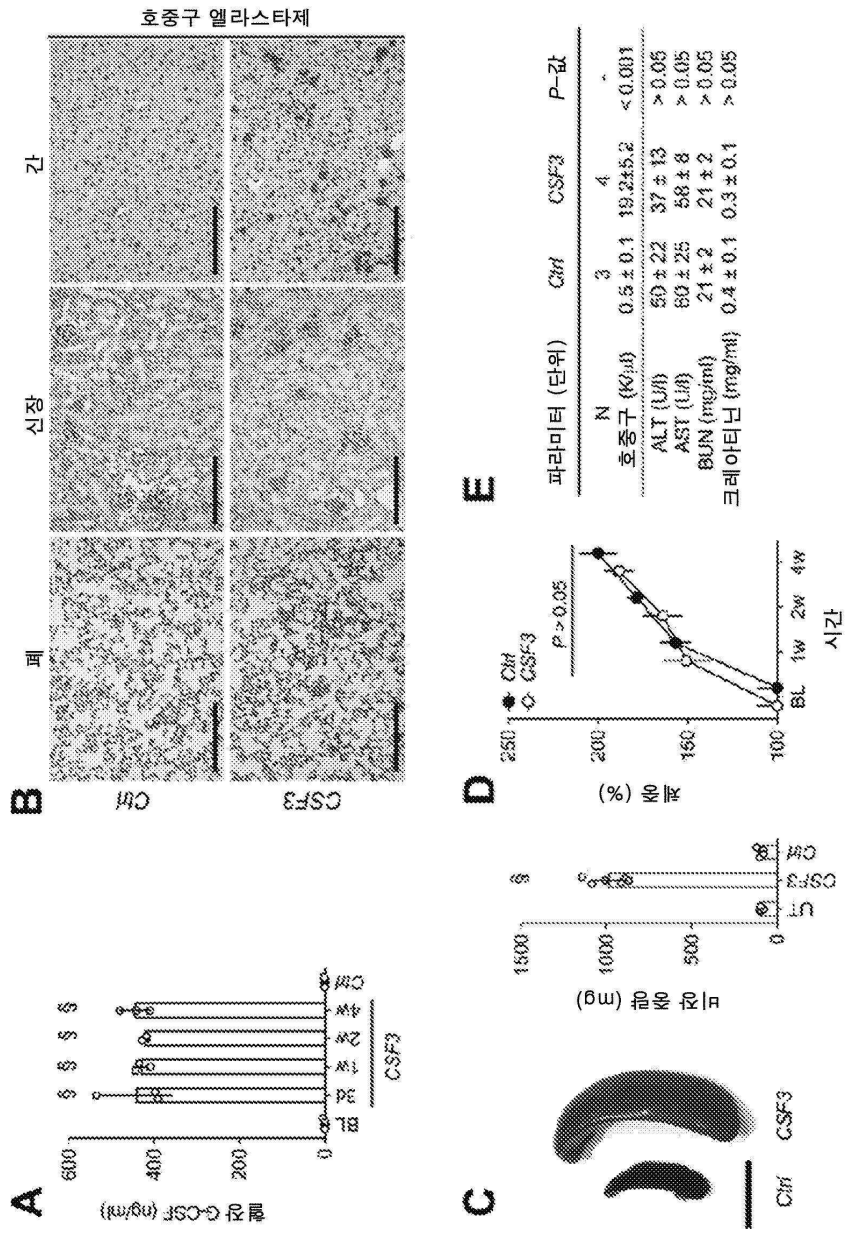
도면3


A
폐, 개요
폐, 상세
D1/D11 3-/-
CSF3/Cm
CSF3/D1
CSF3/D11 3
D1/D11 3-/- + CSF3/Cm
H&E
B
D1/D11 3-/-
폐색된 혈관 /FOV
UT wt
UT
CSF3/Cm
CSF3/D1
CSF3/D11 3
C
크로마틴
MPO
크로마틴 MPO
D
DNA
vWF 피브린
vWF 피브린 DNA
α
β
E
vWF 피브린 DNA
γ
F
NET-클롯의 염색 영역 (%)
vWF
피브린
G
D1/D11 3-/- + CSF3
IgG
항-혈소판-IgG
다비가트란
생존율 (%)
시간 (d)

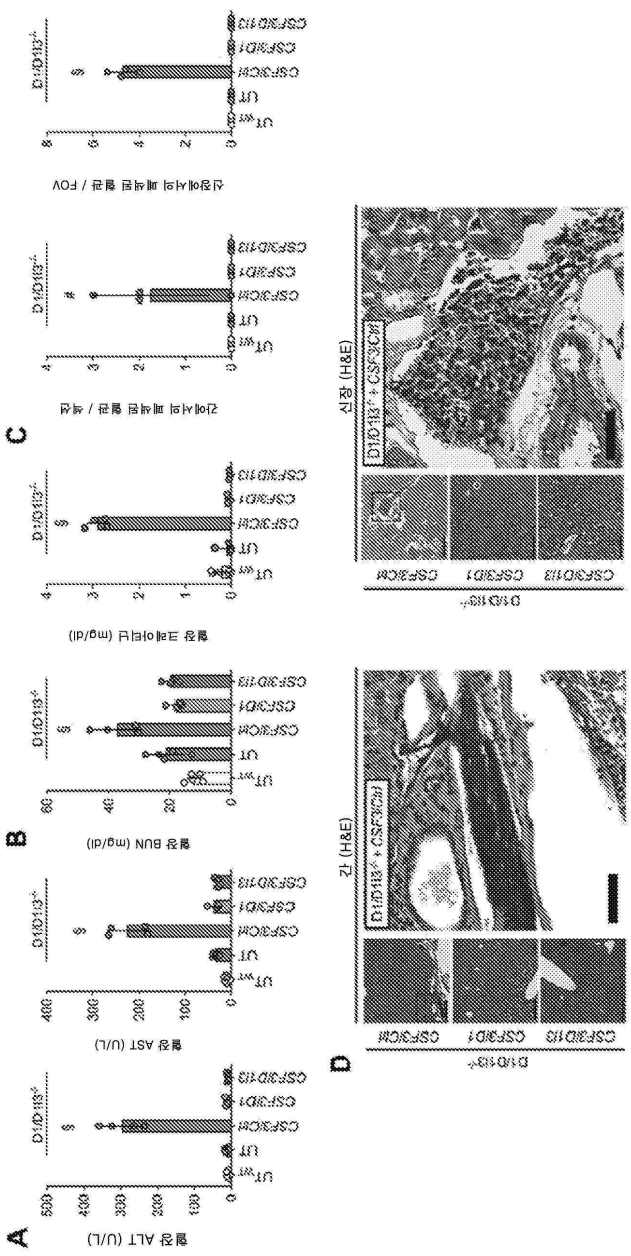
도면4


A
생존율 (%)
시간 (h)
WT
D1ID1B3-/- + Ctrl
D1ID1B3-/- + D1
D1ID1B3-/- + D13
B
혈관 내피층 두께
C
혈장
수분
D
혈장 LDH 농도
E
분열적혈구 /FOV
F
폐색된 혈관 /FOV
G
폐, 개요
WT
D1ID1B3-/- + Ctrl
D1ID1B3-/- + D1
D1ID1B3-/- + D13
H&E
H
부분 폐색된 혈관, 상세
I
완전 폐색된 혈관, 상세

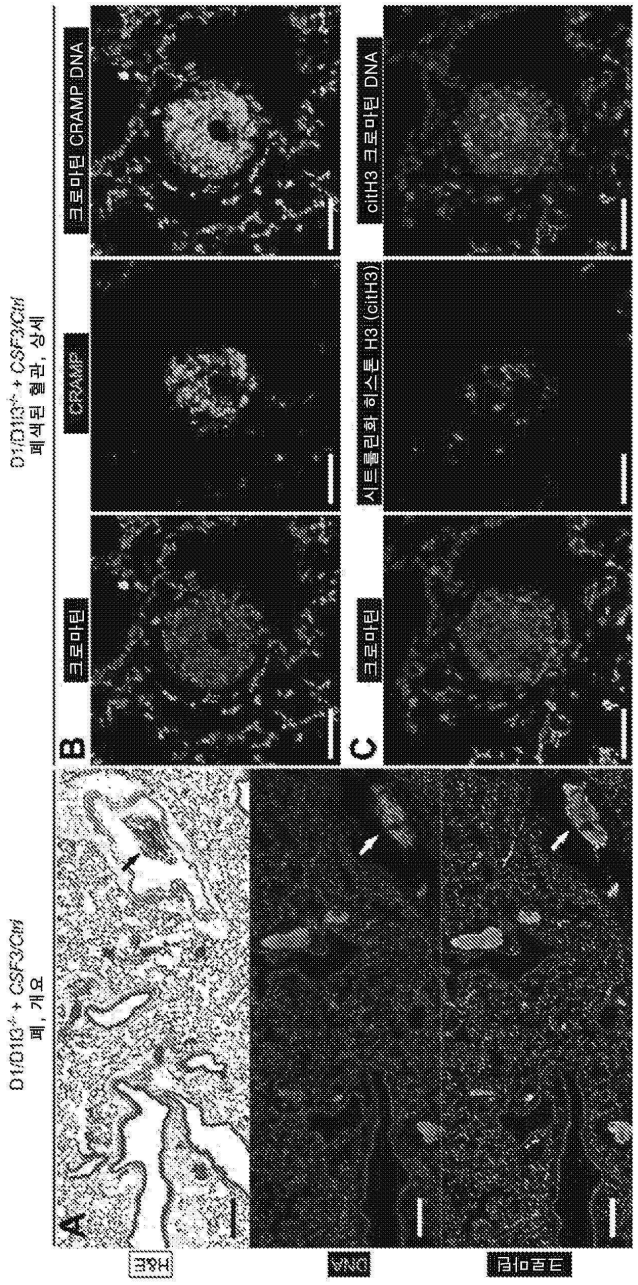
도면5


A
혈장 G-CSF (ng/ml)
600
400
200
0
BL
3d
1w
2w
4w
Ctrl
CSF3
B
폐
신장
간
Ctrl
CSF3
호중구 엘라스타제
C
비장 중량 (mg)
1500
1000
500
0
Ctrl
CSF3
D
체중 (%)
250
200
150
100
Ctrl
CSF3
P > 0.05
BL
1w
2w
4w
시간
E
파라미터 (단위)
Ctrl
CSF3
P-값
N
3
4
호중구 (K/μl)
0.5 ± 0.1
19.2±5.2
< 0.001
ALT (U/l)
60 ± 22
37 ± 13
> 0.05
AST (U/l)
60 ± 25
58 ± 8
> 0.05
BUN (mg/ml)
21 ± 2
21 ± 2
> 0.05
크레아티닌 (mg/ml)
0.4 ± 0.1
0.3 ± 0.1
> 0.05

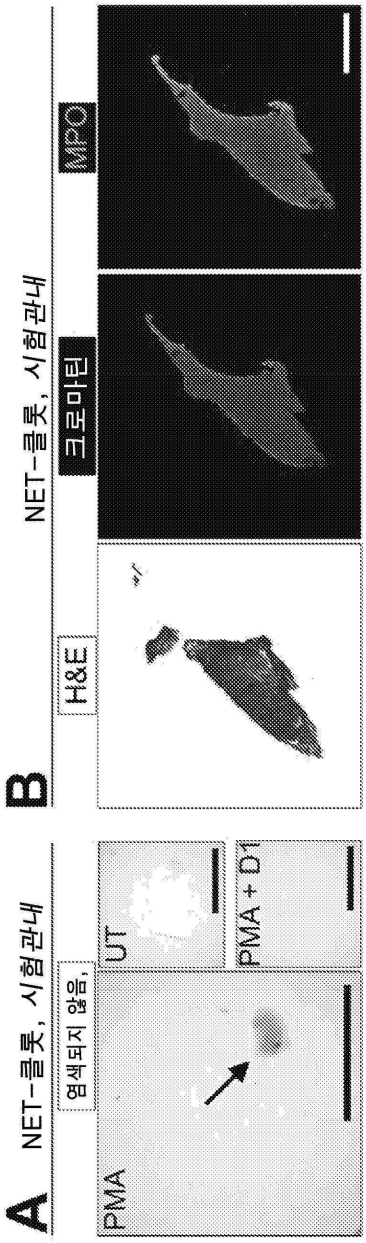
도면6


A
혈장 ALT (U/L)
혈장 AST (U/L)
혈장 BUN (mg/dl)
혈장 크레아티닌 (mg/dl)
B
C
간에서의 폐색된 혈관 / 색션
신장에서의 폐색된 혈관 / FOV
D
간 (H&E)
신장 (H&E)
D1ID1R+
D1ID1R+ CSF3CM+
CSF3D1/3
CSF3D1
CSF3CM
UT
WT
D1ID1R-/-

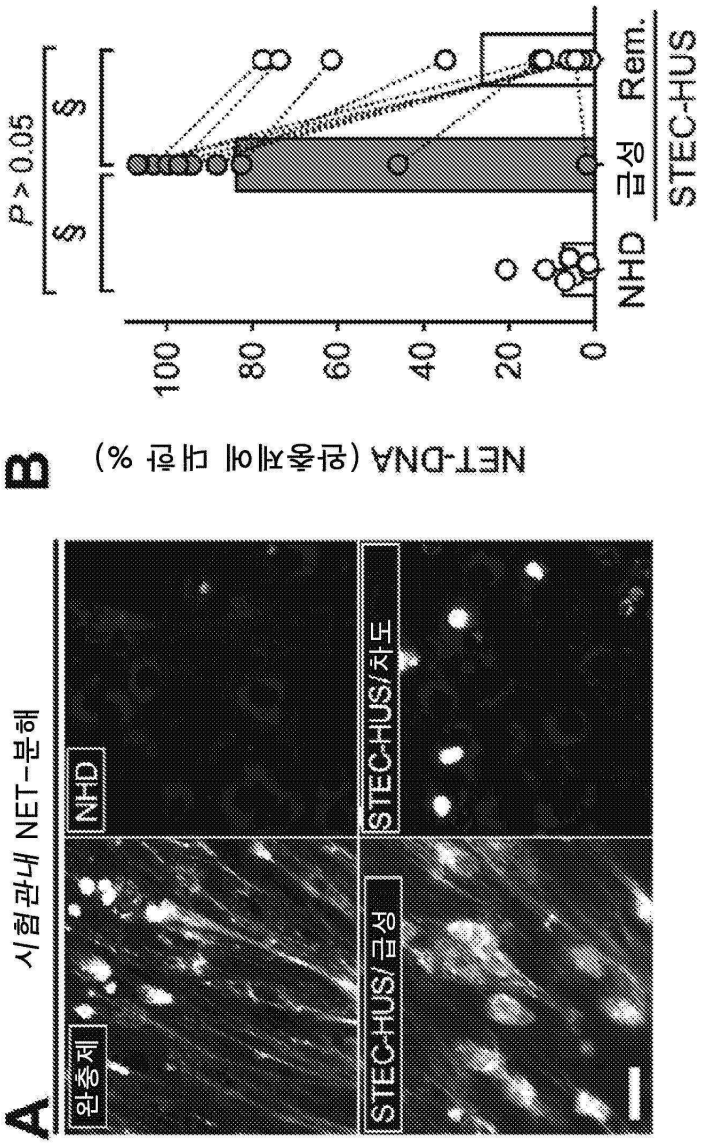
도면7


A
D1/D13-/- + CSF3Cm
폐, 개요
B
크로마틴
CRAMP
크로마틴 CRAMP DNA
D1/D13-/- + CSF3Cm
폐색된 혈관, 상세
C
크로마틴
시트룰린화 히스톤 H3 (citH3)
citH3 크로마틴 DNA
H&E
DNA
크로마틴

도면8



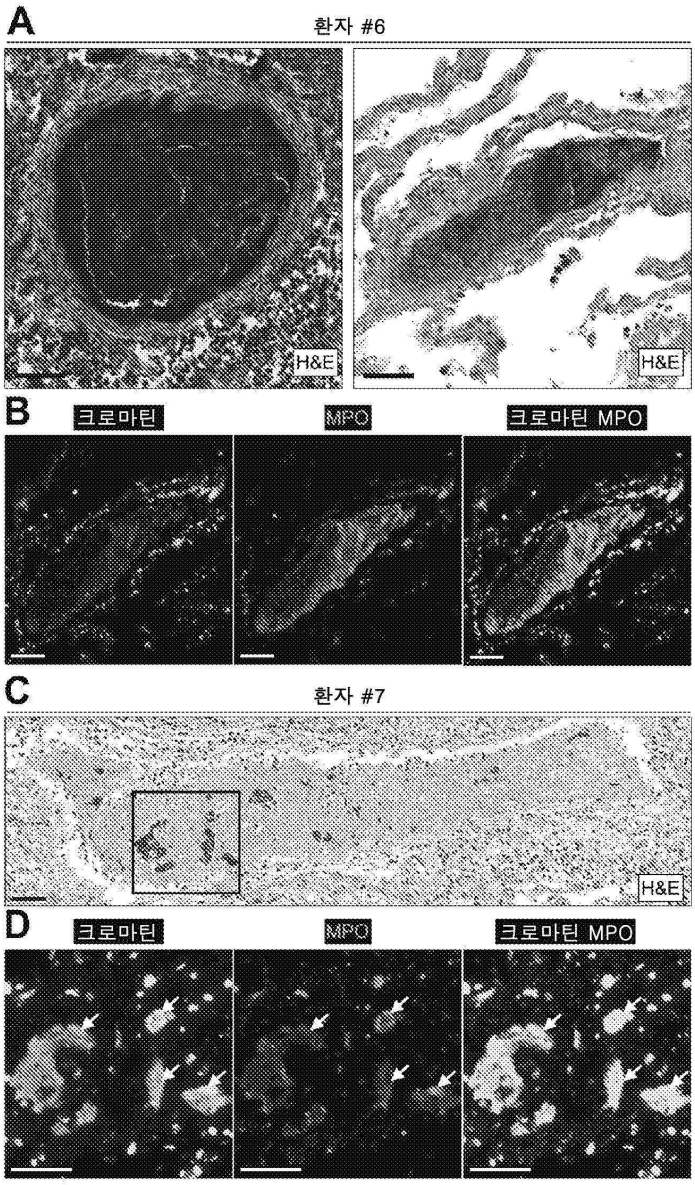
도면9


A
시험관내 NET-분해
완충제
NHD
STEC-HUS/ 급성
STEC-HUS/ 차도
B
NET-DNA (완충제에 대한 %)
100
80
60
40
20
0
P > 0.05
§
§
NHD
급성
Rem.
STEC-HUS

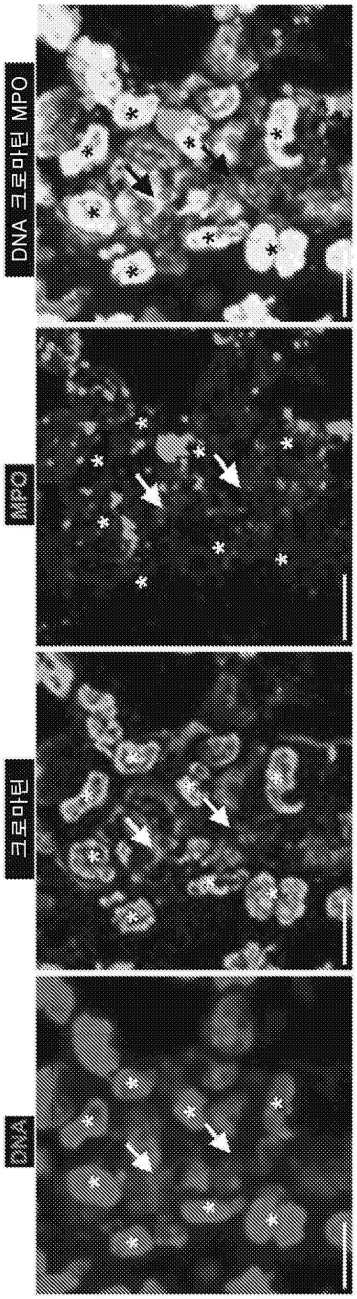
도면10

#	사망 원인	성별	연령	조직	헤마톡실린-롱부 클롯	크로마틴 & MPO-양성	죽소화
1	ARDS	M	84	폐	예	예	혈관
2	폐혈성 심혈관 질환 + ARDS	F	63	폐	아니오	해당 없음	해당 없음
3	ARDS	F	67	폐	아니오	해당 없음	해당 없음
4	폐혈성 다기관 장애 + ARDS	M	72	폐	예	예	혈관
5	폐혈성 심혈관 질환 + ARDS	F	75	폐	아니오	해당 없음	해당 없음
6	폐혈성 다기관 장애	M	60	폐	예	예	혈관
7	폐혈성 심혈관 질환	F	76	폐	예	예	혈관
8	ARDS	F	68	폐	아니오	해당 없음	해당 없음

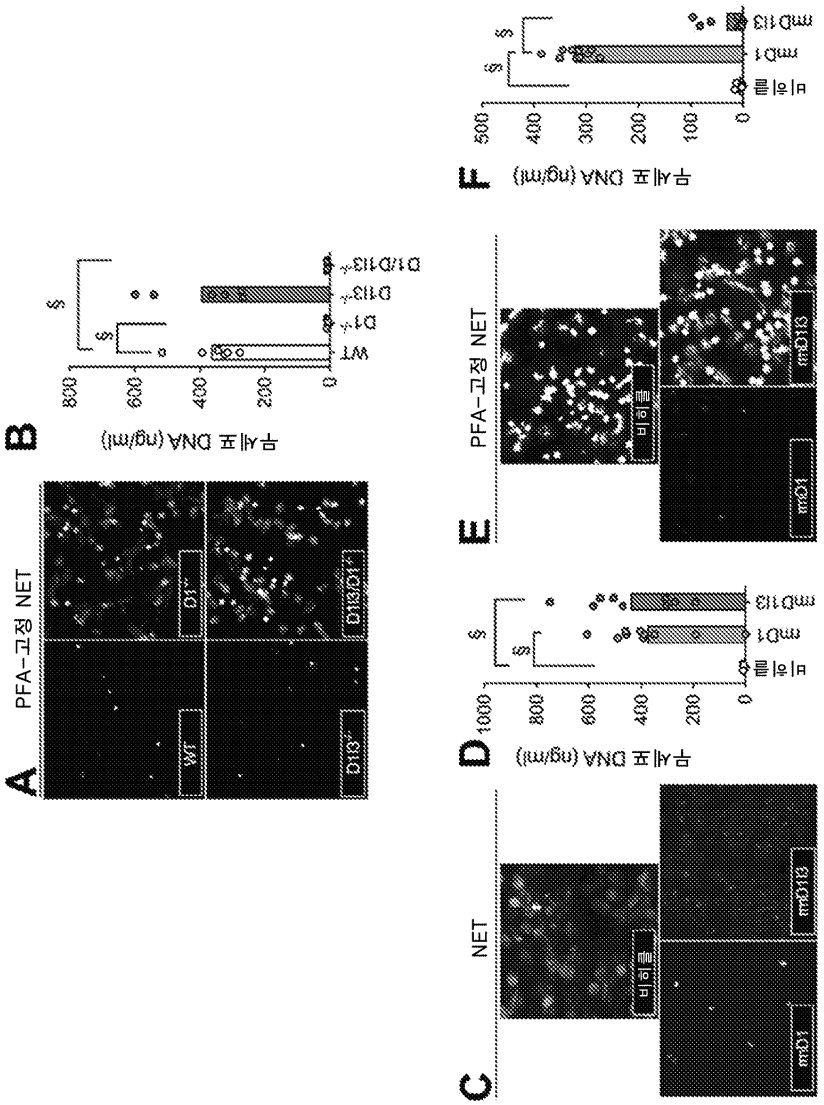
도면11



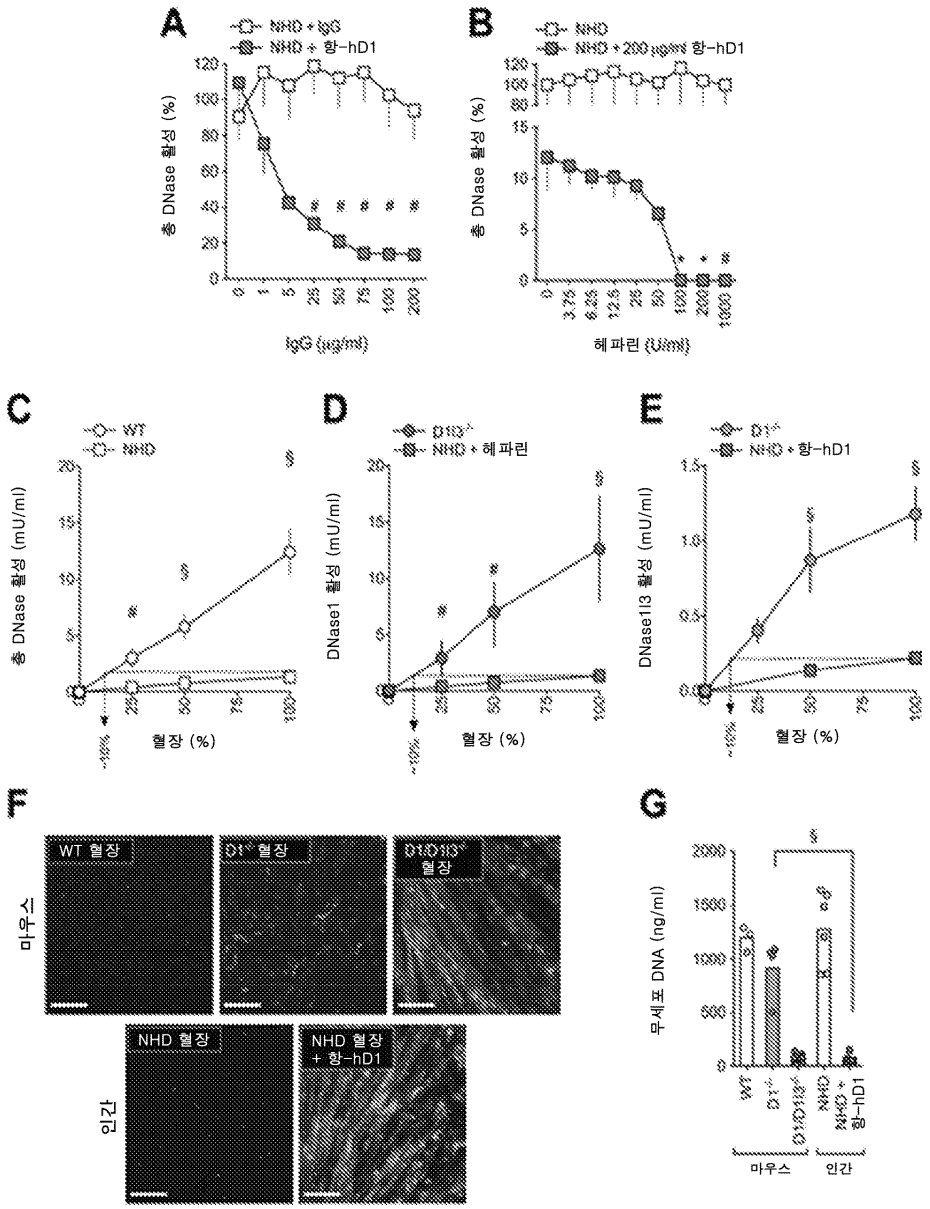
도면12



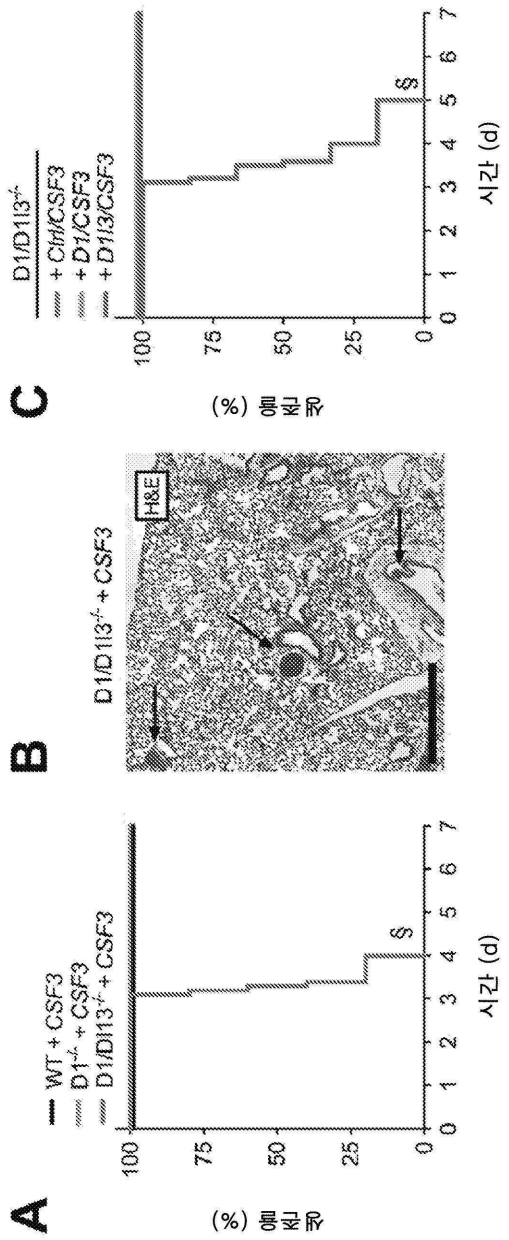
도면13


A
PFA-고정 NET
WT
D1-/-
D13-/-
D13/D1-/-
B
무세포 DNA (ng/ml)
WT
D1-/-
D13-/-
D1/D13-/-
C
NET
비히클
mD1
mD13
D
무세포 DNA (ng/ml)
비히클
mD1
mD13
E
PFA-고정 NET
비히클
mD1
mD13
F
무세포 DNA (ng/ml)
비히클
mD1
mD13

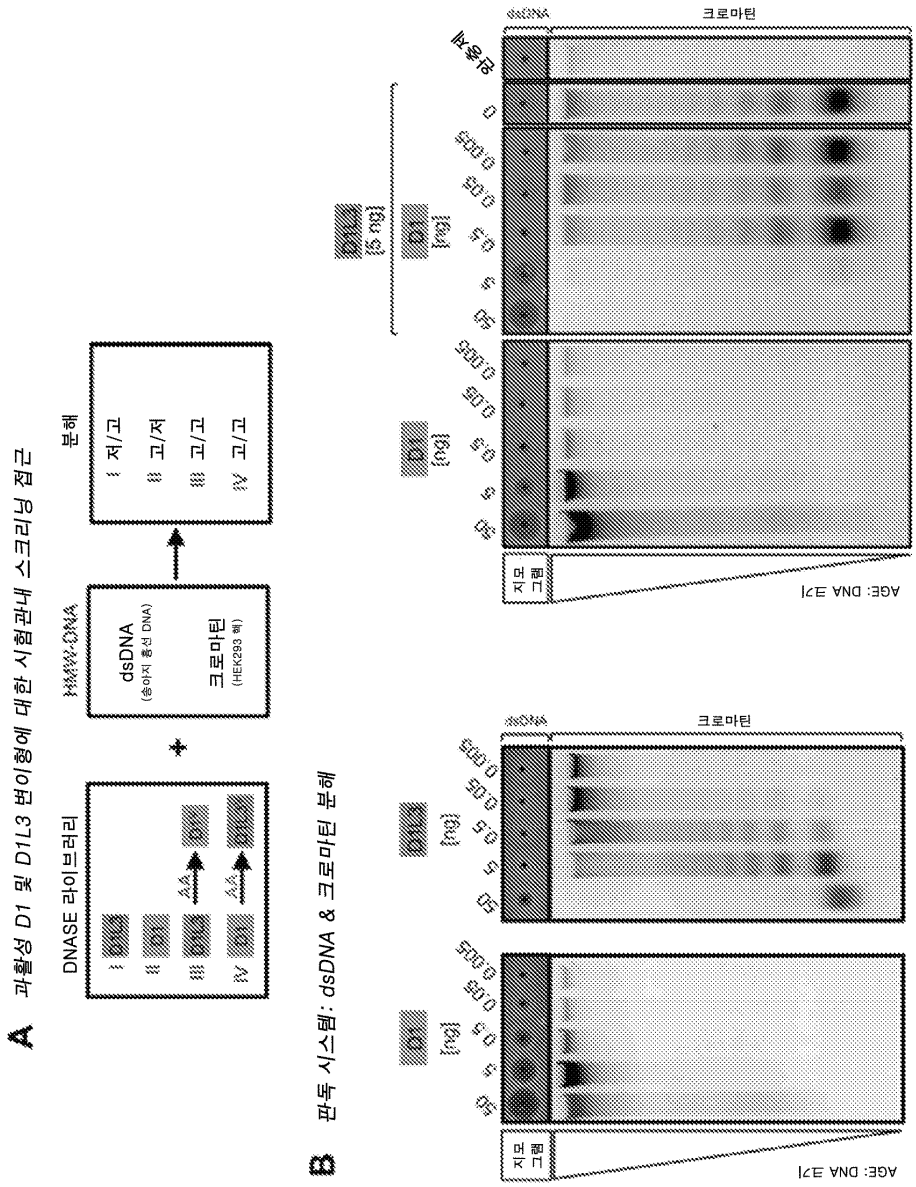
도면14


A
NHD + IgG
NHD + 항-hD1
총 DNase 활성 (%)
IgG (μg/ml)
B
NHD
NHD + 200 μg/ml 항-hD1
총 DNase 활성 (%)
헤파린 (U/ml)
C
WT
NHD
총 DNase 활성 (mU/ml)
혈장 (%)
D
D1/3-
NHD + 헤파린
DNase1 활성 (mU/ml)
혈장 (%)
E
D1/3-
NHD + 항-hD1
DNase1l3 활성 (mU/ml)
혈장 (%)
F
마우스
인간
WT 혈장
D1/3- 혈장
D1/3/13- 혈장
NHD 혈장
NHD 혈장 + 항-hD1
G
무세포 DNA (ng/ml)
WT
D1/3-
D1/3/13-
NHD
NHD + 항-hD1
마우스
인간

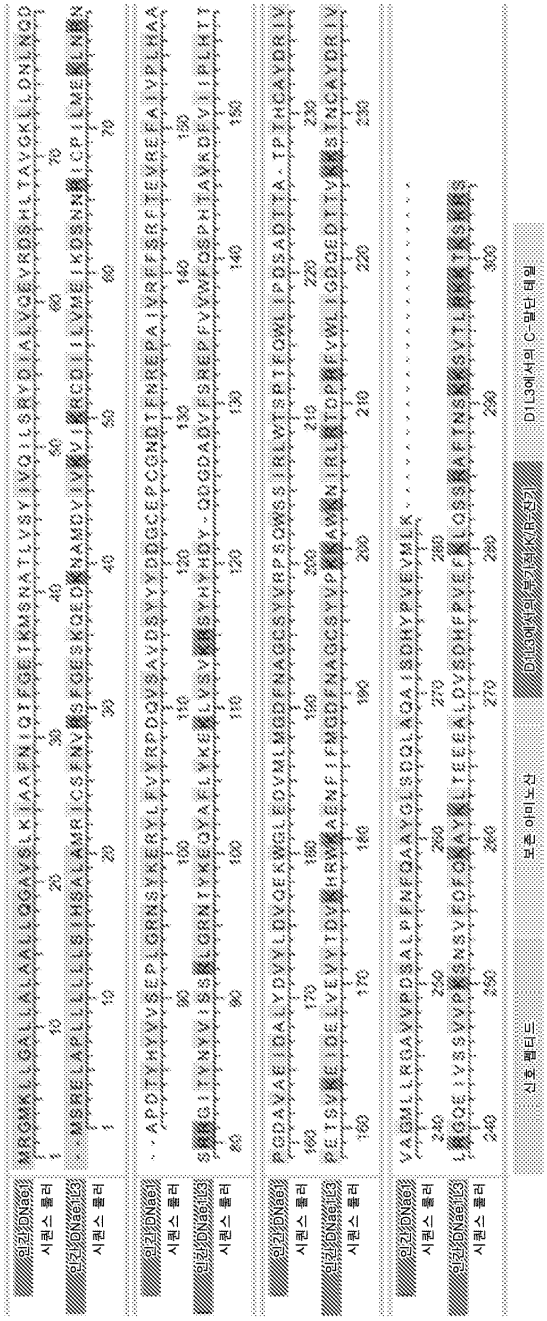
도면15


A
WT + CSF3
D1-/- + CSF3
D1/Dl13-/- + CSF3
생존율 (%)
100
75
50
25
0
0 1 2 3 4 5 6 7
시간 (d)
§
B
D1/D113-/- + CSF3
H&E
C
D1/D113-/-
+ Ctrl/CSF3
+ D1/CSF3
+ D113/CSF3
생존율 (%)
100
75
50
25
0
0 1 2 3 4 5 6 7
시간 (d)
§

도면16


A 과활성 D1 및 D1L3 변이형에 대한 시험관내 스크리닝 접근
DNASE 라이브러리
i D1
ii D1
iii D1
iv D1
분해
i 저/고
ii 고/저
iii 고/고
iv 고/고
dsDNA
(송아지 흉선 DNA)
크로마틴
(HEK293 핵)
B 판독 시스템: dsDNA & 크로마틴 분해
dsDNA
크로마틴
D1 [ng]
D1 [fu]
dsDNA [ng]
0
500 fu
50 fu
5 fu
0.5 fu
0 ng
5 ng
50 ng
500 ng
지모그램
AGE: DNA 크기

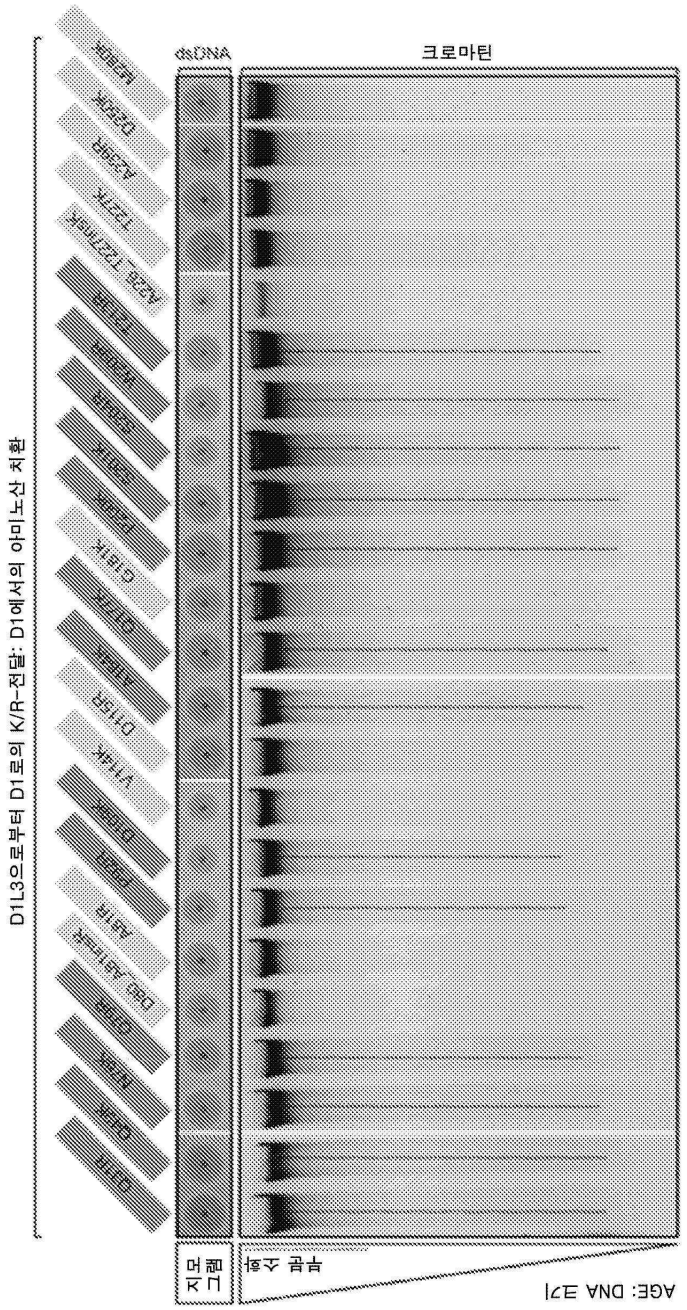
도면17


신규DNA61
시퀀스 롤러
원천DNA613
시퀀스 롤러
신규DNA61
시퀀스 롤러
원천DNA613
시퀀스 롤러
신규DNA61
시퀀스 롤러
원천DNA613
시퀀스 롤러
신규DNA61
시퀀스 롤러
원천DNA613
시퀀스 롤러
신호 펩타드
보존 아미노산
D113에서의 C-말단 테일

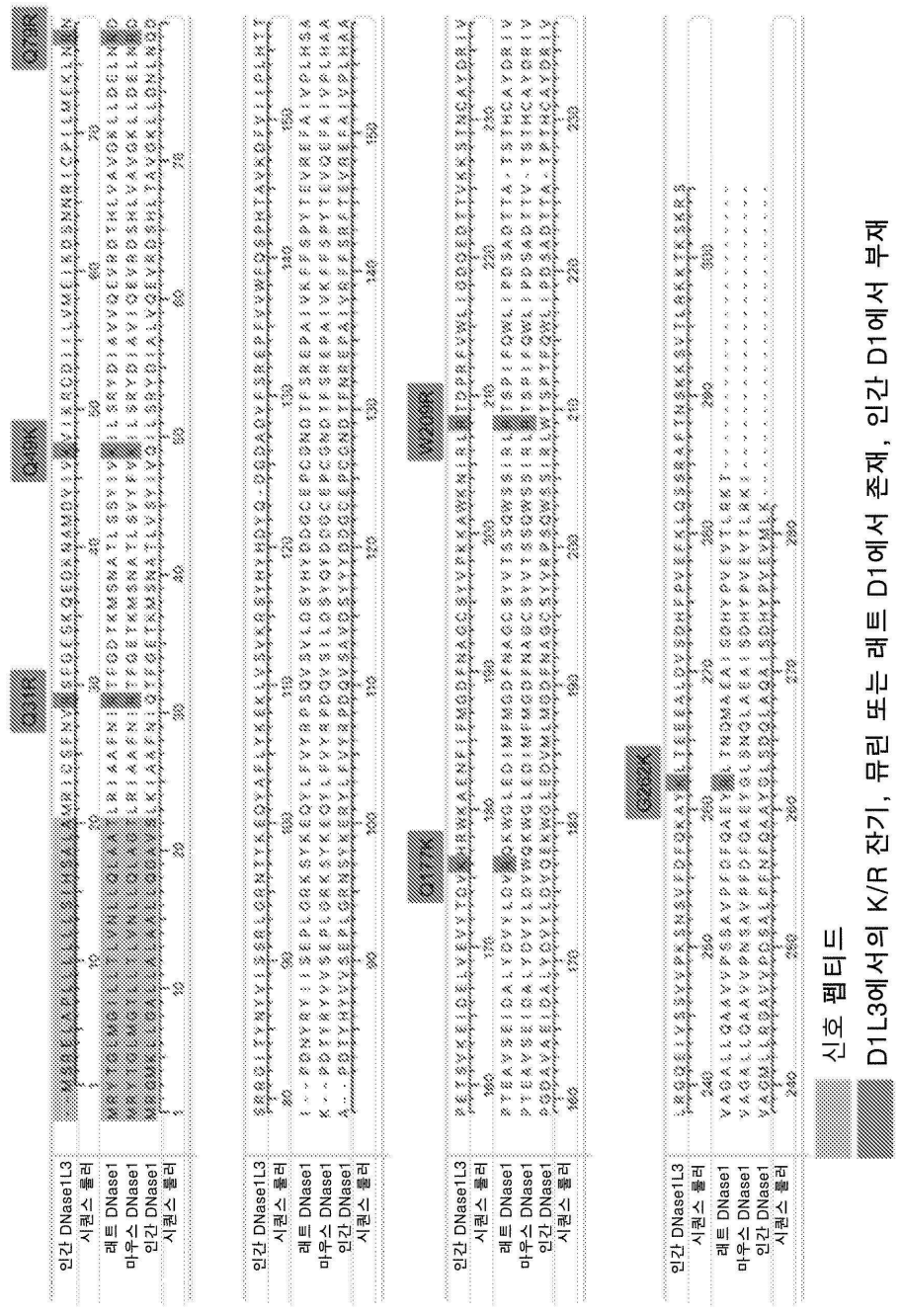
도면18

#	DNase1L3	DNase1	DNase1에서의 돌연변이	본 출원에서 분석됨
1	R29 (R9)	Q31 (Q9)	Q31R (Q9R)	+
2	K39 (R19)	A41 (A19)	A41K (A19K)	-
3	K47 (K27)	Q49 (Q27)	Q49K (Q27K)	+
4	K50 (K30)	S52 (S30)	S52K (S30K)	-
5	R66 (R46)	T68 (T46)	T68R (T46R)	-
6	K74 (K54)	N76 (N54)	N76K (N54K)	+
7	R77 (R57)	Q79 (Q57)	Q79R (Q57R)	+
8	R80 (R60)	-	D80_A81insR (D60_A61insR)	+
9	R81 (R61)	A81 (A59)	A81R (A61R)	+
10	R92 (R72)	P92 (P70)	P92R (P70R	+
11	K109 (K89)	D109 (D87)	D109K (D87K)	+
12	K114 (K94)	V114 (V92)	V114K (V92)	+
13	R115 (K95)	D115 (D93)	D115R (D92R)	+
14	K163 (K143)	A164 (A142)	A164K (A142K)	+
15	K176 (K156)	Q177 (Q155)	Q177K (Q115K)	+
16	K180 (K160)	G181 (G159)	G181K (G159K)	+
17	K199 (K179)	P200 (P178)	P200K (P178K)	-
18	K200 (K180)	S201 (S179)	S201K (S179K)	+
19	K203 (K183)	S204 (S182)	S204K (S182K)	+
20	R208 (R188)	W209 (W187)	W209R (W187R)	+
21	R212 (R192)	T213 (T191)	T213R (T191R)	+
22	K226 (K206)	-	A226_T227insK (A204_T205insK)	+
23	K227 (K207)	T227 (T205)	T227K (T205K)	+
24	R239 (R219)	A239 (A217)	A239R (A217R)	+
25	K250 (K230)	D250 (D228)	D250K (D228K)	+
26	K259 (K239)	A259 (A237)	A259K (A237K)	-
27	K262 (K262)	G262 (G240)	G262K (G240K)	-
28	K280 (K260)	M280 (M258)	M280K (M258K)	+
29	R285 (K265)	-	-	-
30	K291 (K271)	-	-	-
31	K292 (K272)	-	-	-
32	R297 (K277)	-	-	-
33	K298 (K278)	-	-	-
34	K299 (K279)	-	-	-
35	K301 (K281)	-	-	-
36	K303 (K283)	-	-	-
37	R304 (K284)	-	-	-

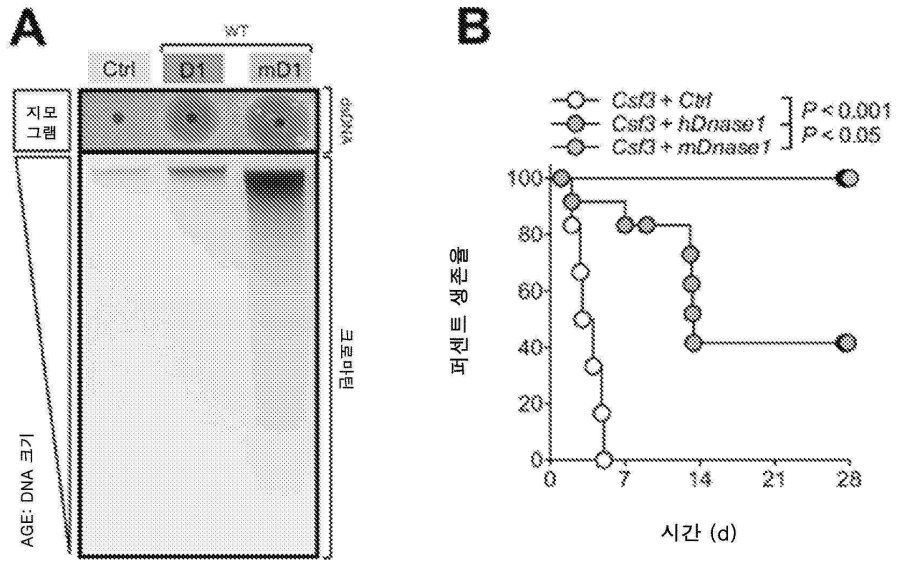
도면19


D1L13으로부터 D1로의 K/R-전달: D1에서의 아미노산 치환
dsDNA
크로마틴
그램 지
부분 소화
AGE: DNA 크기

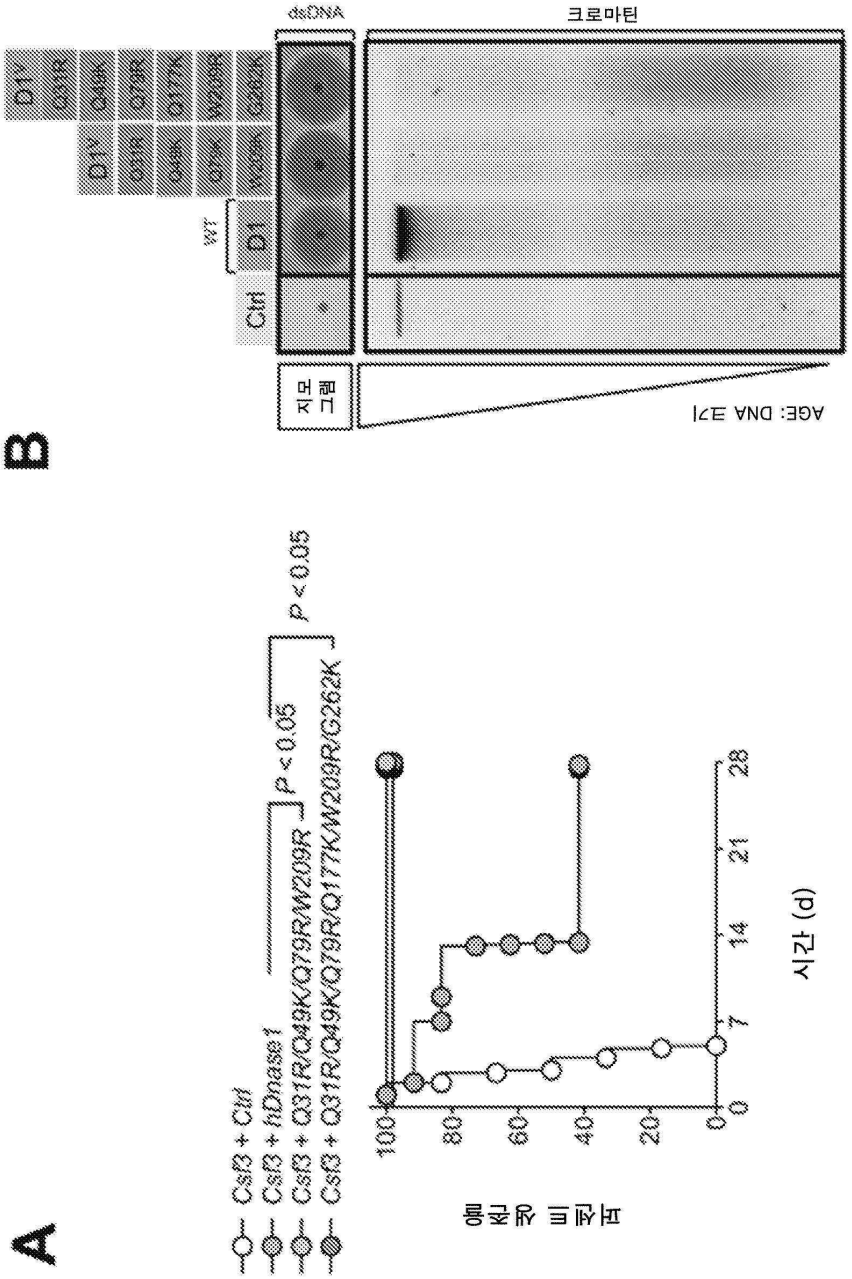
도면20


인간 DNase1L3
시퀀스 얼라인
래트 DNase1
마우스 DNase1
인간 DNase1
시퀀스 얼라인
신호 펩티드
D1L3에서의 K/R 잔기, 유린 또는 래트 D1에서 존재, 인간 D1에서 부재

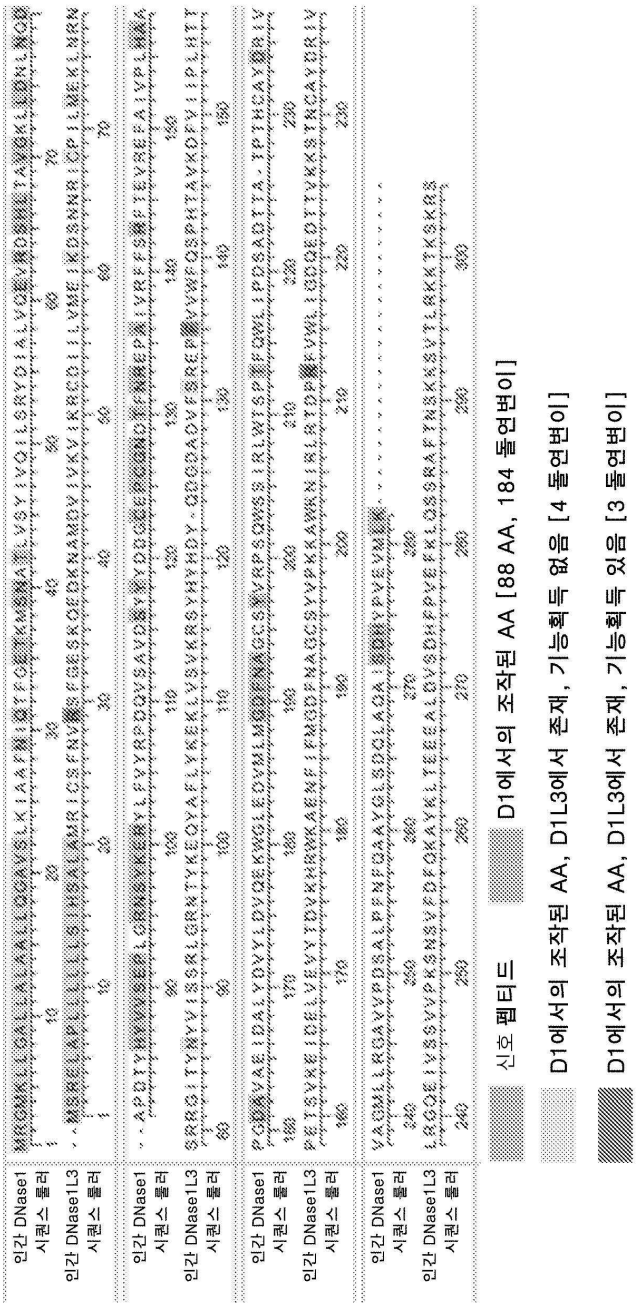
도면21


A
WT
Ctrl
D1
mD1
지모그램
gDNA
AGE: DNA 크기
리모콜
B
Csf3 + Ctrl
Csf3 + hDnase1
Csf3 + mDnase1
P < 0.001
P < 0.05
퍼센트 생존율
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
시간 (d)

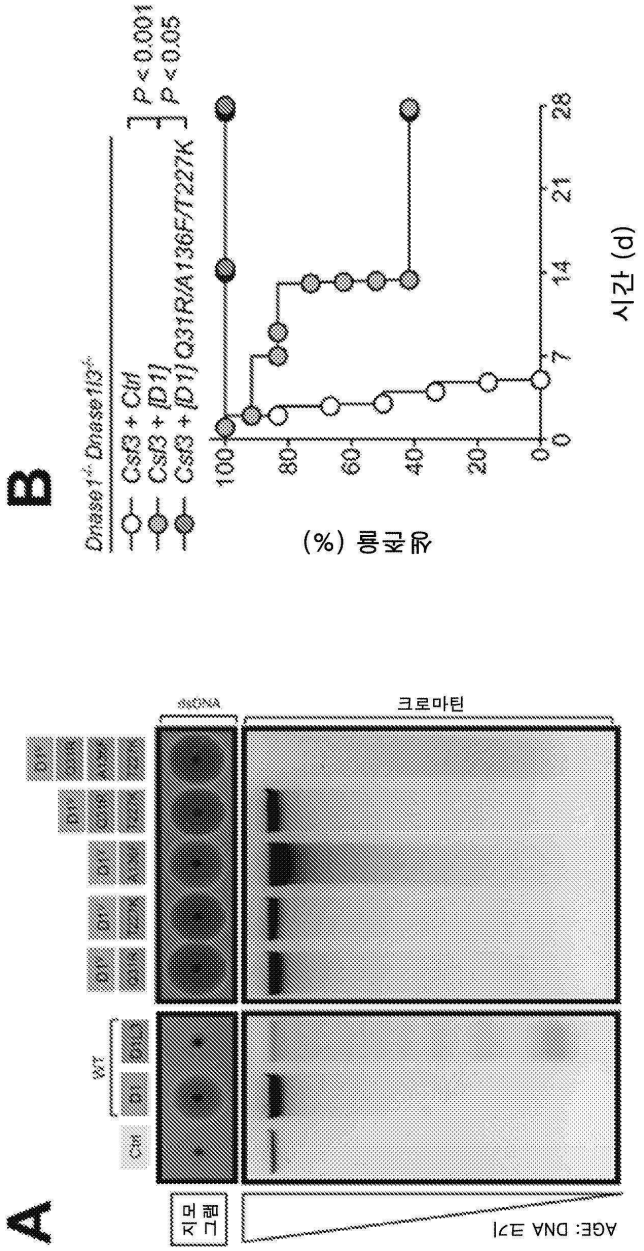
도면22


B
dsDNA
크로마틴
D1
Q31R
Q49K
Q79R
Q177K
W209R
G262K
D1V
Q31R
Q49K
Q79R
W209R
G262K
WT
D1
Ctrl
젤 머그
AGE: DNA 크기
A
Csf3 + Ctrl
Csf3 + hDnase1
Csf3 + Q31R/Q49K/Q79R/W209R
Csf3 + Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K
P < 0.05
P < 0.05
세포 생존율
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
시간 (d)

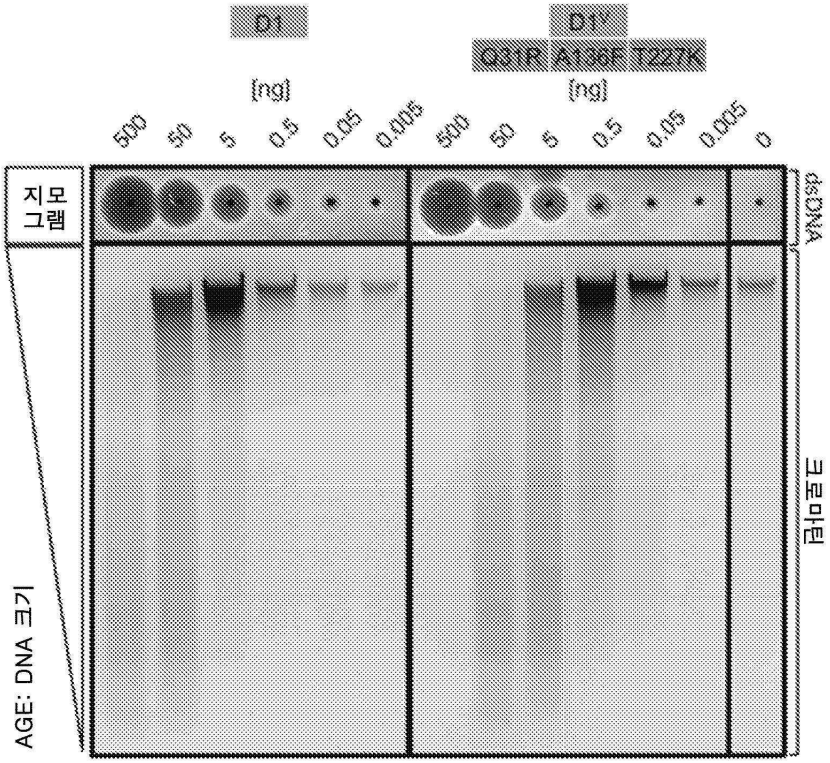
도면23


인간 DNase1 시퀀스 폴리
인간 DNase1L3 시퀀스 폴리
신호 펩티드
D1에서의 조작된 AA [88 AA, 184 돌연변이]
D1에서의 조작된 AA, D1L3에서 존재, 기능획득 없음 [4 돌연변이]
D1에서의 조작된 AA, D1L3에서 존재, 기능획득 있음 [3 돌연변이]

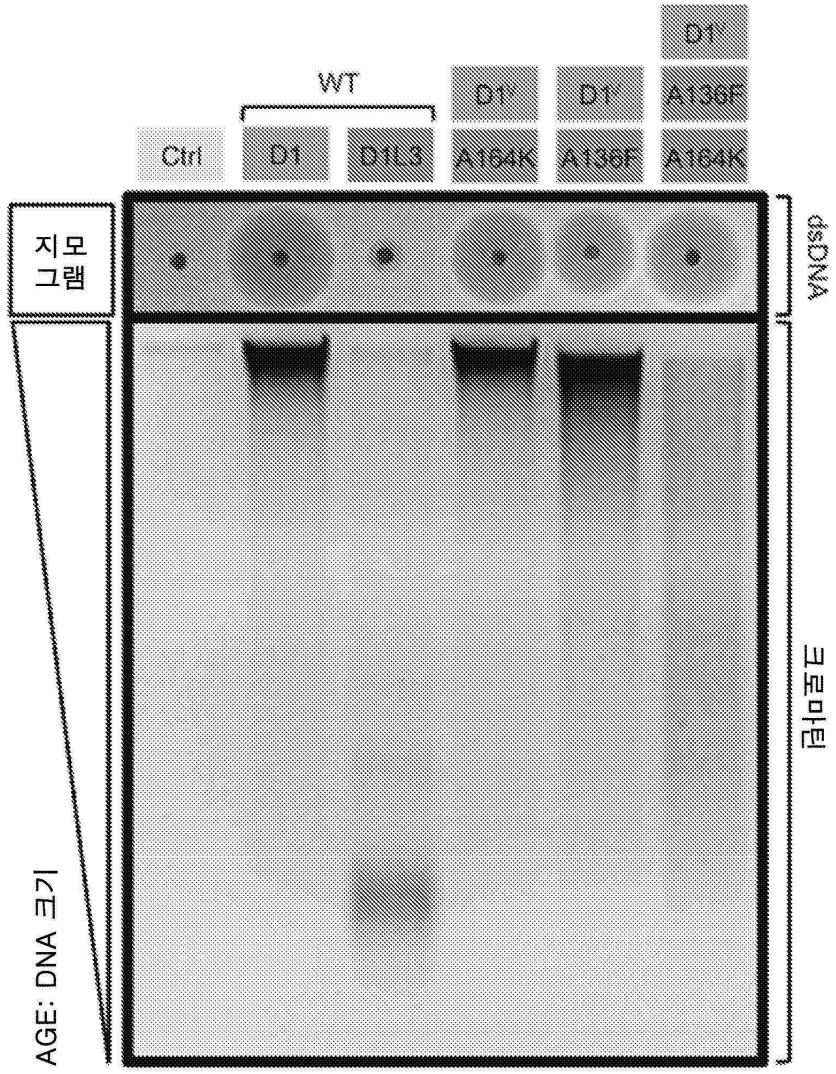
도면24


B
Dnase1+/+ Dnase1l3+/+
Csf3 + Ctrl
Csf3 + [D1]
Csf3 + [D1] Q31R/A136F/T227K
P < 0.001
P < 0.05
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
시간 (d)
A
ssDNA
크로마틴
Ctrl
WT
1.6
AGE: DNA 크기
자유 DNA

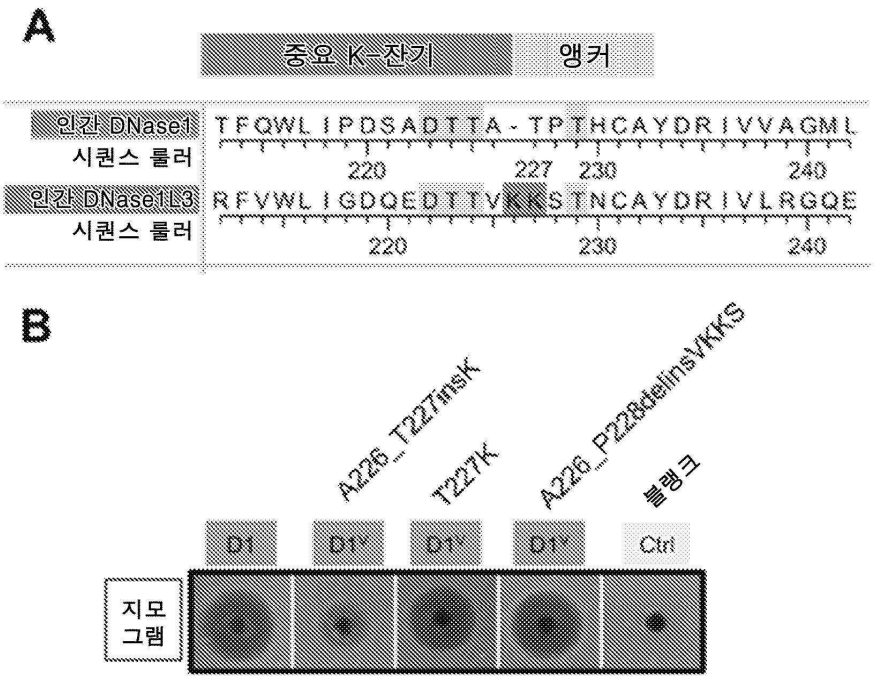
도면25


D1
D1'
Q31R A136F T227K
[ng]
[ng]
500 50 5 0.5 0.05 0.005
500 50 5 0.5 0.05 0.005 0
지모그램
dsDNA
크로마틴
AGE: DNA 크기

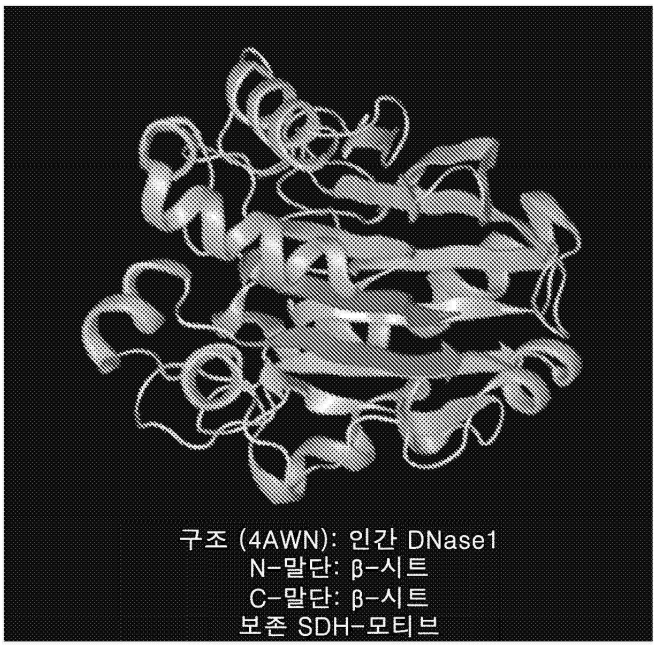
도면26


D1'
WT
D1'
D1'
A136F
Ctrl
D1
D1L3
A164K
A136F
A164K
지모
그램
dsDNA
크로마틴
AGE: DNA 크기

도면27

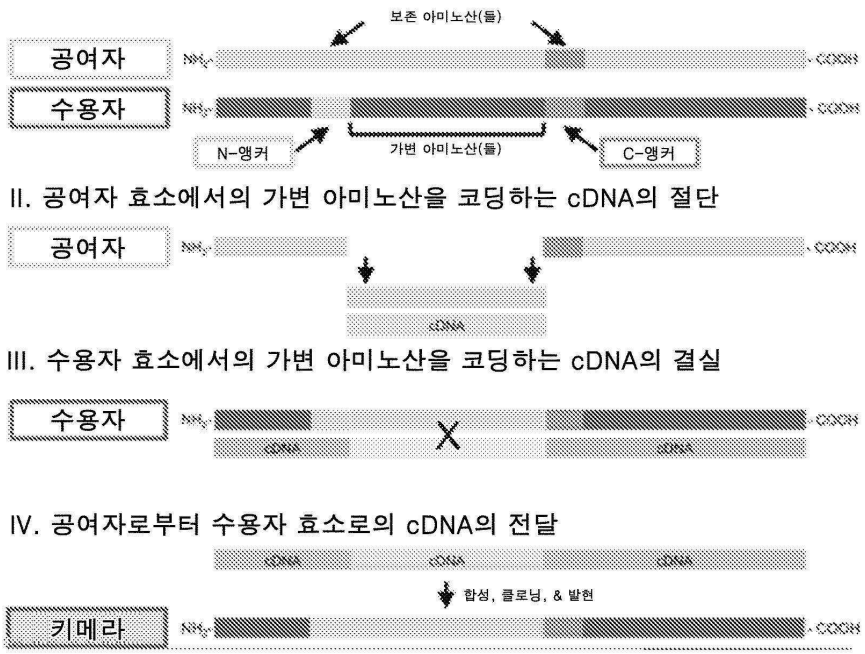

A
중요 K-잔기
앵커
인간 DNase1
시퀀스 룰러
T F Q W L I P D S A D T T A - T P T H C A Y D R I V V A G M L
220
227
230
240
인간 DNase1L3
시퀀스 룰러
R F V W L I G D Q E D T T V K K S T N C A Y D R I V L R G Q E
220
230
240
B
A226_T227insK
T227K
A226_P228delinsVKKS
블랭크
D1
D1'
D1'
D1'
Ctrl
지모그램

도면28

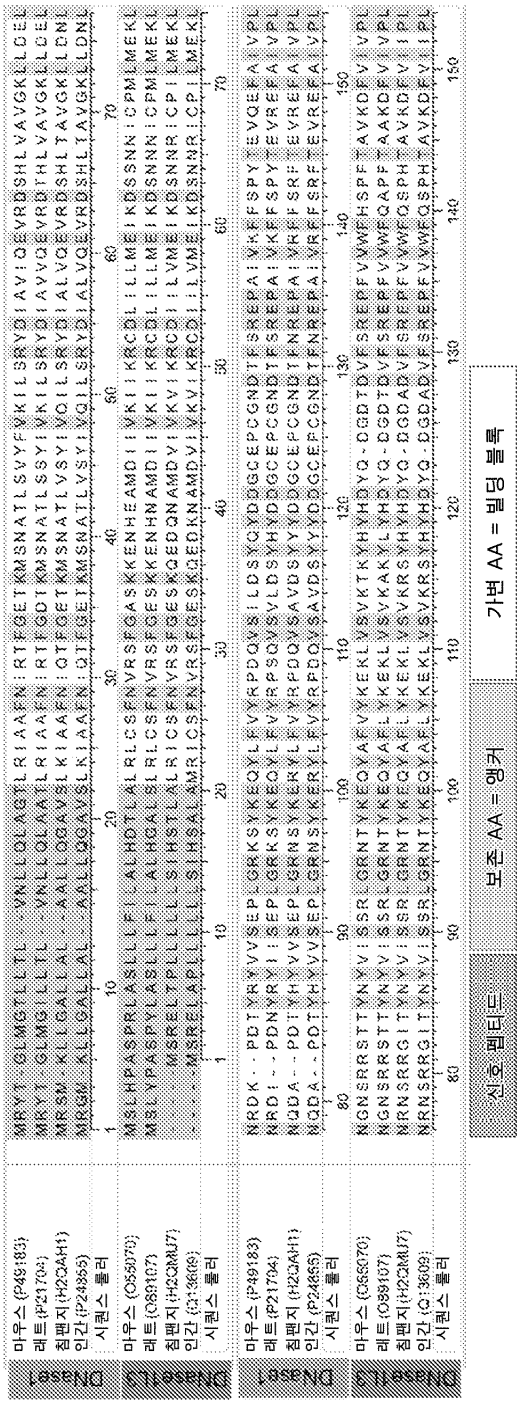

구조 (4AWN): 인간 DNase1
N-말단: β-시트
C-말단: β-시트
보존 SDH-모티브

도면29

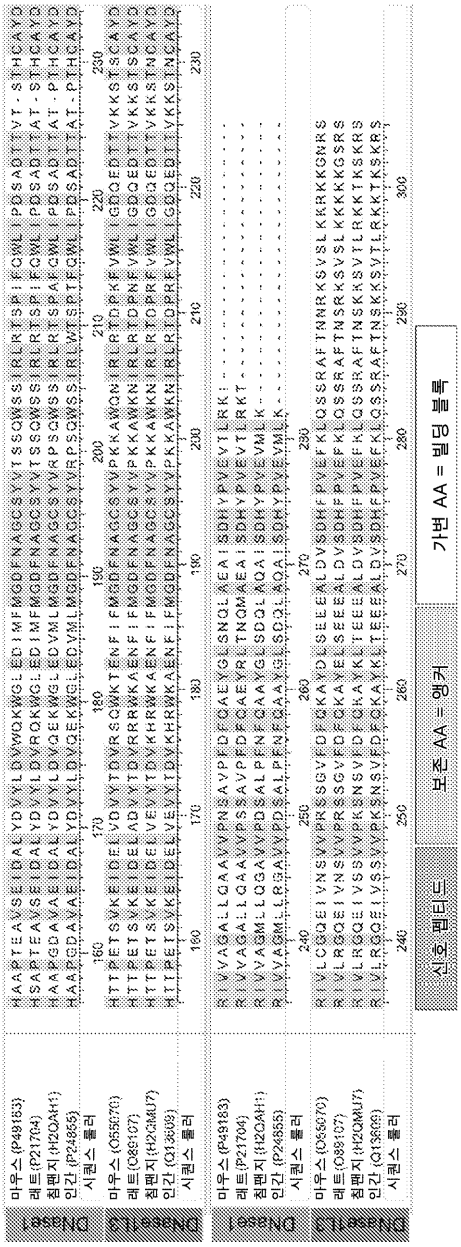
상동 단백질의 빌딩 블록-조작



도면30a

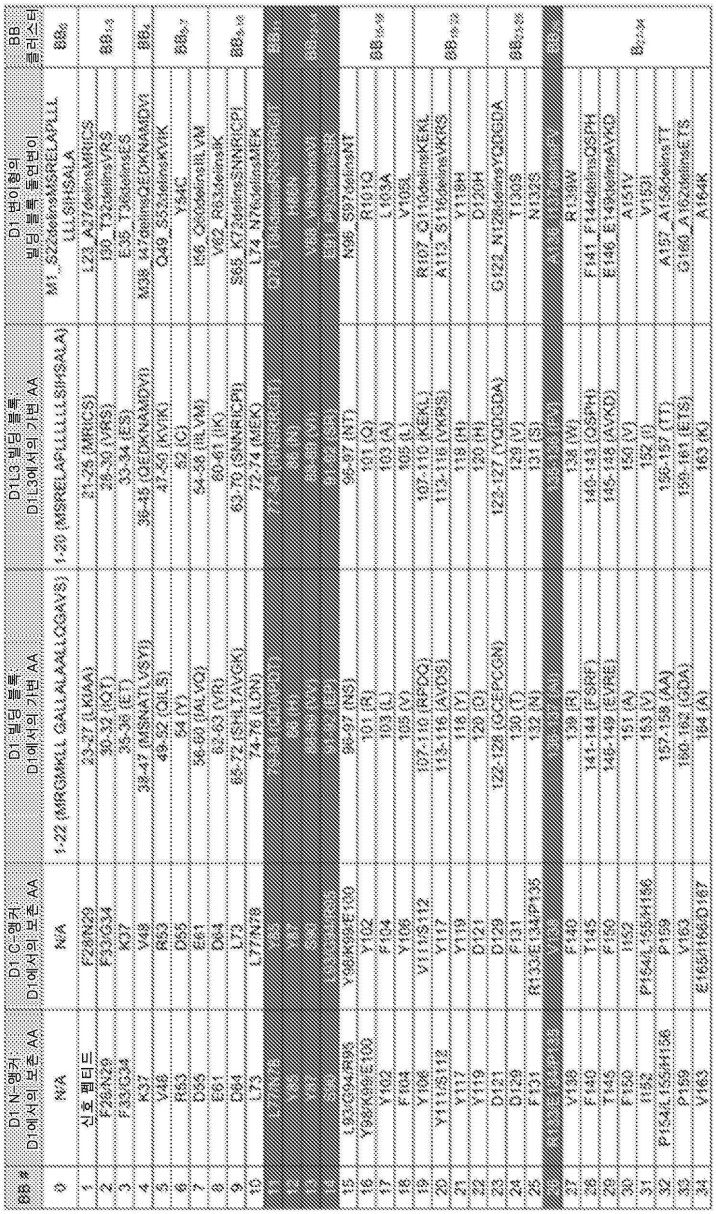

마우스 (P49183)
래트 (P21704)
침팬지 (H2QMJ7)
인간 (Q13608)
시퀀스 롤러
DNase1
마우스 (O55070)
래트 (Q891071)
침팬지 (H2QMJ7)
인간 (Q13609)
시퀀스 롤러
DNase1L3
마우스 (P49183)
래트 (P21704)
침팬지 (H2QMJ7)
인간 (P24855)
시퀀스 롤러
DNase1
마우스 (O55070)
래트 (Q891071)
침팬지 (H2QMJ7)
인간 (Q13609)
시퀀스 롤러
DNase1L3
신호 펩티드
보존 AA = 앵커
가변 AA = 빌딩 블록

도면30b


DNase1
DNase1L3
마우스 (P49183)
래트 (P21704)
침팬지 (H2QAH1)
인간 (P24855)
시퀀스 롤러
마우스 (O55070)
래트 (Q89107)
침팬지 (H2QMU7)
인간 (Q13609)
시퀀스 롤러
신호 펩티드
보존 AA = 앵커
가변 AA = 빌딩 블록

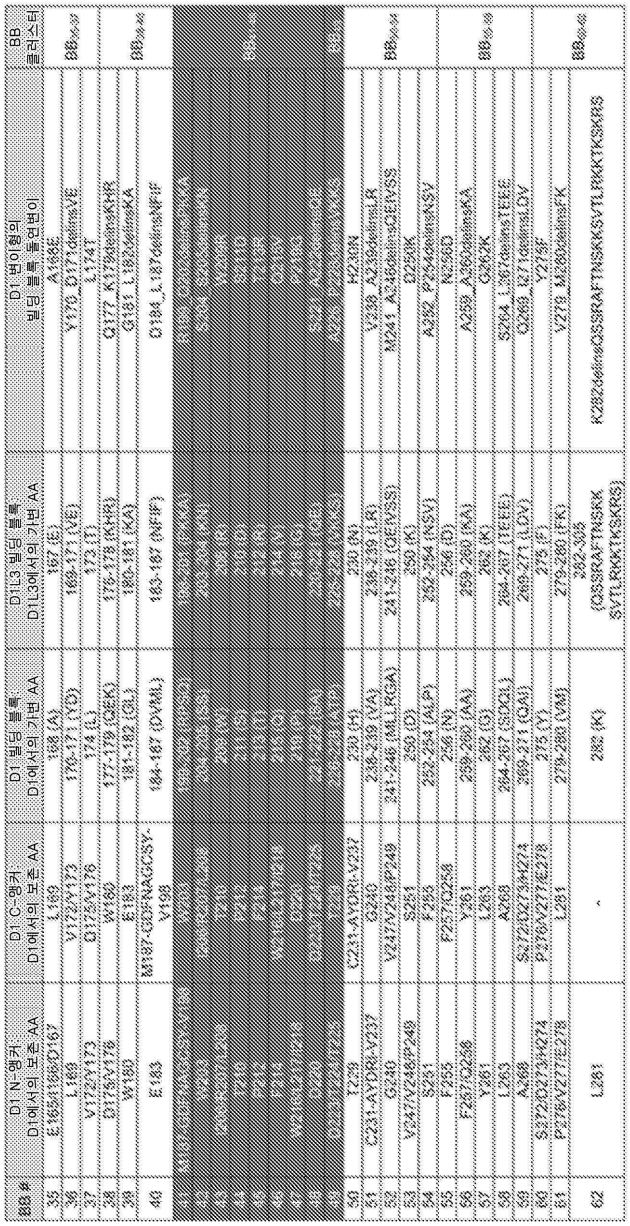
도면31aa

A. 빌딩 블록 조작의 예: 인간 DNase1L3 (D1L3)으로부터의 빌딩 블록을 갖는 인간 DNase1 (D1) 변이형



도면31ab

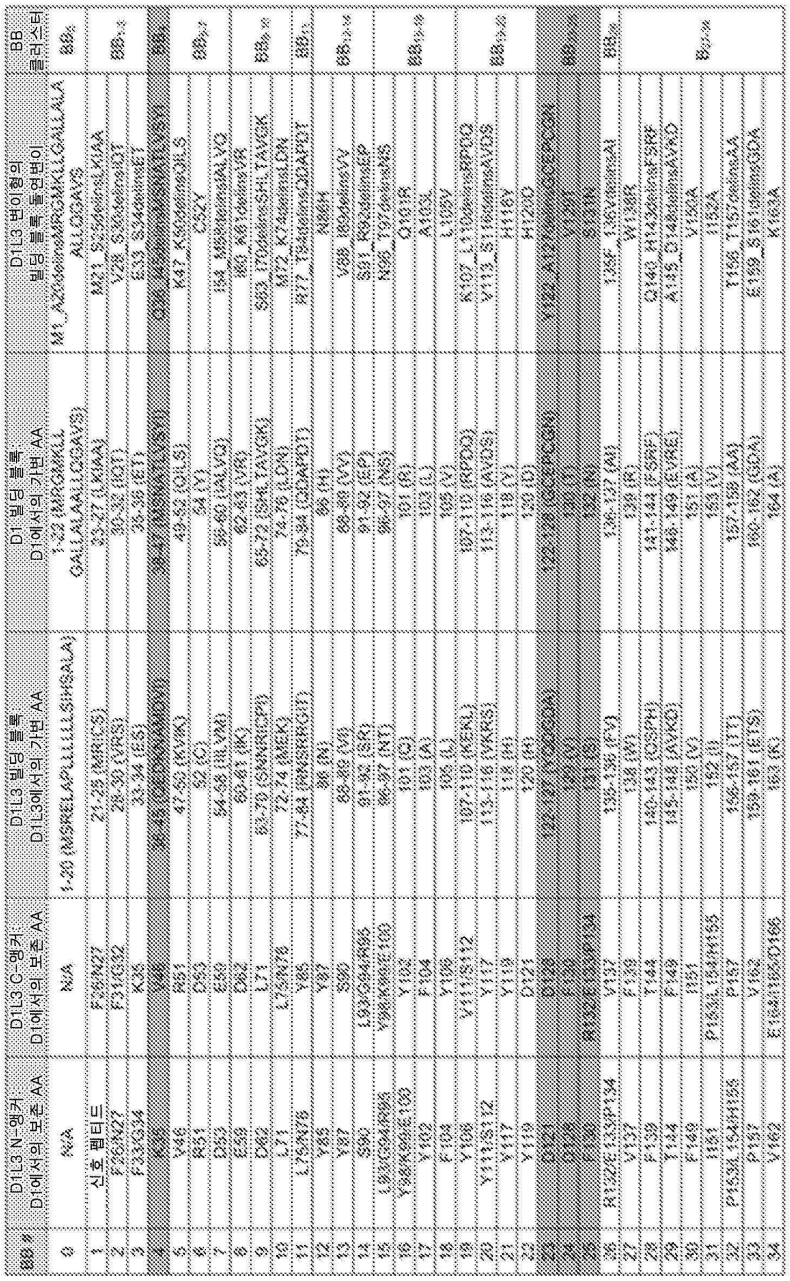
A: 계속



BB #	D1 N-엔커 D1에서의 보존 AA	D1 C-엔커 D1에서의 보존 AA	D1 빌딩 블록 D1에서의 기본 AA	D1 L3 빌딩 블록 D1L3에서의 기본 AA	D1 변이형의 빌딩 블록 돌연변이	BB 클러스터
35	E165/I166/D167	L169	168 (A)	167 (E)	A166E	
36	L169	V172/V173	170-171 (YD)	169-171 (VE)	Y170_D171delinsVE	BB_{35-37}
37	V172/V173	Q175/V176	174 (L)	172 (T)	L174T	
38	D176/V176	W180	177-179 (QEK)	175-178 (KHR)	Q177_K179delinsKHR	
39	W180	E183	181-182 (QL)	180-181 (KA)	G181_L182delinsKA	BB_{38-40}
40	E183	M187-G3PNAGG3Y-Y193	184-187 (DVML)	183-187 (NFIF)	Q184_L187delinsNFIF	
41	V187-G3PNAGG3Y-Y193	W201/R202/Y204	197-200 (GEQT)	193-202 (GEQTRRYY)	V198_G3PNAGG3Y-Y204delinsGEQTRRYY	
42	W201/R202/Y204	R202/Y204/G206	201-203 (GQG)	203-204 (RG)	Y204R	
43	R202/Y204/G206	D211	207 (V)	205 (S)	Y204S	
44	D211	K214	212 (G)	206-211 (GGGGGG)	R205_Y211delinsG	
45	K214	P216	215 (R)	212-214 (RRR)	K212R	
46	P216	V218/Q219/D220	217 (G)	215-217 (GGG)	P215G	BB_{41-44}
47	V218/Q219/D220	S224	221 (G)	218-220 (GGG)	Q219_D220delinsGG	
48	S224	R227/T228/Y229	225-226 (AD)	221-225 (GGGGG)	S224_R227delinsGG	
49	R227/T228/Y229	L239	230 (H)	230 (N)	K230N	
50	L239	C231-AYDR-V237	230 (H)	230 (N)	K230N	
51	C231-AYDR-V237	G240	238-239 (VA)	236-239 (LR)	V238_A239delinsLR	BB_{45-47}
52	G240	V247/V248/P249	241-248 (MLLRGA)	241-246 (QEIVSS)	M241_A246delinsQEIVSS	
53	V247/V248/P249	S251	250 (D)	250 (K)	D250K	
54	S251	F255	252-254 (ALP)	252-254 (KSV)	A252_P254delinsKSV	
55	F255	F257/Q258	256 (N)	256 (D)	N256D	
56	F257/Q258	Y261	259-260 (AA)	259-260 (KA)	A259_A260delinsKA	BB_{48-49}
57	Y261	L263	262 (S)	262 (K)	G262K	
58	L263	A268	264-267 (SDCL)	264-267 (TEEE)	S264_L267delinsTEEE	
59	A268	S272/Q273/H274	269-271 (QAL)	269-271 (LDY)	Q268_L271delinsLDY	
60	S272/Q273/H274	P276/V277/E278	275 (Y)	275 (F)	Y275F	
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (VM)	279-280 (FK)	V278_M280delinsFK	BB_{50-52}
62	L281	-	282 (K)	282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)	K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS	

도면31ba

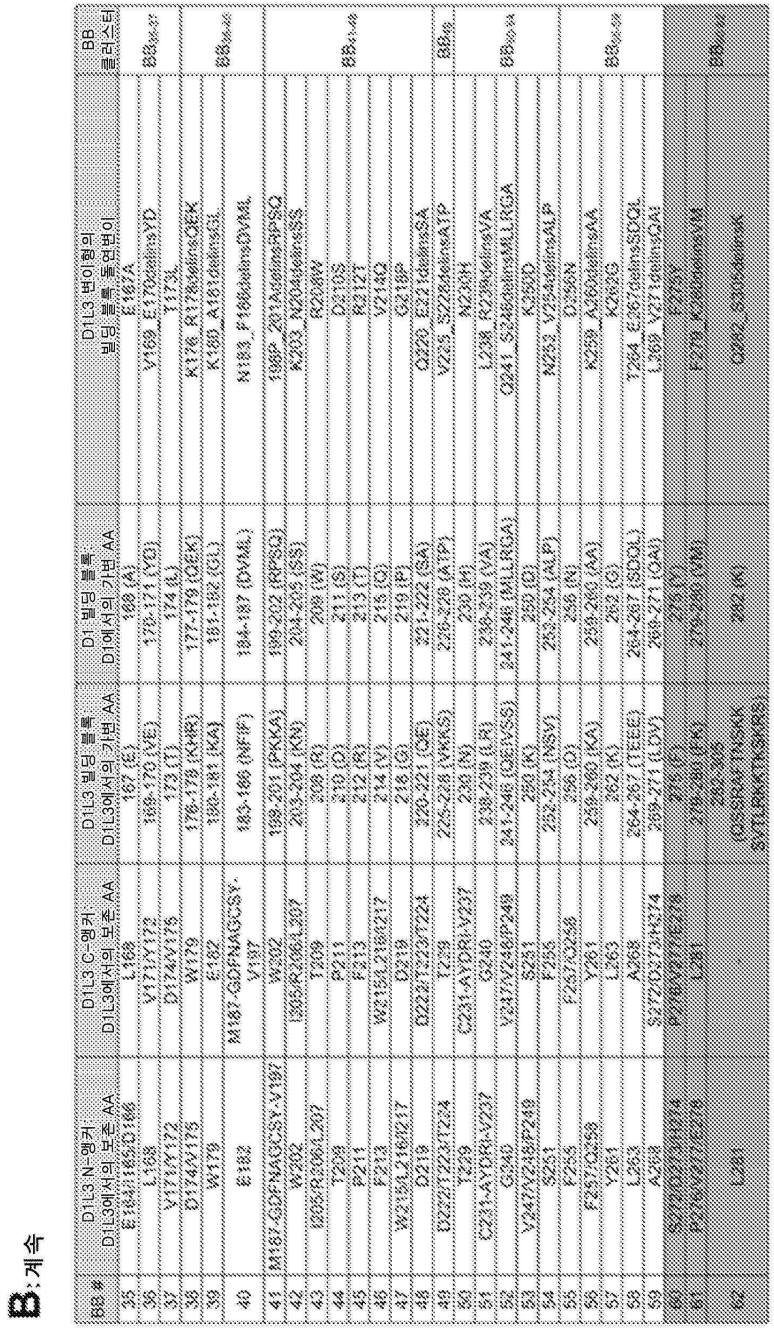
B: 빌딩 블록 조작의 예: 인간 DNase1 (D1)로부터의 빌딩 블록을 갖는 인간 DNase1L3 (D1L3) 변이형



BB #	D1L3 N-말단: D1에서의 보존 AA	D1L3 C-말단: D1에서의 보존 AA	D1L3 빌딩 블록: D1L3에서의 기본 AA	D1 빌딩 블록: D1에서의 기본 AA	D1L3 변이형의 빌딩 블록 돌연변이	BB 클러스터
0	N/A	N/A	1-20 (MSRELAPLLLLLLSHSALA)	1-23 (MPGMKLLGALLAALLQGAVS)	M1_A23delinsMPGMKLLGALLAALLQGAVS	BB_0
1	신호 펩티드	F36/N27	21-28 (MRICSF)	23-27 (LKAAA)	M21_S35delinsLKIAA	BB_{1-3}
2	F36/N27	F31/G32	26-30 (YRSI)	30-32 (IQT)	Y28_S32delinsIQT	
3	F33/S34	K35	33-34 (ES)	33-36 (ETI)	E33_S34delinsETI	
4	K35	Y48	35-47 (DSSKRDVIL)	37-47 (TSSKTLYSYIL)	G36_K47delinsSSKTLYSYIL	BB_4
5	Y48	R51	47-53 (KVIKK)	49-52 (QILS)	K47_K52delinsQILS	BB_{5-7}
6	R51	D53	52 (Q)	54 (Y)	C52Y	
7	D53	E58	54-58 (IILYR)	56-60 (IALYQ)	I54_M59delinsIALYQ	
8	E58	D62	60-61 (IK)	62-63 (VR)	I60_K61delinsVR	BB_{8-10}
9	D62	L71	63-70 (SNWRICPI)	65-72 (SHLTAVGK)	S63_I70delinsSHLTAVGK	
10	L71	L75/N76	72-74 (MEK)	74-76 (LDK)	M72_K74delinsLDK	
11	L75/N76	Y85	77-84 (RNSRPGIT)	79-84 (QDAPDT)	R77_T84delinsQDAPDT	BB_{11}
12	Y85	Y87	86 (N)	86 (H)	A86H	
13	Y87	S90	88-89 (VI)	88-89 (VV)	V88_I89delinsVV	BB_{13-14}
14	S90	L93/G94/R95	91-96 (SR)	91-96 (EEP)	S91_R96delinsEEP	
15	L93/G94/R95	Y98/K99/E100	96-97 (NT)	96-97 (NS)	N96_T97delinsNS	
16	Y98/K99/E100	Y102	101 (Q)	101 (R)	Q101R	BB_{15-18}
17	Y102	F104	103 (A)	103 (L)	A103L	
18	F104	Y106	105 (L)	105 (Y)	L105Y	
19	Y106	V111/S112	107-110 (KERL)	107-110 (RPDQ)	K107_L110delinsRPDQ	
20	V111/S112	Y117	113-116 (VKRS)	113-116 (AVDS)	Y113_S116delinsAVDS	BB_{19-20}
21	Y117	Y119	118 (H)	118 (Y)	H116Y	
22	Y119	D121	120 (H)	120 (D)	H120D	
23	D121	D126	122-125 (QCEP)	122-128 (QCEPCGR)	Y122_A125delinsQCEPCGR	BB_{21-23}
24	D126	F134	127 (V)	130 (T)	V130T	
25	F134	R132E/T133P134	131 (S)	132 (N)	S131N	
26	R132E/T133P134	Y137	135-136 (FY)	136-137 (AI)	L135F_L136YdelinsAI	BB_{24}
27	Y137	F139	138 (R)	139 (R)	W138R	
28	F139	T144	140-143 (QSPH)	141-144 (FSRF)	Q140_H143delinsFSRF	
29	T144	F149	145-148 (AVKD)	145-149 (EVRE)	A145_D148delinsAVKD	
30	F149	I151	150 (V)	151 (A)	V150A	
31	I151	P153/L154/H155	152 (I)	153 (V)	I152A	BB_{25-28}
32	P153/L154/H155	P157	156-157 (TT)	157-159 (AA)	T156_T157delinsAA	
33	P157	Y162	159-161 (ETS)	160-162 (GDA)	E159_S161delinsGDA	
34	Y162	E164/I165/D166	163 (R)	164 (A)	K163A	

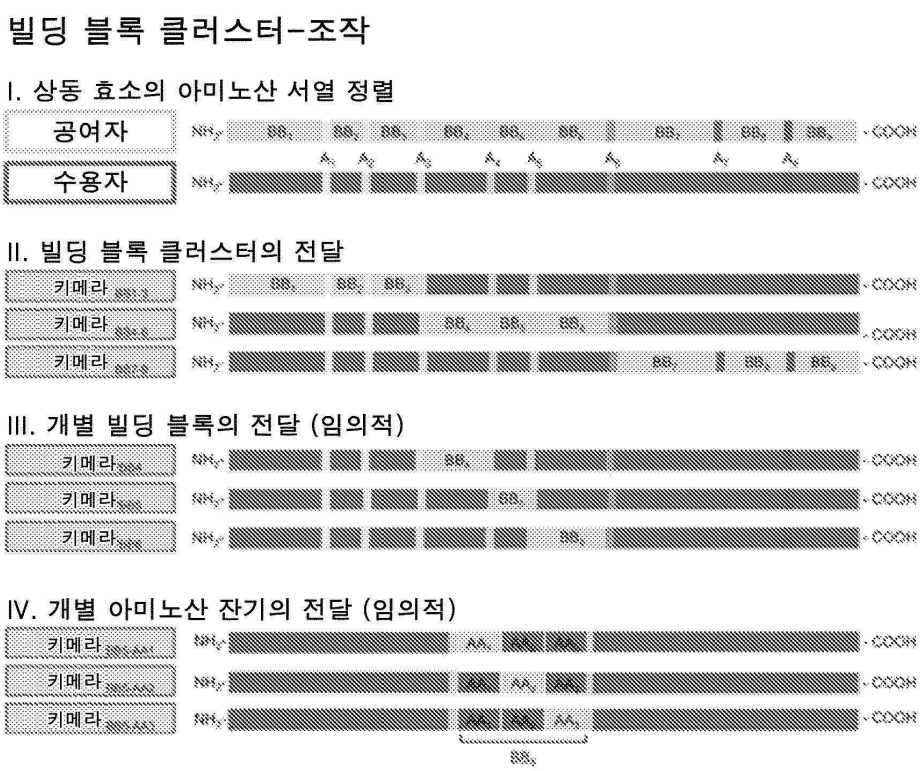
도면31bb

B: 계속

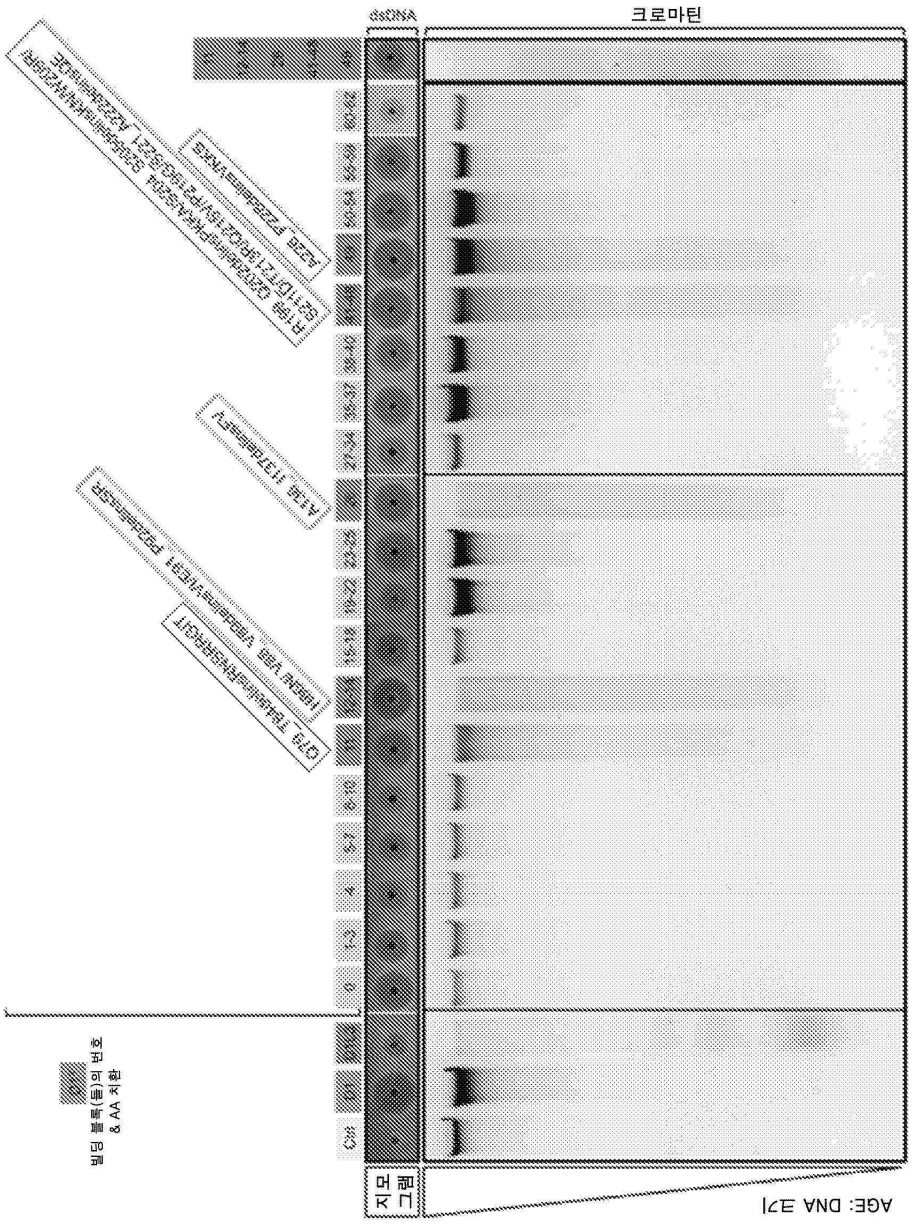


BB # D1L3 N-앵커 D1L3에서의 보존 AA	D1L3 C-앵커 D1L3에서의 보존 AA	D1L3 빌딩 블록 D1L3에서의 가변 AA	D1 빌딩 블록 D1에서의 가변 AA	D1L3 변이형의 빌딩 블록 돌연변이	BB 클러스터
35	E164/165/D166	L168	167 (E)	168 (A)	E167A	BB_{A-F}
36	L168	V171/Y172	169-170 (YE)	170-171 (YD)	Y169_E170delinsYD	
37	V171/Y172	D174/V175	173 (T)	174 (L)	T173_	
38	D174/V175	W179	176-178 (KHR)	177-179 (QEK)	K176_R178delinsQEK	
39	W179	E182	180-181 (KA)	181-182 (GL)	K180_A181delinsGL	BB_{A-H}
40	E182	M187-GDFNAGCSY-V197	183-186 (NFIP)	184-187 (DVML)	N183_P186delinsDVML	
41	M187-GDFNAGCSY-V197	W202	198-201 (PKKA)	199-202 (RPSQ)	199P_201AdelinsRPSQ	
42	W202	I205/R206/L207	203-204 (KN)	204-205 (SS)	K203_N204delinsSS	
43	I205/R206/L207	T209	208 (R)	208 (W)	R208W	
44	T209	P211	210 (D)	211 (S)	D210S	
45	P211	F213	212 (R)	213 (T)	R212T	BB_{A-H}
46	F213	W215/L216/Q217	214 (V)	215 (Q)	V214Q	
47	W215/L216/Q217	Q219	216 (Q)	219 (P)	G216P	
48	Q219	D222/T223/T224	220-221 (QE)	221-222 (SA)	Q220_E221delinsSA	
49	D222/T223/T224	T229	225-228 (VKKS)	226-229 (ATP)	V225_S228delinsATP	BB_{A-G}
50	T229	C231-AYDRI-V237	230 (N)	230 (H)	N230H	
51	C231-AYDRI-V237	G240	238-239 (LR)	239-239 (VA)	L238_R239delinsVA	
52	G240	V247/Y248/P249	241-246 (QETVSS)	241-248 (MLLRGA)	Q241_S246delinsMLLRGA	BB_{A-A}
53	V247/Y248/P249	S251	250 (K)	250 (D)	K250D	
54	S251	F255	252-254 (NSV)	253-254 (ALP)	N253_V254delinsALP	
55	F255	F257/Q258	256 (Q)	256 (N)	Q256N	
56	F257/Q258	Y261	259-260 (KA)	259-260 (AA)	K259_A260delinsAA	
57	Y261	L263	262 (K)	262 (Q)	K262Q	BB_{A-B}
58	L263	A268	264-267 (TEEE)	264-267 (SDDL)	T264_E267delinsSDDL	
59	A268	S272/D273/H274	269-271 (LDV)	269-271 (QAI)	L269_V271delinsQAI	
60	S272/D273/H274	P276/V277/E278	275 (T)	275 (T)	T275Y	
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (EK)	279-280 (VN)	E279_K280delinsVN	
62	L281		282-305 (GSSHHHHHHSSGLEVLFQGPEK)	282 (K)	Q282_S305delinsK	BB_{A-A}

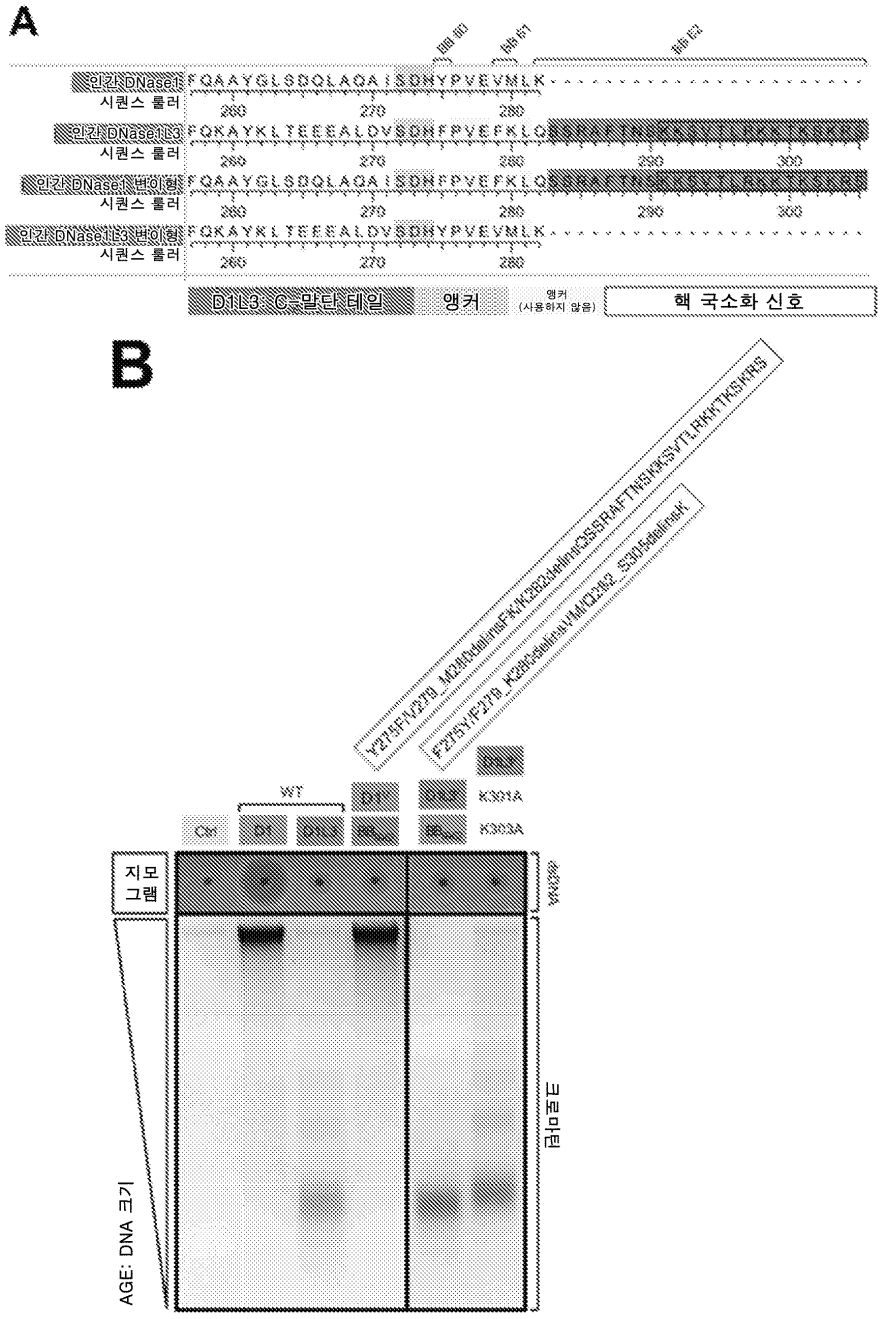
도면32


빌딩 블록 클러스터-조작
I. 상동 효소의 아미노산 서열 정렬
공여자
수용자
II. 빌딩 블록 클러스터의 전달
키메라
키메라
키메라
III. 개별 빌딩 블록의 전달 (임의적)
키메라
키메라
키메라
IV. 개별 아미노산 잔기의 전달 (임의적)
키메라
키메라
키메라

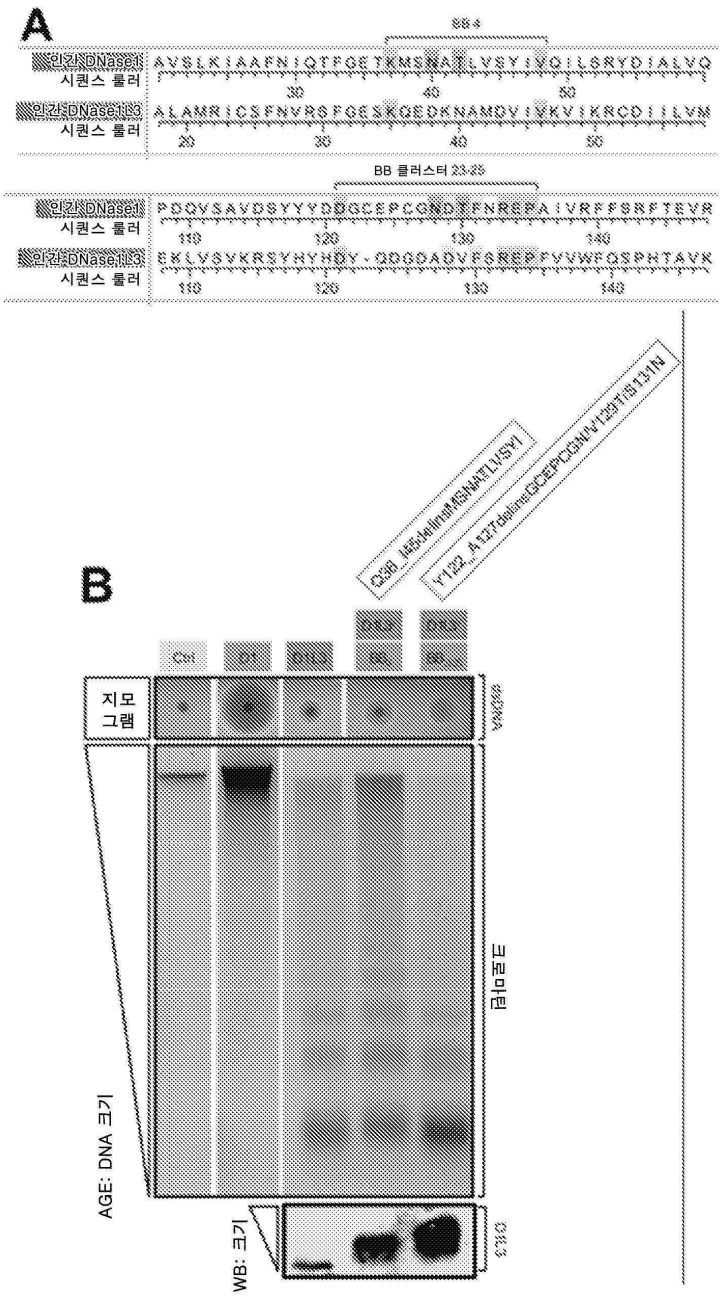
도면33



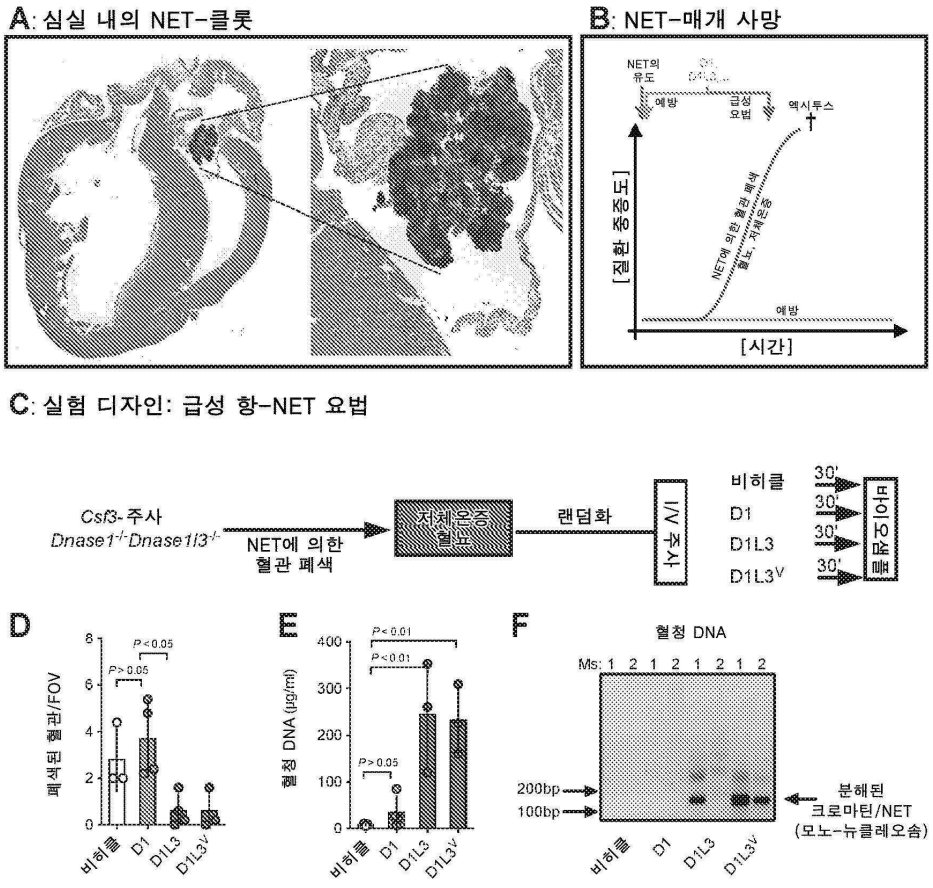
도면34


A
인간 DNase1
시퀀스 롤러
인간 DNase1L3
시퀀스 롤러
인간 DNase1 변이형
시퀀스 롤러
인간 DNase1L3 변이형
시퀀스 롤러
D1L3 C-말단 테일
앵커
앵커 (사용하지 않음)
핵 국소화 신호
B
WT
D1
D1L3
K301A
K303A
Ctrl
지모그램
AGE: DNA 크기
겔머무름

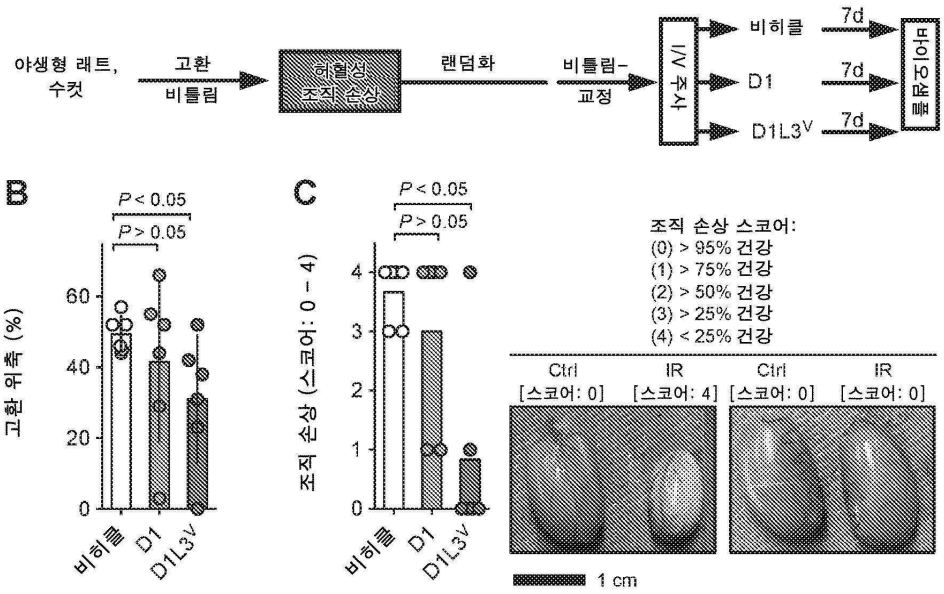
도면35


A
인간 DNaseI
시퀀스 몰러
인간 DNaseI L3
시퀀스 몰러
BB 클러스터 23-25
B
Ctrl
지모그램
AGE: DNA 크기
WB: 크기

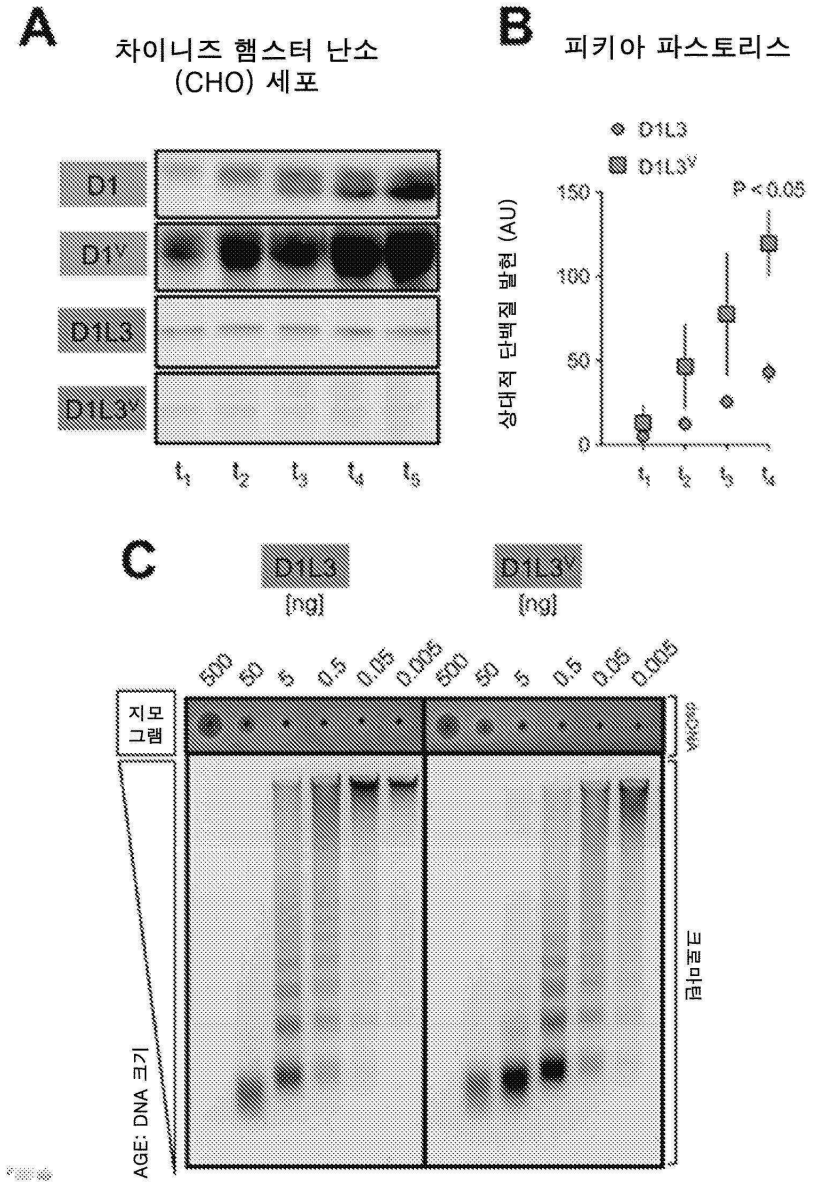
도면36


A: 심실 내의 NET-클롯
B: NET-매개 사망
NET의 유도
예방
급성 요법
엑시투스
[질환 중증도]
NET에 의한 혈관 폐색 혈소, 저체온증
예방
[시간]
C: 실험 디자인: 급성 항-NET 요법
Csf3-주사
Dnase1-/-Dnase1l3-/-
NET에 의한 혈관 폐색
전체온증 혈소
랜덤화
I/V 주사
비히클
D1
D1L3
D1L3V
30'
30'
30'
30'
마이크로
D
폐색된 혈관/FOV
P < 0.05
P > 0.05
비히클
D1
D1L3
D1L3V
E
혈청 DNA (μg/ml)
P < 0.01
P < 0.01
P > 0.05
F
혈청 DNA
Ms: 1 2 1 2 1 2 1 2
200bp
100bp
분해된 크로마틴/NET (모노-뉴클레오솜)

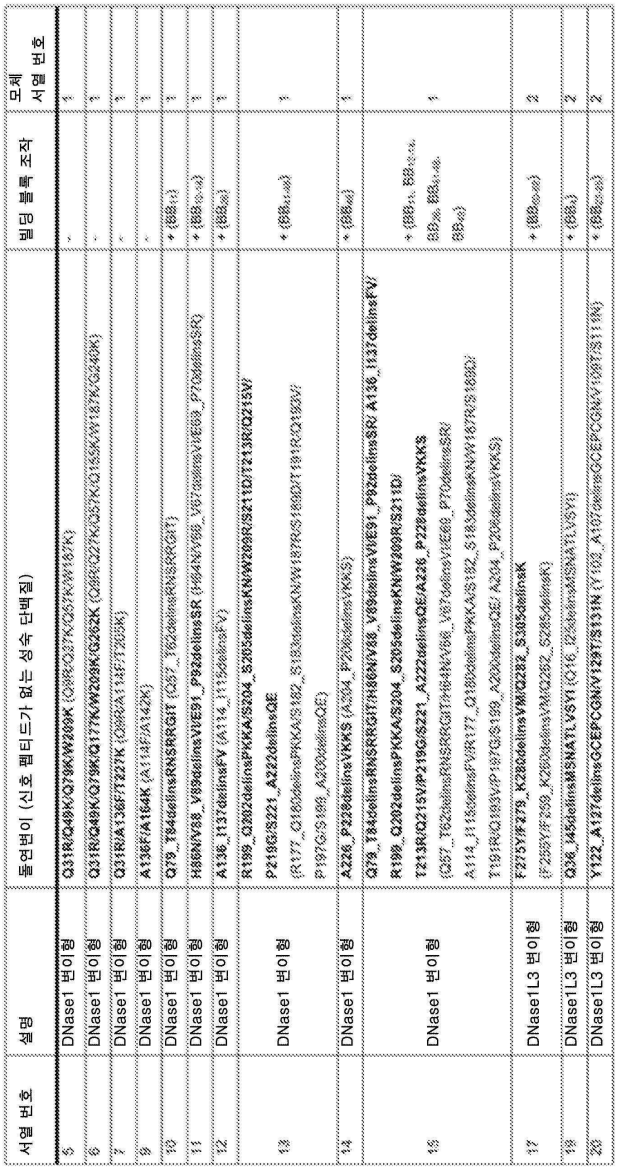
도면37


A: 실험 디자인: 허혈-재관류 손상 요법
야생형 래트, 수컷
고환 비틀림
허혈성 조직 손상
랜덤화
비틀림-교정
I/V 주사
비히클
D1
D1L3V
7d
7d
7d
마이크로
B
고환 위축 (%)
P < 0.05
P > 0.05
비히클
D1
D1L3V
C
조직 손상 (스코어: 0 - 4)
P < 0.05
P > 0.05
조직 손상 스코어:
(0) > 95% 건강
(1) > 75% 건강
(2) > 50% 건강
(3) > 25% 건강
(4) < 25% 건강
Ctrl [스코어: 0]
IR [스코어: 4]
Ctrl [스코어: 0]
IR [스코어: 0]
1 cm

도면38


A
차이니즈 햄스터 난소
(CHO) 세포
D1
D1V
D1L3
D1L3V
t1 t2 t3 t4 t5
B
피키아 파스토리스
D1L3
D1L3V
P < 0.05
상대적 단백질 발현 (AU)
150
100
50
0
t1 t2 t3 t4
C
D1L3
[ng]
D1L3V
[ng]
500 50 5 0.5 0.05 0.005 500 50 5 0.5 0.05 0.005
지모그램
AGE: DNA 크기
리간드

도면39



서열 번호	설명	돌연변이 (신호 펩티드가 없는 성숙 단백질)	빌딩 블록 조작	모체 서열 번호
5	DNase1 변이형	Q31R/Q49K/Q79K/W209K (Q9R/Q37K/Q57K/W187K)	-	1
6	DNase1 변이형	Q31R/Q49K/Q79K/Q177K/W209K/G262K (Q9R/Q37K/Q57K/Q155K/W187K/G240K)	-	1
7	DNase1 변이형	Q31R/A136F/T227K (Q9R/A114F/T205K)	-	1
9	DNase1 변이형	A136F/A164K (A114F/A142K)	-	1
10	DNase1 변이형	Q79_T84delinsRNSRRGIT (Q57_T62delinsRNSRRGIT)	+ (BB_{1-1})	1
11	DNase1 변이형	H88N/V89_Y89delinsVIE91_P92delinsSR (H64N/V65_Y67delinsVIE68_P70delinsSR)	+ (BB_{10-44})	1
12	DNase1 변이형	A136_I137delinsFV (A114_I115delinsFV)	+ (BB_{45})	1
13	DNase1 변이형	R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/T213R/Q215V/ P219G/S221_A222delinsQE (R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S189G/T191R/Q193V/ P197G/S199_A200delinsQE)	+ (BB_{46-84}) + (BB_{85-89})	1
14	DNase1 변이형	A228_P229delinsYKKS (A204_P205delinsYKKS)	+ (BB_{90})	1
15	DNase1 변이형	Q79_T84delinsRNSRRGIT/H88N/V89_V89delinsVIE91_P92delinsSR/ A136_I137delinsFV/ R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/ T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE/A228_P229delinsYKKS (Q57_T62delinsRNSRRGIT/H64N/V65_V67delinsVIE68_P70delinsSR/ A114_I115delinsFV/R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S189G/ T191R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE/ A204_P205delinsYKKS)	+ (BB_{1-84}, BB_{85-89}, BB_{90}, BB_{91-95}, BB_{96}) + (BB_{97})	1
17	DNase1L3 변이형	F275Y/F279_K280delinsVMQ282_S285delinsK (F233Y/F237_K238delinsVMQ282_S285delinsK)	+ (BB_{90-96})	2
18	DNase1L3 변이형	Q36_I45delinsMSNATLVSYI (Q16_I25delinsMSNATLVSYI)	+ (BB_{1})	2
20	DNase1L3 변이형	Y122_A127delinsGCEPCGNVY129TS131N (Y103_A107delinsGCEPCGNVY109TS111N)	+ (BB_{92-93})	2

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NEUTROLIS INC.

<120> ENGINEERED DNASE ENZYMES AND USE IN THERAPY

<130> IPA200285-US

<140> KR 10-2020-7007703

<141> 2020-03-16

<150> PCT/US18/47084

<151> 2018-08-10

<150> US 62/611,166

<151> 2017-12-28

<150> US 62/547,220

<151> 2017-08-18

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr
20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255
Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 2
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly
20 25 30
Glu Ser Lys Gln Glu Asp Lys Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val
35 40 45

Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn
50 55 60
Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg
65 70 75 80
Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn
85 90 95
Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser
100 105 110

Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp
115 120 125

Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr
130 135 140

Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr
145 150 155 160

Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys
165 170 175

His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala
180 185 190

Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg
195 200 205

Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr
210 215 220

Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly
225 230 235 240

Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp
245 250 255

Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser
260 265 270

Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr
275 280 285

Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg
290 295 300

Ser
305

<210> 3

<211> 284

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Arg Tyr Thr Gly Leu Met Gly Thr Leu Leu Thr Leu Val Asn Leu

1 5 10 15

Leu Gln Leu Ala Gly Thr Leu Arg Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Ser Val Tyr Phe Val

35 40 45

Lys Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Val Ile Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Pro Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Lys

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Gln Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ile Leu Asp Ser Tyr Gln Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Ser Arg Glu Pro Ala Ile Val Lys Phe Phe Ser Pro Tyr

130 135 140

Thr Glu Val Gln Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Thr

145 150 155 160

Glu Ala Val Ser Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Trp Gln Lys Trp Gly Leu Glu Asp Ile Met Phe Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Thr Ser Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Arg Thr Ser Pro Ile Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Val Thr Ser Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Ala Leu Leu Gln Ala Ala Val Val Pro Asn Ser Ala Val Pro Phe Asp

245 250 255

Phe Gln Ala Glu Tyr Gly Leu Ser Asn Gln Leu Ala Glu Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Thr Leu Arg Lys Ile
275 280

<210> 4

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 4

Met Arg Tyr Thr Gly Leu Met Gly Ile Leu Leu Thr Leu Val Asn Leu
1 5 10 15

Leu Gln Leu Ala Ala Thr Leu Arg Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr
20 25 30

Phe Gly Asp Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Ser Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Lys Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Val Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60

Thr His Leu Val Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Glu Leu Asn Arg Asp
65 70 75 80

Ile Pro Asp Asn Tyr Arg Tyr Ile Ile Ser Glu Pro Leu Gly Arg Lys
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Gln Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Ser Gln Val Ser
100 105 110

Val Leu Asp Ser Tyr His Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Ser Arg Glu Pro Ala Ile Val Lys Phe Phe Ser Pro Tyr
130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ser Ala Pro Thr
145 150 155 160

Glu Ala Val Ser Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175

Arg Gln Lys Trp Gly Leu Glu Asp Ile Met Phe Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Thr Ser Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205

Arg Thr Ser Pro Ile Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Ala Thr Ser Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Ala Leu Leu Gln Ala Ala Val Val Pro Ser Ser Ala Val Pro Phe Asp
245 250 255
Phe Gln Ala Glu Tyr Arg Leu Thr Asn Gln Met Ala Glu Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Thr Leu Arg Lys Thr
275 280

<210> 5
<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence
<400> 5
Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15
Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr
20 25 30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45
Lys Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Arg Asp
65 70 75 80
Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Arg Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 6

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 6

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr
20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Lys Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Arg Asp
65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175

Lys Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205

Arg Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Lys Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 7

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 7

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr
20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220
Thr Ala Lys Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255
Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270
Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 8
<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence
<400> 8
Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15
Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr
20 25 30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
65 70 75 80
Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125
Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Ala Lys Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255
Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270
Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 9
<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence
<400> 9
Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Lys Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 10

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 10

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Arg Asn

65 70 75 80

Ser Arg Arg Gly Ile Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly

85 90 95

Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln

100 105 110

Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys

115 120 125

Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser

130 135 140

Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala

145 150 155 160

Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu

165 170 175

Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp

180 185 190

Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile

195 200 205

Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala

210 215 220

Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val

225 230 235 240

Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro

245 250 255

Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala

260 265 270

Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 11

<211

> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 11

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 12

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 12

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Val Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 13

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 13

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu
195 200 205
Arg Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr
210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255
Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270
Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 14
<211> 283
<212>
PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence
<400> 14
Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15
Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr
20 25 30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45
Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95
Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110
Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125
Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Val Lys Lys Ser Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala
225 230 235 240
Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe

245 250 255
Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile
260 265 270
Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 15
<211> 285
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence
<400> 15

```
Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1               5                  10                  15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr
            20                  25                  30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
        35                  40                  45
Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
    50                  55                  60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Arg Asn
65                  70                  75                  80

Ser Arg Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly
                85                  90                  95
Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln
            100                 105                 110
Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys
        115                 120                 125
Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Val Val Arg Phe Phe Ser
    130                 135                 140

Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala
145                 150                 155                 160
Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu
                165                 170                 175
Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp
            180                 185                 190
Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile
        195                 200                 205

Arg Leu Arg Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu
    210                 215                 220
Asp Thr Thr Val Lys Lys Ser Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val
225                 230                 235                 240
Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu
```

245 250 255

Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln

260 265 270

Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280 285

<210> 16

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 16

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe

130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr

275 280 285

Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg

290 295 300

Ser

305

<210> 17

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 17

Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His

1 5 10 15

Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly

20 25 30

Glu Ser Lys Gln Glu Asp Lys Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val

35 40 45

Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn

50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg

65 70 75 80

Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser

100 105 110

Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp

115 120 125

Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr

130 135 140

Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr

145 150 155 160

Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys

165 170 175

His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala

180 185 190

Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg

195 200 205

Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr

210 215 220

Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly

225 230 235 240

Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp

245 250 255

Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 18

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 18

Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly
20 25 30
Glu Ser Lys Gln Glu Asn Lys Thr Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val
35 40 45
Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn
50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg
65 70 75 80
Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn
85 90 95
Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser
100 105 110
Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Asn Asp
115 120 125

Thr Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr
130 135 140
Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr
145 150 155 160
Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys
165 170 175
His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala
180 185 190

Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg
195 200 205

Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr
210 215 220
Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly
225 230 235 240
Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp
245 250 255

Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser
260 265 270
Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr
275 280 285
Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg
290 295 300
Ser
305

<210> 19
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 19
Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly
20 25 30
Glu Ser Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Lys Val
35 40 45
Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn
50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg
65 70 75 80
Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser
100 105 110
Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp
115 120 125

Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr
130 135 140
Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr
145 150 155 160
Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys
165 170 175
His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala
180 185 190

Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg
195 200 205
Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr
210 215 220
Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly
225 230 235 240
Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp
245 250 255

Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser
260 265 270
Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr
275 280 285
Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg
290 295 300
Ser
305

<210> 20
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 20

Met Ser Arg Glu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Met Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly
20 25 30
Glu Ser Lys Gln Glu Asp Lys Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val
35 40 45
Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn
50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg
65 70 75 80
Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn
85 90 95
Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser
100 105 110
Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His
130 135 140
Thr Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu
145 150 155 160
Thr Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val
165 170 175
Lys His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu
195 200 205
Arg Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr
210 215 220
Thr Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg

225 230 235 240

Gly Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe

245 250 255

Asp Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val

260 265 270

Ser Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe

275 280 285

Thr Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys

290 295 300

Arg Ser

305

<210> 21

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 21

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Ser Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Ser

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270
Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 22
<211> 846
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence
<400> 22
atgagaggta tgaagctcct tggtgccctc ctggctctcg ctgctctcct ccaaggagca 60
gtttctctaa agattgctgc tttcaatatt caaacctttg gcgagactaa aatgtcctcg 120
gcaacattag tatcttacat tgttcagatc ctttctcgtt acgacatagc tttggtccag 180

gaggttagag actcccactt gactgccgtc ggtaagctgc tagacaatct taaccaagac 240

gcacctgaca cctaccacta cgttgttagt gagcctctcg gtagaaactc ctacaaggag 300

agatacctat ttgtctaccg tccagatcag gtgtctgctg tggactctta ctactatgac 360

gacggttgtg aaccttgtgg ttcagacacc ttcaacagag aaccagctat cgttagattt 420

ttctccagat tcaccgaggt cagagagttc gccatcgttc cattgcacgc tgcgcctgga 480

gatgcagtgg ccgaaattga cgctctctat gatgtctacc tggacgttca ggaaaaatgg 540

ggtctagaag atgttatgct gatgggagac ttcaacgctg gttgctctta cgttaggcca 600

tctcaatggt caagcatcag actatggact tccccaacgt tccaatggct tattcctgac 660

tccgctgata ctaccgccac tcccactcat tgtgcatatg acagaattgt tgtcgctggt 720

atgctactgc gtggagctgt cgtaccagat tctgctctgc catttaactt ccaagccgca 780

tatggtcttt ctgaccaact ggctcaagcc atctctgatc actaccctgt ggaagttatg 840

cttaag 846

<210> 23

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400>

23

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Arg Thr

20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Ser Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val

35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp

50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp

65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn

85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser

100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Ser

115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Phe Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val
165 170 175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn
180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu
195 200 205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr
210 215 220
Thr Ala Lys Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240
Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270
Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 24
<211> 846
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence
<400> 24
atgagaggta tgaagctcct tggtgccctc ctggctctcg ctgctctcct ccaaggagca 60
gtttctctaa agattgctgc tttcaatatt agaacctttg gcgagactaa aatgtcctcg 120
gcaacattag tatcttacat tgttcagatc ctttctcgtt acgacatagc tttggtccag 180

gaggttagag actcccactt gactgccgtc ggtaagctgc tagacaatct taaccaagac 240

gcacctgaca cctaccacta cgttgttagt gagcctctcg gtagaaactc ctacaaggag 300

agatacctat ttgtctaccg tccagatcag gtgtctgctg tggactctta ctactatgac 360

gacggttgtg aaccttgtgg ttcagacacc ttcaacagag aaccattcat cgttagattt 420

ttctccagat tcaccgaggt cagagagttc gccatcgttc cattgcacgc tgcgcctgga 480

gatgcagtgg ccgaaattga cgctctctat gatgtctacc tggacgttca ggaaaaatgg 540

ggtctagaag atgttatgct gatgggagac ttcaacgctg gttgctctta cgttaggcca 600

tctcaatggt caagcatcag actatggact tccccaacgt tccaatggct tattcctgac 660

tccgctgata ctaccgccaa gcccactcat tgtgcatatg acagaattgt tgtcgctggt 720

atgctactgc gtggagctgt cgtaccagat tctgctctgc catttaactt ccaagccgca 780

tatggtcttt ctgaccaact ggctcaagcc atctctgatc actaccctgt ggaagttatg 840

cttaag 846

<210> 25

<211> 915

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400

> 25

atgtctagag agcttgctcc actcctccta ctccttctta gtatccactc tgcactcgcc 60

atgagaattt gtagcttcaa tgtaagatcc ttcggtgaat ctaagcagga ggacaaaaac 120

gctatggacg ttattgtgaa ggtcattaag agatgtgata tcattctagt tatggagatc 180

aaggactcta acaacagaat ttgccccatc cttatggaaa agctgaatag aaactctaga 240

agaggaatta cttacaacta cgttatctct tctaggctgg gtagaaacac ttacaaggag 300

caatatgcat ttctatacaa ggaaaagcta gtttccgtta agcgttctta ccactatcat 360

gactaccaag acggcgatgc tgacgttttc tccagagaac cattcgttgt ttggtttcag 420

tctcctcaca ccgctgttaa ggacttcgtg attatcccac tacacactac gccagaaacc 480

tctgtcaagg aaatagatga acttgttgaa gtttacaccg acgtgaagca cagatggaag 540

gccgagaatt tcattttcat gggtgatttc aacgccggat gctcatatgt ccctaaaaag 600

gcttggaaaa acatccgttt gagaaccgat cctagatttg tctggctcat cggtgaccaa 660

gaggacacca cagtcaaaaa gtctaccaac tgtgcttacg acagaattgt tctgcgtggt 720

caggagattg tttcatctgt tgtcccaaag tccaactccg tctttgattt ccaaaaggct 780

tacaaactga ctgaggagga agctttagac gtgtccgacc acttccctgt agagtttaag 840

ctgcaatcct ccagagcatt cactaactct aaaaagtcag tcactttgcg taaaaagact 900

aagtctaaga gatcg 915

<210> 26

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 26

atgtctagag agcttgctcc actcctccta ctccttctta gtatccactc tgcactcgcc 60

atgagaattt gtagcttcaa tgtaagatcc ttcggtgaat ctaagcagga ggacaaaaac 120

gctatggacg ttattgtgaa ggtcattaag agatgtgata tcattctagt tatggagatc 180

aaggactcta acaacagaat ttgccccatc cttatggaaa agctgaatag aaactctaga 240

agaggaatta cttacaacta cgttatctct tctaggctgg gtagaaacac ttacaaggag 300

caatatgcat ttctatacaa ggaaaagcta gtttccgtta agcgttctta ccactatcat 360

gactaccaag acggcgatgc tgacgttttc tccagagaac cattcgttgt ttggtttcag 420

tctcctcaca ccgctgttaa ggacttcgtg attatcccac tacacactac gccagaaacc 480

tctgtcaagg aaatagatga acttgttgaa gtttacaccg acgtgaagca cagatggaag 540

gccgagaatt tcattttcat gggtgatttc aacgccggat gctcatatgt ccctaaaaag 600

gcttggaaaa acatccgttt gagaaccgat cctagatttg tctggctcat cggtgaccaa 660

gaggacacca cagtcaaaaa gtctaccaac tgtgcttacg acagaattgt tctgcgtggt 720

caggagattg tttcatctgt tgtcccaaag tccaactccg tctttgattt ccaaaaggct 780

tacaaactga ctgaggagga agctttagac gtgtccgacc actaccctgt agaggtcatg 840

ttgaag 846

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400

> 27

gtcgacatgc ggtacacagg 20

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 28

ctcgagtcag atttttctga gtgtca 26

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 29

gaagtcccag gaattcaaag atgt 24

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 30

gcgtgatacc cgggagcgat tg 22

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 31

agtcgactcc cggccaccat gtccctgca 29

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polynucleotide sequence

<400> 32

tgcagggaca tggtggccgg gagtcgact 29

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 33

Ser Ser Arg Ala Phe Thr Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys
1 5 10 15

Lys Thr Lys Ser Lys Arg Ser
20

<210> 34

<211> 310

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 34

Met Ser Leu His Pro Ala Ser Pro Arg Leu Ala Ser Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Ile Leu Ala Leu His Asp Thr Leu Ala Leu Arg Leu Cys Ser Phe Asn
20 25 30

Val Arg Ser Phe Gly Ala Ser Lys Lys Glu Asn His Glu Ala Met Asp
35 40 45

Ile Ile Val Lys Ile Ile Lys Arg Cys Asp Leu Ile Leu Leu Met Glu
50 55 60

Ile Lys Asp Ser Ser Asn Asn Ile Cys Pro Met Leu Met Glu Lys Leu
65 70 75 80

Asn Gly Asn Ser Arg Arg Ser Thr Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser
85 90 95

Arg Leu Gly Arg Asn Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Val Tyr Lys
100 105 110

Glu Lys Leu Val Ser Val Lys Thr Lys Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln
115 120 125

Asp Gly Asp Thr Asp Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe
130 135 140
His Ser Pro Phe Thr Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Val Pro Leu His
145 150 155 160
Thr Thr Pro Glu Thr Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Asp Val
165 170 175
Tyr Thr Asp Val Arg Ser Gln Trp Lys Thr Glu Asn Phe Ile Phe Met
180 185 190

Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Gln
195 200 205
Asn Ile Arg Leu Arg Thr Asp Pro Lys Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp
210 215 220
Gln Glu Asp Thr Thr Val Lys Lys Ser Thr Ser Cys Ala Tyr Asp Arg
225 230 235 240
Ile Val Leu Cys Gly Gln Glu Ile Val Asn Ser Val Val Pro Arg Ser
245 250 255

Ser Gly Val Phe Asp Phe Gln Lys Ala Tyr Asp Leu Ser Glu Glu Glu
260 265 270
Ala Leu Asp Val Ser Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser
275 280 285
Ser Arg Ala Phe Thr Asn Asn Arg Lys Ser Val Ser Leu Lys Lys Arg
290 295 300
Lys Lys Gly Asn Arg Ser
305 310

<210> 35
<211> 310
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400
> 35

Met Ser Leu Tyr Pro Ala Ser Pro Tyr Leu Ala Ser Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Ile Leu Ala Leu His Gly Ala Leu Ser Leu Arg Leu Cys Ser Phe Asn

```
            20                  25                  30
Val Arg Ser Phe Gly Glu Ser Lys Lys Glu Asn His Asn Ala Met Asp
        35                  40                  45
Ile Ile Val Lys Ile Ile Lys Arg Cys Asp Leu Ile Leu Leu Met Glu
    50                  55                  60

Ile Lys Asp Ser Asn Asn Asn Ile Cys Pro Met Leu Met Glu Lys Leu
65                  70                  75                  80
Asn Gly Asn Ser Arg Arg Ser Thr Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser
                85                  90                  95
Arg Leu Gly Arg Asn Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys
            100                 105                 110
Glu Lys Leu Val Ser Val Lys Ala Lys Tyr Leu Tyr His Asp Tyr Gln
        115                 120                 125

Asp Gly Asp Thr Asp Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe
    130                 135                 140
Gln Ala Pro Phe Thr Ala Ala Lys Asp Phe Val Ile Val Pro Leu His
145                 150                 155                 160
Thr Thr Pro Glu Thr Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Ala Asp Val
                165                 170                 175
Tyr Thr Asp Val Arg Arg Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met
            180                 185                 190

Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys
        195                 200                 205
Asn Ile Arg Leu Arg Thr Asp Pro Asn Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp
    210                 215                 220
Gln Glu Asp Thr Thr Val Lys Lys Ser Thr Ser Cys Ala Tyr Asp Arg
225                 230                 235                 240
Ile Val Leu Arg Gly Gln Glu Ile Val Asn Ser Val Val Pro Arg Ser
                245                 250                 255

Ser Gly Val Phe Asp Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Glu
            260                 265                 270
```

Ala Leu Asp Val Ser Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser
275 280 285

Ser Arg Ala Phe Thr Asn Ser Arg Lys Ser Val Ser Leu Lys Lys Lys
290 295 300

Lys Lys Gly Ser Arg Ser
305 310

<210> 36

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 36

Met Arg Ser Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr
20 25 30

Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val
35 40 45

Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp
50 55 60

Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp
65 70 75 80

Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn
85 90 95

Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser
100 105 110

Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
115 120 125

Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe
130 135 140

Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val

165 170 175

Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn

180 185 190

Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu

195 200 205

Arg Thr Ser Pro Ala Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr

210 215 220

Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly

225 230 235 240

Met Leu Leu Gln Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn

245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser

260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

275 280

<210> 37

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 37

Met Ser Arg Glu Leu Thr Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile His

1 5 10 15

Ser Thr Leu Ala Leu Arg Ile Cys Ser Phe Asn Val Arg Ser Phe Gly

20 25 30

Glu Ser Lys Gln Glu Asp Gln Asn Ala Met Asp Val Ile Val Lys Val

35 40 45

Ile Lys Arg Cys Asp Ile Ile Leu Val Met Glu Ile Lys Asp Ser Asn

50 55 60

Asn Arg Ile Cys Pro Ile Leu Met Glu Lys Leu Asn Arg Asn Ser Arg

65 70 75 80

Arg Gly Ile Thr Tyr Asn Tyr Val Ile Ser Ser Arg Leu Gly Arg Asn
85 90 95
Thr Tyr Lys Glu Gln Tyr Ala Phe Leu Tyr Lys Glu Lys Leu Val Ser
100 105 110
Val Lys Arg Ser Tyr His Tyr His Asp Tyr Gln Asp Gly Asp Ala Asp
115 120 125
Val Phe Ser Arg Glu Pro Phe Val Val Trp Phe Gln Ser Pro His Thr
130 135 140

Ala Val Lys Asp Phe Val Ile Ile Pro Leu His Thr Thr Pro Glu Thr
145 150 155 160
Ser Val Lys Glu Ile Asp Glu Leu Val Glu Val Tyr Thr Asp Val Lys
165 170 175
His Arg Trp Lys Ala Glu Asn Phe Ile Phe Met Gly Asp Phe Asn Ala
180 185 190
Gly Cys Ser Tyr Val Pro Lys Lys Ala Trp Lys Asn Ile Arg Leu Arg
195 200 205

Thr Asp Pro Arg Phe Val Trp Leu Ile Gly Asp Gln Glu Asp Thr Thr
210 215 220
Val Lys Lys Ser Thr Asn Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Leu Arg Gly
225 230 235 240
Gln Glu Ile Val Ser Ser Val Val Pro Lys Ser Asn Ser Val Phe Asp
245 250 255
Phe Gln Lys Ala Tyr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Ala Leu Asp Val Ser
260 265 270

Asp His Phe Pro Val Glu Phe Lys Leu Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr
275 280 285
Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg
290 295 300
Ser
305

<210> 38

<211> 302

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met His Tyr Pro Thr Ala Leu Leu Phe Leu Ile Leu Ala Asn Gly Ala
1 5 10 15

Gln Ala Phe Arg Ile Cys Ala Phe Asn Ala Gln Arg Leu Thr Leu Ala
20 25 30

Lys Val Ala Arg Glu Gln Val Met Asp Thr Leu Val Arg Ile Leu Ala
35 40 45

Arg Cys Asp Ile Met Val Leu Gln Glu Val Val Asp Ser Ser Gly Ser
50 55 60

Ala Ile Pro Leu Leu Leu Arg Glu Leu Asn Arg Phe Asp Gly Ser Gly
65 70 75 80

Pro Tyr Ser Thr Leu Ser Ser Pro Gln Leu Gly Arg Ser Thr Tyr Met
85 90 95

Glu Thr Tyr Val Tyr Phe Tyr Arg Ser His Lys Thr Gln Val Leu Ser
100 105 110

Ser Tyr Val Tyr Asn Asp Glu Asp Asp Val Phe Ala Arg Glu Pro Phe
115 120 125

Val Ala Gln Phe Ser Leu Pro Ser Asn Val Leu Pro Ser Leu Val Leu
130 135 140

Val Pro Leu His Thr Thr Pro Lys Ala Val Glu Lys Glu Leu Asn Ala
145 150 155 160

Leu Tyr Asp Val Phe Leu Glu Val Ser Gln His Trp Gln Ser Lys Asp
165 170 175

Val Ile Leu Leu Gly Asp Phe Asn Ala Asp Cys Ala Ser Leu Thr Lys
180 185 190

Lys Arg Leu Asp Lys Leu Glu Leu Arg Thr Glu Pro Gly Phe His Trp
195 200 205

Val Ile Ala Asp Gly Glu Asp Thr Thr Val Arg Ala Ser Thr His Cys

210 215 220

Thr Tyr Asp Arg Val Val Leu His Gly Glu Arg Cys Arg Ser Leu Leu
225 230 235 240

His Thr Ala Ala Ala Phe Asp Phe Pro Thr Ser Phe Gln Leu Thr Glu
245 250 255

Glu Glu Ala Leu Asn Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Glu Leu
260 265 270

Lys Leu Ser Gln Ala His Ser Val Gln Pro Leu Ser Leu Thr Val Leu

275 280 285

Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Pro Gln Leu Cys Pro Ala Ala

290 295 300

<210> 39

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Gly Gly Pro Arg Ala Leu Leu Ala Ala Leu Trp Ala Leu Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Thr Ala Ala Leu Arg Ile Gly Ala Phe Asn Ile Gln Ser Phe
20 25 30

Gly Asp Ser Lys Val Ser Asp Pro Ala Cys Gly Ser Ile Ile Ala Lys

35 40 45

Ile Leu Ala Gly Tyr Asp Leu Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Pro

50 55 60

Asp Leu Ser Ala Val Ser Ala Leu Met Glu Gln Ile Asn Ser Val Ser
65 70 75 80

Glu His Glu Tyr Ser Phe Val Ser Ser Gln Pro Leu Gly Arg Asp Gln
85 90 95

Tyr Lys Glu Met Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Lys Asp Ala Val Ser Val
100 105 110

Val Asp Thr Tyr Leu Tyr Pro Asp Pro Glu Asp Val Phe Ser Arg Glu
115 120 125

Pro Phe Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Gly Thr Gly Glu Arg Ala Pro
130 135 140

Pro Leu Pro Ser Arg Arg Ala Leu Thr Pro Pro Pro Leu Pro Ala Ala
145 150 155 160

Ala Gln Asn Leu Val Leu Ile Pro Leu His Ala Ala Pro His Gln Ala
165 170 175

Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Ile Asp
180 185 190

Lys Trp Gly Thr Asp Asp Met Leu Phe Leu Gly Asp Phe Asn Ala Asp
195 200 205

Cys Ser Tyr Val Arg Ala Gln Asp Trp Ala Ala Ile Arg Leu Arg Ser
210 215 220

Ser Glu Val Phe Lys Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Val
225 230 235 240

Gly Asn Ser Asp Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Ala Cys Gly Ala Arg
245 250 255

Leu Arg Arg Ser Leu Lys Pro Gln Ser Ala Thr Val His Asp Phe Gln
260 265 270

Glu Glu Phe Gly Leu Asp Gln Thr Gln Ala Leu Ala Ile Ser Asp His
275 280 285

Phe Pro Val Glu Val Thr Leu Lys Phe His Arg
290 295

<210> 40

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial synthetic polypeptide sequence

<400> 40

Gln Ser Ser Arg Ala Phe Thr Asn Ser Lys Lys Ser Val Thr Leu Arg
1 5 10 15

Lys Lys Thr Lys Ser Lys Arg Ser

20