



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117177990 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 05

(21) 申请号 202280029044.X

(22) 申请日 2022.02.17

(30) 优先权数据

63/150,433 2021.02.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/016771 2022.02.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/178110 EN 2022.08.25

(71) 申请人 纽特雷斯股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州剑桥百老汇1号

(72) 发明人 托碧昂斯·A·富驰

安盖莱娜·皮拉桑纳

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

11330

专利代理师 杨剑

(51) Int.Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

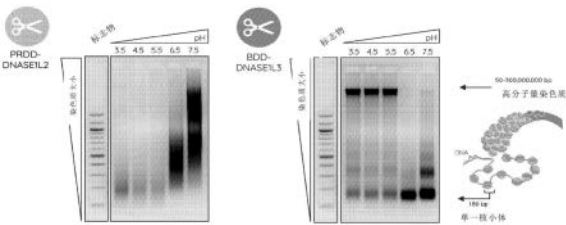
权利要求书5页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

用于制备的工程DNA酶1样2和在治疗中的用途

(57) 摘要

本公开提供了一种缺乏富含脯氨酸的结构域 (PRD) 和/或缺乏C-端Arg残基的D1L2酶,其在微生物表达系统例如巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris) 中高效生产,并具有在酸性pH下降解染色质的高活性。本公开提供了所述D1L2酶的生产方法及其在治疗中的用途。



1. 一种用于治疗需要细胞外DNA降解、细胞外染色质降解、细胞外诱捕网 (ET) 降解和/或中性粒细胞细胞外诱捕网 (NET) 降解的受试者的方法, 所述方法包括施用治疗有效量的实质上缺乏由SEQ ID NO:3定义的富含脯氨酸的结构域 (PRD) 和/或缺乏C-端精氨酸残基的DNASE1L2 (D1L2) 酶。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述D1L2酶实质上缺乏所述PRD。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述D1L2酶缺乏所述C-端精氨酸残基。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述D1L2酶实质上缺乏所述PRD并且缺乏所述C-端精氨酸残基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中所述D1L2酶被PEG化。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述D1L2酶在一个或多个半胱氨酸处被PEG化。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述D1L2酶在伯胺处被PEG化。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述D1L2在N-或C-端处与载体蛋白融合。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述载体蛋白是白蛋白氨基酸序列。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述白蛋白氨基酸序列任选地通过肽接头融合到所述D1L2的N-端。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有在酸性环境中积累的细胞外DNA、细胞外染色质、细胞外诱捕网 (ET) 和/或中性粒细胞细胞外诱捕网 (NET)。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述D1L2酶被施用到具有低于6.5的pH、或具有约5.5以下的pH、或具有约5.0以下的pH的组织环境中。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述受试者具有肺部指征。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述受试者患有囊性纤维化、肺炎、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、急性肺损伤 (ALI)、输血相关性肺损伤 (TRALI)、哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肺纤维化或肺部感染, 并且所述D1L2被施用到肺部。

15. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述受试者患有皮肤病, 并且所述D1L2被施用到所述受试者的皮肤。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述D1L2被施用到角化不良病变。

17. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述受试者患有银屑病、皮炎、大疱性表皮松解症或过敏反应。

18. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述受试者患有寻常痤疮。

19. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述受试者具有过度生长的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

20. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述D1L2被施用到缓慢愈合的伤口。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述伤口是慢性伤口, 其任选为糖尿病溃疡、截肢伤口或皮肤或组织移植植物。

22. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述伤口是烧伤。

23. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述D1L2酶被施用到所述受试者的眼部, 以治疗或预防眼部炎症或感染。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述受试者患有干眼病。

25. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述受试者患有过敏性、细菌性或病毒性结膜炎。

26. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述D1L2酶被施用到所述受试者的耳部, 以治疗或预防耳部炎症或感染。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述受试者患有中耳炎。

28. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述D1L2酶被施用到所述受试者的鼻部或鼻窦腔, 以治疗或预防鼻部或鼻窦炎症或感染。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中所述D1L2酶包含与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约80%序列同一性、或至少约85%、至少约90%、或至少约95%、或至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述D1L2酶包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法, 其中所述D1L2酶在非哺乳动物表达系统中生产, 所述表达系统任选为酵母表达系统例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

32. 一种生产重组D1L2酶的方法, 所述方法包括: 培养编码实质上缺乏由SEQ ID NO:8定义的富含脯氨酸的结构域 (PRD) 和/或缺乏C-端精氨酸并包含信号肽的D1L2酶的非哺乳动物表达宿主细胞; 以及从培养基回收所述D1L2酶。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述表达宿主细胞是真核细胞, 任选地选自酵母细胞、昆虫细胞和植物细胞。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述表达宿主细胞是酵母细胞, 任选地选自巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)。

35. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述表达宿主细胞是细菌宿主细胞, 其任选为大肠杆菌 (*E. coli*)。

36. 根据权利要求32至35中任一项所述的方法, 其中所述D1L2酶缺乏所述PRD (SEQ ID NO:8) 的至少约10个氨基酸。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述D1L2酶缺乏所述PRD (SEQ ID NO:8) 的至少约15个氨基酸。

38. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述D1L2酶缺乏所述PRD (SEQ ID NO:8) 的至少约18个氨基酸。

39. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述D1L2酶缺乏整个PRD (SEQ ID NO:8)。

40. 根据权利要求32至39中任一项所述的方法, 其中所述D1L2酶包含与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约80%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述D1L2酶包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

42. 根据权利要求32至41中任一项所述的方法, 其中所述信号肽来自于野生型人DNA酶。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述人野生型DNA酶是D1、D1L1、D1L2或D1L3。

44. 根据权利要求32至41中任一项所述的方法, 其中所述信号肽是人DNA酶的非天然信号肽, 并且其任选为 α 交配因子或人白蛋白分泌信号肽。

45. 根据权利要求32至44中任一项所述的方法, 其中所述D1L2在N-或C-端处与载体蛋白融合。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述载体蛋白是白蛋白氨基酸序列。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述白蛋白氨基酸序列任选地通过肽接头融合到所述D1L2的N-端。

48. 根据权利要求32至47中任一项所述的方法, 其中在至少1000L的分批发酵培养物中, 所述表达产生至少约100mg/L的所述D1L2酶。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中在至少1000L的分批发酵培养物中, 所述表达产生至少约250mg/L的所述D1L2酶。

50. 根据权利要求32至49中任一项所述的方法, 其中所述重组D1L2酶未被糖基化。

51. 根据权利要求48至50中任一项所述的方法, 其还包括对所述D1L2酶进行PEG化。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述D1L2酶在一个或多个半胱氨酸处被PEG化。

53. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述D1L2酶在伯胺处被PEG化。

54. 一种重组D1L2酶, 其根据权利要求32至53中任一项所述的方法来生产。

55. 一种多核苷酸, 其编码权利要求54所述的D1L2酶, 其中所述多核苷酸被密码子优化以用于在非哺乳动物表达系统中表达, 所述表达系统任选为巴斯德毕赤酵母(*Pichiapastoris*)。

56. 根据权利要求55所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸包含质粒载体。

57. 一种非哺乳动物宿主细胞, 其包含权利要求56所述的载体并表达所述D1L2酶。

58. 一种用于外用或局部施用的药物组合物, 其包含:

有效量的权利要求54所述的重组D1L2酶, 或实质上缺乏SEQ ID NO:3的PRD和/或缺乏C-端精氨酸残基的D1L2酶, 和
药学上可接受的载体。

59. 根据权利要求58所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶包含与由SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约80%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

60. 根据权利要求59所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶缺乏SEQ ID NO:3的所述PRD并缺乏C-端精氨酸残基。

61. 根据权利要求60所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

62. 根据权利要求58至61中任一项所述的药物组合物, 其中所述重组D1L2酶未被糖基化。

63. 根据权利要求62所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶被PEG化。

64. 根据权利要求63所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶在一个或多个半胱氨酸处被PEG化。

65. 根据权利要求63所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶在伯胺处被PEG化。

66. 根据权利要求58至65中任一项所述的药物组合物, 其中所述D1L2酶在N-或C-端处与载体蛋白融合。

67. 根据权利要求66所述的药物组合物, 其中所述载体蛋白是白蛋白氨基酸序列。

68. 根据权利要求67所述的药物组合物, 其中所述白蛋白氨基酸序列任选地通过肽接头融合到所述D1L2的N-端。

69. 根据权利要求58至68中任一项所述的药物组合物, 其被配制用于局部施用。

70. 根据权利要求69所述的药物组合物, 其中所述组合物是霜剂、洗剂、凝胶、泡沫、喷雾剂、软膏、漱口水、皂或洗发水。

71. 根据权利要求69所述的药物组合物, 其中所述组合物被配制用于向眼部、耳部、鼻腔或鼻窦腔和口腔中的一者或多者施用。

72. 根据权利要求58至68中的任一项所述的药物组合物, 其中所述组合物被配制用于肺部递送。

73. 根据权利要求72所述的药物组合物, 其中所述组合物是粉末气雾剂或溶液气雾剂, 或者被配制用于通过雾化器递送。

74. 一种治疗或预防皮肤感染和/或炎症的方法, 其包括向受试者皮肤的受影响区域施用权利要求58至70所述的药物组合物。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述受影响区域包含角化不良病变。

76. 根据权利要求44或75所述的方法, 其中所述受试者患有银屑病、皮炎、大疱性表皮松解症或过敏反应。

77. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述受试者患有寻常痤疮。

78. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述受试者具有过度生长的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

79. 一种促进伤口愈合的方法, 其包括向受试者的伤口施用权利要求44所述的药物组合物。

80. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述伤口是慢性伤口, 其任选为糖尿病溃疡、截肢伤口或皮肤或组织移植术。

81. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述伤口是烧伤。

82. 一种用于治疗或预防受试者眼部炎症或感染的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求71所述的组合物, 所述组合物被配制成滴眼液或洗眼液。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述受试者患有干眼病。

84. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述受试者患有过敏性、细菌性或病毒性结膜炎。

85. 一种用于治疗或预防受试者耳部炎症或感染的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求71所述的组合物, 所述组合物被配制成滴耳液。

86. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述受试者患有中耳炎。

87. 一种用于治疗或预防受试者鼻腔或鼻窦炎症或感染的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求71所述的组合物, 所述组合物被配制成鼻喷剂。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述受试者患有鼻窦感染。

89. 一种用于治疗或预防患者肺部炎症或感染的方法, 其包括向有需要的受试者施用权利要求72或73所述的组合物。

90. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述受试者患有囊性纤维化、肺炎、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、急性肺损伤 (ALI)、输血相关性肺损伤 (TRALI)、哮喘、慢性阻塞性肺疾病

(COPD)、肺纤维化或肺部感染。

91. 根据权利要求99所述的方法,其中所述受试者患有慢性或复发性肺部感染。

用于制备的工程DNA酶1样2和在治疗中的用途

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2021年2月17日提交的美国临时申请号63/150,433的权益和优先权,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 炎症是宿主控制入侵微生物和愈合受损组织的必不可少的反应。在大量炎症性疾病中不受控制和持续的炎症导致组织损伤。中性粒细胞是急性炎症中的主要白细胞。在感染过程中,中性粒细胞产生中性粒细胞细胞外诱捕网(NET),即由用于固定和中和细菌的有毒性组蛋白和酶修饰的DNA纤维的网格。然而,由于其细胞毒性、促炎性、促血栓形成活性和促肿瘤发生活性,过量的NET形成可能损害宿主细胞。

[0004] DNA酶1样2(DNASE1-LIKE 2,在本文中也称为DNASE1L2或D1L2)属于DNASE1蛋白家族,是一组可以降解细胞外DNA的分泌型核酸内切酶的同源酶。D1L2是哺乳动物中唯一的二价阳离子依赖性酸性DNA酶。因此,D1L2具有有可能在生理学上和治疗上相关的独特特点。尽管D1L2可能具有例如通过降解细胞外DNA来治疗或控制各种组织的炎性病症或感染所需的酶性质,但D1L2尚未被描述为适合于使用常规重组系统制备。

[0005] 因此,本发明提供了在制备和治疗方面具有改进的重组D1L2酶,以及生产所述重组D1L2酶和使用所述重组D1L2酶进行治疗的方法。本公开证实了所述重组D1L2酶具有高染色质降解活性,特别是在酸性pH下。

发明内容

[0006] 本公开部分是基于下述发现,即缺乏富含脯氨酸的结构域(PRD)和/或缺乏C-端Arg残基的D1L2酶在微生物表达系统中被高效生产,并具有在酸性pH下降解染色质的高活性。

[0007] 一方面,本公开提供了一种缺乏PRD结构域和/或缺乏天然存在于D1L2亚型1和亚型2中的C-端精氨酸的重组D1L2酶。根据这一方面的D1L2酶具有高重组表达特性,包括在非哺乳动物表达系统例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中。因此,在本公开的各个方面,提供了一种生产缺乏PRD和/或C-端精氨酸的重组D1L2酶的方法。所述方法包括培养编码所述D1L2酶的非哺乳动物宿主细胞并从培养基中回收所述酶。根据本公开的示例性D1L2酶由SEQ ID NO:7表示。

[0008] 在各个实施方式中,在表达系统表达的所述D1L2基因编码实质上是野生型人DNA酶天然的信号肽。在一些实施方式中,所述信号肽来自于人D1(SEQ ID NO:13)、D1L2(SEQ ID NO:8)、D1L1(SEQ ID NO:14)或D1L3(SEQ ID NO:15)。在一些实施方式中,所述信号肽是适合于从非哺乳动物表达系统的宿主细胞分泌的非天然(对所述D1L2酶来说)信号肽。示例性的非天然信号肽是 α -交配因子(SEQ ID NO:9),其可以用于例如酵母表达系统如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0009] 在一些实施方式中,任选地利用氨基酸接头将所述D1L2酶融合到载体蛋白。所述

载体蛋白可以是白蛋白氨基酸序列。这种与载体蛋白的融合可以在体内持久性以及重组表达方面提供益处。

[0010] 在根据本公开的各个实施方式中,所述重组D1L2酶未被糖基化。在各个实施方式中,按照本公开生产的所述D1L2酶实质上无免疫原性。

[0011] 在一些实施方式中,所述D1L2酶被工程化改造,以具有适合于治疗的物理学、药效学和/或酶学性质,包括使用外用或局部施用的组合物的治疗。在各个实施方式中,与D1L2亚型1(由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4定义)相比,所述工程化改造的D1L2酶可能具有相同或更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性,相同或更高的染色体DNA(染色质)降解活性,相近或改进的蛋白酶抗性,以及在非哺乳动物表达系统(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中更高的生产水平。

[0012] 在各个实施方式中,所述D1L2酶含有一个或多个聚乙二醇(PEG)部分或其他偶联物(例如脂肪酸或酰基)。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸选自赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。在一些实施方式中,通过取代D1L2中(例如SEQ ID NO:7中)的一个或多个氨基酸来引入一个或多个适合于PEG化的氨基酸。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸是半胱氨酸(Cys或C),并且PEG化通过硫醇偶联来进行。在一些实施方式中,可以使用NHS-PEG试剂对D1L2中的伯胺进行PEG化。

[0013] 根据本公开,所述D1L2酶由多核苷酸编码,所述多核苷酸可以被密码子优化以用于在非哺乳动物表达系统中表达。在一些实施方式中,所述多核苷酸包含质粒载体。在各个实施方式中,所述质粒载体包含编码本文描述的D1L2酶或变体的核酸,其可操作连接到所述宿主细胞中有功能的表达控制区。所述表达控制区能够驱动所述可操作连接的编码核酸的表达,以便在用所述表达载体转化的细胞中生产所述酶。在其他方面,本公开提供了一种非哺乳动物表达细胞(“宿主细胞”),其包含编码本文描述的D1L2酶的表达载体。在一些实施方式中,所述细胞是酵母细胞,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0014] 在其他方面,本公开提供了用于外用或局部施用的药物组合物。所述组合物包含本文描述的或按照本公开生产的重组D1L2酶,以及药学上可接受的载体。

[0015] 在一些实施方式中,所述药物组合物被配制用于局部施用,例如霜剂、洗剂、凝胶、溶液、泡沫、喷剂、软膏、漱口水、洗发水或皂。在一些实施方式中,所述药物组合物用于具有酸性环境的组织和/或生物膜的局部或外用治疗。例如,所述酸性环境可能具有约6.0以下、约5.5以下、或约5.0以下、或约4.5以下、或约4.0以下的pH。在一些实施方式中,所述组合物是用于维持皮肤健康和皮肤美观的皮肤护理组合物。在这些实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防皮肤感染和/或炎症的方法。在使用外用组合物的一些实施方式中,所述受试者可能具有影响皮肤、毛发或指甲的外观或健康的病症。在一些实施方式中,所述受试者患有诸如银屑病、皮炎、大疱性表皮松解症或过敏反应(例如包括荨麻疹或皮疹)的病症。在一些实施方式中,所述受试者具有干燥的皮肤,例如干皮病。在一些实施方式中,所述受试者患有寻常痤疮。在其他实施方式中,所述受试者的皮肤的特征可以是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的过度生长,这可能与特应性皮炎相关。在一些实施方式中,所述受试者患有银屑病,并且所述组合物被施用到银屑病病变。

[0016] 在其他实施方式中,所述组合物被配制用于施用到眼部、耳部、鼻腔或鼻窦腔和口腔中的一者或多者。根据这些实施方式的组合物可用于治疗或预防受试者眼部的炎症或感

染的方法中,例如其中所述组合物被配制成滴眼液或洗眼液(包括眼睑清洁剂)。在一些实施方式中,所述受试者可能患有干眼病,或可能患有过敏性、细菌性或病毒性结膜炎。细菌性结膜炎可因生物膜形成而恶化。在一些实施方式中,所述受试者具有发炎的眼部导管,其可能表现为睑缘炎或相关病症(例如睑板腺囊肿)。在其他实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防受试者耳部的炎症或感染,例如其中所述组合物配制成滴耳液。在其他实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防受试者的鼻腔或鼻窦炎症或感染的方法中,例如其中所述组合物被配制成鼻喷剂。在一些实施方式中,所述受试者具有鼻窦感染或复发性鼻窦感染。在其他实施方式中,所述受试者具有口腔感染或炎症,包括牙龈炎和牙脓肿。

[0017] 在一些实施方式中,所述组合物可用于治疗核酸相关眼部疾病的方法。此类疾病包括干眼病、层间角膜炎、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎、感染性结晶性角膜病、眼瘢痕性类天疱疮(OCPC)、干燥性角结膜炎(KCS)、干燥综合征(SS)、干燥综合征相关性干燥性角结膜炎、非干燥综合征相关性干燥性角结膜炎、干燥性角膜炎、干燥综合征、干眼症、泪膜障碍、泪液生成减少、水液缺乏性干眼症(ATD)和睑板腺功能障碍(MGD)。

[0018] 在其他实施方式中,所述组合物被配制用于肺部递送,例如粉末或溶液气雾剂。在一些实施方式中,所述组合物被配制用于通过雾化器递送。在各个实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防患者肺部炎症或感染的方法。在一些实施方式中,所述受试者患有囊性纤维化、肺炎、支气管炎、哮喘、下呼吸道感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、输血相关性肺损伤(TRALI)或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在一些实施方式中,所述受试者患有肺纤维化(例如特发性肺纤维化或IPF)。在其他实施方式中,所述受试者患有慢性或复发性肺部感染。

[0019] 在囊性纤维化的情况下,很难根除或控制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染,这部分由生物膜的形成导致。通过施用根据本公开的所述D1L2酶,例如通过雾化器,可能可以控制囊性纤维化患者中的假单胞菌感染,并减轻抗生素的过度使用。在各个实施方式中,本文提供的所述D1L2酶与PULMOZYME(链道酶 α)相比在CF肺分泌物中具有更高活性。

[0020] 在其他实施方式中,所述患者可能具有留置的医疗装置,其倾向于有利于微生物定殖和生物膜形成。在一些实施方式中,将所述D1L2酶或包含所述D1L2酶的组合物施用到机械通气的患者,以避免或减少生物膜形成。

[0021] 本公开的其他方面和实施方式将从以下的详细描述中显而易见。

附图说明

[0022] 图1示出了人DNASE1L2亚型1(DNASE1L2-L,SEQ ID NO:1,Uniprot标识符:Q92874-1)和人DNASE1L2亚型2(DNASE1L2-S;SEQ ID NO:2,Uniprot标识符:Q92874-2)的氨基酸序列比对。分泌信号肽(SEQ ID NO:8)和富含脯氨酸的结构域(PRD,SEQ ID NO:3)被突出显示。序列标尺指示氨基酸的位置。图中包括亚型1(SEQ ID NO:4)和亚型2(SEQ ID NO:6)的成熟形式。

[0023] 图2示出了富含脯氨酸的结构域的缺失提高了DNASE1L2在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达。示出了三种性能最好的菌株的上清液中的估计蛋白质浓度,其通过以已知浓度稀释模拟菌株基质的牛血清白蛋白的峰面积计算。表达构建物包括(a)

具有天然信号肽 (SP, SEQ ID NO:8) 的亚型1 (SEQ ID NO:4), (b) 具有 α 交配因子 (aMF, SEQ ID NO:9) 的亚型1 (SEQ ID NO:4) 和 (c) 具有 α 交配因子 (aMF, SEQ ID NO:9) 亚型2 (SEQ ID NO:6)。

[0024] 图3示出了纯化的富含脯氨酸的结构域缺失DNASE1L2 (PRDD-DNASE1L2) 在酸性pH下降解染色质。将作为高分子量染色质来源的细胞核与纯化的PRDD-DNASE1L2在3.5至7.5的pH水平下温育。在酸性pH 3.5至5.5下观察到高分子量向低分子量的降解。作为对照的碱性结构域缺失 (BDD) -DNASE1L3在中性pH 6.5和7.5下表现出降解。

[0025] 图4示出了从Uniprot数据库中提取的不同物种的DNASE1L2氨基酸序列的比对。所述比对表明,只有来自于人类、黑猩猩和狒狒的DNASE1L2的特点在于C-端精氨酸残基。

[0026] 图5示出了C-端精氨酸残基的缺失提高了DNASE1L2亚型2在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的表达。示出了三种性能最好的菌株的上清液中的估计蛋白质浓度,其通过以已知浓度稀释模拟菌株基质的牛血清白蛋白的峰面积计算。表达构建物包括 (a) 亚型1 (SEQ ID NO:4), (b) 亚型2 (SEQ ID NO:6), 和 (c) 缺乏C-端精氨酸残基 (SEQ ID NO:6 中的del278R) 的亚型2,产生新的变体 (SEQ ID NO:7)。所有构建物均采用 α 交配因子 (aMF, SEQ ID NO:9) 作为分泌信号肽。

[0027] 图6示出了在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达的D1L2 (PRDD), 其在N-端处与白蛋白的融合。

具体实施方式

[0028] 本公开部分是基于下述发现,即缺乏富含脯氨酸的结构域 (PRD) 和/或缺乏C-端Arg残基的D1L2酶在微生物菌株中被高效生产,并在酸性pH下具有降解染色质的高活性。

[0029] DNASE1L2 (或D1L2) 以两种亚型表达和分泌,即SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,二者的区别在于分别存在或不存在PRD。亚型1在人类表皮、毛囊和指甲基质的终末分化的角质细胞中表达。在人类体外皮肤模型中敲除D1L2抑制了细胞核DNA的降解,并导致细胞核滞留在角质层中,这种病症被称为角化不全。Fischer H.等, DNASE1L2在角质层细胞形成过程中降解核DNA (DNASE1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation), *J Invest Dermatol.* 2007 Jan; 127 (1): 24-30。皮肤病例如银屑病的角化不全病变等可能与D1L2表达减少有关。此外, D1L2可以抑制病原体如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等的生物膜形成。Eckhart L等, DNASE1L2抑制铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的生物膜形成 (DNASE1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*), *Br J. Dermatol.* 2007 156 (6): 1342-5。亚型2在炎症条件下在白细胞中表达,但其功能尚未被充分表征。Shiokawa等, 人DNASE1L2基因的特征及其由炎性细胞因子诱导转录激活的分子机制 (Characterization of the human DNASE1L2 gene and the molecular mechanism for its transcriptional activation induced by inflammatory cytokines), *Genomics.* 2004 84:95-105。

[0030] 尽管D1L2可能具有例如通过降解细胞外DNA来治疗或控制各种组织的炎症病症或感染的所需酶性质,但D1L2尚未被描述为适合于使用常规重组系统来制备。因此,在各个方面和实施方式中,本公开提供了重组D1L2酶和生产重组D1L2酶的方法,包括在治疗中的用

途。在各种实施方式中,本发明提供了所述D1L2酶在非哺乳动物表达系统例如酵母表达系统(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中的高表达,所述D1L2酶具有用于治疗性应用的强活性。具体而言,所述D1L2酶在酸性pH(例如<约6.0)下具有强活性。

[0031] 一方面,本公开提供了一种生产重组D1L2酶的方法。所述方法包括培养编码实质上缺乏由SEQ ID NO:3定义的富含脯氨酸的结构域(PRD)的D1L2酶的非哺乳动物宿主细胞。在各个实施方式中,由所述宿主细胞生产的D1L2将包含指导从细胞分泌的信号肽,其通常在分泌期间被移除。所述方法还包括从培养基回收所述D1L2酶。

[0032] 如图1中所示,人D1L2亚型1含有21个氨基酸的PRD。该PRD的移除(如在亚型2中)实质性提高了在非哺乳动物表达系统中的表达。示例性表达系统包括真核表达系统,例如酵母表达系统以及昆虫细胞或植物细胞表达系统。示例性的非哺乳动物表达系统是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适合的非哺乳动物表达系统包括但不限于:基于昆虫细胞的表达系统,例如Sf9细胞和基于杆状病毒的载体;细菌表达系统,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);酵母和丝状真菌表达系统,例如曲霉属物种(*Aspergillus* spp.)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*);基于植物的表达系统,例如本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)和普通烟草(*Nicotiana tabacum*)。参见例如美国专利号10,385,319、10,899,801、10,287,555、9,931,390、9,879,280、9,458,487、8,535,930、8,067,198、7,229,792、6,558,920、5,637,477,其全部内容通过引用并入本文。

[0033] 在各个实施方式中,所述D1L2酶缺乏PRD(SEQ ID NO:3)的至少约10个氨基酸。在一些实施方式中,所述D1L2酶缺乏PRD(SEQ ID NO:3)的至少约15个氨基酸或至少约18个氨基酸,或缺乏整个PRD。在一些实施方式中,所述PRD被替换为与PRD具有低同源性或不超过最低同源性的替代序列,例如在比对时在对应位置处少于约8个或少于约5个相同氨基酸。在一些实施方式中,所述替代序列具有不超过约3个、或不超过约2个、或不超过1个脯氨酸残基。在一些实施方式中,具有缺失或修饰的PRD的D1L2酶包含与由SEQ ID NO:4(亚型1)或SEQ ID NO:6(亚型2)定义的酶具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述D1L2酶包含与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性,或与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约95%序列同一性,或与由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方式中,所述D1L2酶包含与由SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性的氨基酸序列,或与由SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约95%序列同一性,或与由SEQ ID NO:6定义的酶具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

[0035] 可选地或此外,本公开提供了一种缺乏在D1L2亚型1和亚型2中天然存在的C-端精氨酸的重组D1L2酶。根据这一方面的所述D1L2酶具有高重组表达特性,包括在非哺乳动物表达系统例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的高重组表达特性。因此,在本发明的各个方面,提供了一种用于生产缺乏C-端精氨酸的重组D1L2酶的方法。所述方法包括培养编码缺乏C-端Arg残基的D1L2酶的非哺乳动物宿主细胞。缺乏C-端Arg残基的D1L2酶的非限

制性实例是SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在一些实施方式中,所述缺乏C-端Arg残基的D1L2酶包含与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述缺乏C-端Arg残基的D1L2酶包含与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性,或与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约95%序列同一性,或与由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。在各个实施方式中,所述由宿主细胞产生的D1L2酶将包含指导从细胞分泌的信号肽,其通常在分泌期间被移除。所述方法还包括从培养基回收所述D1L2酶。

[0036] 在一些实施方式中,所述D1L2酶具有缺失或修饰的PRD(如所述)以及C-端Arg的截短。在实施方式中,所述实质上缺乏富含脯氨酸的结构域 (PRD) 并缺乏C-端Arg残基的D1L2酶包含与由SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述实质上缺乏富含脯氨酸的结构域 (PRD) 并缺乏C-端Arg残基的D1L2酶包含与由SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性,或与由SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约95%序列同一性,或与由SEQ ID NO:7定义的酶具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 如本文所用,在提及DNA酶之间的序列同一性时,除非另有说明,否则序列是指缺乏信号肽的成熟酶。此外,为清晰起见,除非另有说明,否则氨基酸位置根据包括信号肽在内的完整翻译的DNA酶序列进行编号。

[0038] 核苷酸和氨基酸序列的相似性,即序列同一性的百分率,可以通过本领域中已知的序列比对来确定。这类比对可以使用几种本领域已知的算法来进行,例如使用Karlin和Altschul的数学算法 (Karlin&Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)、使用hmmalign (HMMER软件包, <http://hmm.wustl.edu/>) 或使用CLUSTAL算法 (Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80)。示例性算法被并入到Altschul等, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410的BLASTN和BLASTP程序中。在使用BLAST程序时,使用相应程序的默认参数。

[0039] 在各个实施方式中,所述编码的信号肽实质上是天然的野生型人DNA酶。在一些实施方式中,所述信号肽来自于人D1 (SEQ ID NO:13)、D1L2 (SEQ ID NO:8)、D1L1 (SEQ ID NO:14) 或D1L3 (SEQ ID NO:15)。在一些实施方式中,对野生型信号序列进行1、2或3个氨基酸取代,以增强非哺乳动物表达系统的生产或分泌。在一些实施方式中,所述信号肽是适合于从非哺乳动物表达系统的宿主细胞分泌的非天然 (对于D1L2酶来说) 信号肽。示例性的非天然信号肽是 α -交配因子 (SEQ ID NO:9),其可以与例如酵母表达系统如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 一起使用。在一些实施方式中,所述D1L2酶使用SEQ ID NO:10所示例的白蛋白分泌信号肽来表达。

[0040] 在各个实施方式中,所述非哺乳动物表达系统 (例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)) 共表达或过表达一种或多种利于信号肽加工的基因。在一些实施方式中,所述基因编码具有从分泌蛋白质上切割信号肽的活性的蛋白酶。示例性蛋白酶是KEX2。

[0041] 在一些实施方式中,所述D1L2酶任选地通过氨基酸接头与载体蛋白融合。所述载体蛋白可以是多肽,例如白蛋白、转铁蛋白、Fc结构域、XTEN (参见US 8,492,530,其全部内容通过引用并入本文) 或弹性蛋白样蛋白。参见例如US 9,458,218,其全部内容通过引用并

入本文。这样的融合可以在体内持久性以及重组表达方面提供益处。

[0042] 在一些实施方式中,所述载体蛋白是白蛋白氨基酸序列,并且所述白蛋白氨基酸序列任选地通过插入的接头与D1L2的N-端处融合。示例性白蛋白氨基酸序列由SEQ ID NO: 11提供。在一些实施方式中,所述融合蛋白的白蛋白氨基酸序列或结构域与由SEQ ID NO: 11定义的参比白蛋白序列具有至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。在一些实施方式中,所述白蛋白氨基酸序列或结构域包含由SEQ ID NO: 11定义的参比白蛋白序列,或由所述参比白蛋白序列组成。在各个实施方式中,所述白蛋白氨基酸序列与新生儿Fc受体 (FcRn) 例如人FcRn结合。所述白蛋白氨基酸序列可以是野生型HAS的变体 (例如由SEQ ID NO: 11所表示)。在各个实施方式中,白蛋白变体相对于SEQ ID NO: 11可以具有1至20个或1至10个氨基酸修饰,这些修饰独立地选自缺失、取代和插入。在一些实施方式中,所述白蛋白氨基酸序列是任何哺乳动物白蛋白氨基酸序列。对白蛋白序列进行各种修饰以提高作为载体的能力是众所周知的,并且此类修饰可以与本发明一起使用。对白蛋白氨基酸序列的示例性修饰描述在US 8, 748, 380、US10, 233, 228、US10, 208, 102和US10, 501, 524中,其全部内容各自通过引用并入本文。示例性修饰包括其中所描述的E505Q、T527M和K573P中的一者或多者 (或所有)。

[0043] 在一些实施方式中,所述白蛋白氨基酸序列或结构域是由表示的全长白蛋白的片段,如SEQ ID NO: 11所示。当在白蛋白的上下文中使用时,术语“片段”是指相对于相应的未融合D1L2 (例如在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中), 提高与其融合或偶联的D1L2酶的表达的全长白蛋白或其变体 (如上所述) 的任何片段。在一些实施方式中,白蛋白的片段可以是指包含白蛋白的多个结构域 (例如结构域I和III以及结构域II和III) 的融合体的氨基酸序列 (参见例如W02011/124718)。通常,白蛋白的片段具有全长序列的至少约100个氨基酸或至少约200或至少约300个氨基酸。在各个实施方式中,所述白蛋白片段保持结合人FcRn的能力。

[0044] 在一些实施方式中,所述D1L2酶通过肽接头与载体多肽 (例如白蛋白氨基酸序列) 融合。所述肽接头可以是柔性接头、刚性接头或在一些实施方式中生理学上可切割的接头 (例如可蛋白酶切割的接头)。在一些实施方式中,所述接头的长度为5至100个氨基酸,或者长度为5至50个氨基酸。在一些实施方式中,所述接头的长度为约10至约35个氨基酸或约15至约35个氨基酸。在一些实施方式中,所述接头是20至40个氨基酸的柔性接头。柔性接头可以主要包含Gly和Ser氨基酸残基 (或由其组成)。

[0045] 在一些实施方式中,所述D1L2酶被融合到Fc结构域。参见例如W0 2005047334A1、W0 2004074455A2、US 20070269449,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,所述人Fc结构域选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一些实施方式中,所述人Fc结构域是人IgG Fc结构域。在一些实施方式中,所述Fc结构域至少具有两个重链恒定区结构域 (CH2和CH3) 和铰链区。Fc结构域可以在所述D1L2酶的N-端和/或C-端处任选地使用插入的接头与所述D1L2连接。在一些实施方式中,所述D1L2酶包含使用插入的氨基酸接头融合到成熟D1L2酶的N-端的Fc结构域序列。所述肽接头可以是柔性接头、刚性接头或在一些实施方式中生理学上可切割的接头。在一些实施方式中,所述D1L2酶包含任选地通过接头 (例如柔性接头) 融合到D1L2酶的C-端的Fc结构域序列。

[0046] 柔性接头主要或完全由小的非极性或极性残基例如Gly、Ser和Thr组成。示例性柔

性接头包括 $(\text{Gly}_y\text{Ser})_n\text{S}_z$ 接头,其中y是1至10(例如1至5),n是1至约10,并且z是0或1。在一些实施方式中,n是3至约8或3至约6。在示例性实施方式中,y是2至4,并且n是3至8。由于其柔性,这些接头是非结构化的。更多的刚性的接头包括聚脯氨酸或聚Pro-Ala基序和 α -螺旋接头。示例性的 α -螺旋接头是A(EAAAK) $_n$ A,其中n如上所定义(例如1至10或3至6)。通常,接头可以主要由选自Gly、Ser、Thr、Ala和Pro的氨基酸组成。示例性接头序列含有至少10个氨基酸,并且可以在10至约50个氨基酸、或约15至约40个氨基酸、或约15至约35个氨基酸的范围内。示例性接头设计被提供为SEQ ID NO:12。

[0047] 在一些实施方式中,所述D1L2酶包含接头,其中所述接头的氨基酸序列主要是甘氨酸和丝氨酸残基,或基本上由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些实施方式中,所述接头中Ser与Gly的比例分别为约1:1至约1:10、约1:2至约1:6或约1:4。示例性的接头序列包含S(GGS) $_4$ GSS、S(GGS) $_9$ GSS、(GGS) $_9$ GSS或由其组成。在一些实施方式中,所述接头具有至少10个氨基酸、或至少15个氨基酸、或至少20个氨基酸、或至少25个氨基酸、或至少30个氨基酸。例如,所述接头可以具有15至40个氨基酸的长度。在各个实施方式中,至少15个氨基酸的更长接头可以提高在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达的产量。

[0048] 在其他实施方式中,所述接头是生理学上可切割的接头例如可蛋白酶切割的接头。例如,所述蛋白酶可以是凝血途径的蛋白酶例如活化的因子XII。在一些实施方式中,所述接头包含因子XI和/或前激肽释放酶或其生理学上可切割的片段的氨基酸序列。在其他实施方式中,所述接头包括作为中性粒细胞特异性蛋白酶例如中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶G和蛋白酶3的切割靶的肽序列。

[0049] 在示例性实施方式中,所述D1L2酶的生产使用至少约1000L、或至少约5000L、或至少约10,000L、或至少约50,000L的大规模(例如分批)发酵进行。在各个实施方式中,所述发酵产生至少约200mg/L的所述D1L2酶。在一些实施方式中,所述发酵产生至少约300mg/L的所述D1L2酶、至少约400mg/L的所述D1L2酶、至少约600mg/L的所述D1L2酶、或至少约800mg/L的所述D1L2酶、或至少约1g/L的所述D1L2酶、或至少约1.2g/L的所述D1L2酶。在其他实施方式中,所述发酵产生至少约1.5g/L的所述D1L2酶、或至少约2g/L的所述D1L2酶、或至少约5g/L或至少约10g/L的所述D1L2酶。

[0050] 在根据本公开的各种实施方式中,所述重组D1L2酶未被糖基化。在各个实施方式中,按照本公开生产的D1L2酶是实质上无免疫原性的。

[0051] 根据其他方面,本公开提供了一种按照本文描述的方法生产的重组D1L2酶。在一些实施方式中,所述D1L2酶被工程化改造,以具有适合于治疗、包括使用局部组合物的治疗的物理学、药效学和/或酶学性质。在各个实施方式中,所述工程化D1L2酶与D1L2亚型1(由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4定义)相比可能具有相同或更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性,相同或更高的染色体DNA(染色质)降解活性,相似或改进的蛋白酶抗性,以及在非哺乳动物表达系统(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中更高的生产水平。

[0052] 在一些实施方式中,本发明采用通过DNA酶1蛋白家族的两个成员之间转移单个氨基酸或多个相邻氨基酸(被称为“构件”)而产生的D1L2酶,从而产生具有酶活性的D1L2变体。“构件”由DNA酶1蛋白家族的两个或更多个成员之间可变的氨基酸定义。这些可变氨基酸两侧是DNA酶1蛋白家族的两个以上成员之间保守的氨基酸(“锚”)。可变的单个氨基酸或多个连续氨基酸(“构件”)通过将植入在保守的单个氨基酸或多个连续氨基酸(“锚”)之间,

在DNA酶1蛋白家族的成员之间交换。参见美国专利10,696,956,其全部内容通过引用并入本文。

[0053] 在转移3个或更多个氨基酸的情况下,多达1/3的氨基酸可以被进一步取代。例如,在3个或6个氨基酸作为构件被转移的情况下,分别有1个或最多2个残基可以被进一步取代。在一些实施方式中,4个以上氨基酸作为构件取代被转移,并且最多25%的转移氨基酸被进一步取代,例如使用保守或非保守氨基酸修饰。例如,在转移4、8或12个氨基酸的情况下,所述构件取代中的1、2或3个氨基酸可以(分别)被进一步取代。

[0054] 在一些实施方式中,所述D1L2的构件取代选自(例如选自1、2、3、4或5个)非人D1L2蛋白,并产生特征为对应于SEQ ID NO:1的下述突变中的一者或多者的人D1L2的变体: L22K、I24V、I29V、S35N、S35H、S35R、S35T、V37A、S38L、A41D、A41V、A41G、G43I、S44G、S44I、I45V、K48Q、L55I、L55V、A56T、A56M、P64A、S70D、S70T、A71T、A71L、A71S、A71V、M73L、E74Q、N77H、S78R、E81K、E81R、E83N、S85G、S85N、Q90E、Q90K、Q96H、F103Y、V104I、K107D、A109V、A109T、A109K、V110A、V113L、V113M、D114S、D114E、L117Q、P119S、E122G、V124A、V124F、S126N、E128D、F134V、A136V、A136T、G138S、G138R、T139S、T139C、S148C、A151P、P154A、A159P、A160G、A161P、A161T、Q162D、Q162K、Q162R、Q162T、N163K、N163E、L164V、L164F、I167V、H174N、Q175H、A178T、A178V、D192N、G195N、T196S、D198V、M199L、M199I、S210K、R213K、Q215H、A218P、A219S、E226Q、V227I、S243T、A252V、C253S、A255S、A255V、R256H、L257M、R259K、S260T、L261V、Q264H、T267S、T267A、D270N、G276D、G276S、T280S、T280D、T280A、A284C、I286V、L295F、F297S、F297T、F297P、H298R和R299del。

[0055] 根据所述构件技术的D1L2的变体公开在WO 2020/0271953和WO 2020/163264中,其全部内容通过引用并入本文。

[0056] D1L2酶的工程化变体可以包含人D1L2的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)中的一个或多个氨基酸取代、添加(插入)、缺失或截短。氨基酸取代可以包括保守和/或非保守取代。例如,“保守取代”可以例如基于所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、尺寸、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来进行。所述20种天然存在的氨基酸可以分为下述6个标准氨基酸组:(1)疏水的:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性的:Asp、Glu;(4)碱性的:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;和(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。“保守取代”被定义为氨基酸用列于上面示出的6个标准氨基酸组的同一个组内的另一种氨基酸替换。例如,用Glu替换Asp在经这样修饰的多肽中保留一个负电荷。此外,甘氨酸和脯氨酸根据其破坏 α -螺旋的能力可以彼此取代。本文所使用的“非保守取代”被定义为氨基酸用列于上面示出的6个标准氨基酸组(1)至(6)的不同组中的另一种氨基酸替换。

[0057] D1L2和变体的DNA片段化可以使用本领域技术人员已知的方法例如凝胶电泳和DNA酶活性测定来测量。定量DNA片段化活性的方法被描述在例如US10,696,956中,其全部内容通过引用并入本文。

[0058] 根据本公开,所述D1L2酶由多核苷酸编码,所述多核苷酸可以被密码子优化以用于在非哺乳动物表达系统(包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中表达。在一些实施方式中,所述多核苷酸包含质粒载体。在各个实施方式中,所述质粒载体包含编码本文描述的D1L2酶或变体的核酸,其可操作连接到在所述宿主细胞中有功能的表达控制

区。所述表达控制区能够驱动所述可操作连接的编码核酸的表达,以便在用所述表达载体转化的细胞中生产所述酶。

[0059] 表达控制区是调控多核苷酸(在本文中有时被称为元件)例如启动子或增强子,它们影响可操作连接的核酸的表达。在一个实施方式中,所述表达控制区赋予可操作连接的核酸以可调控的表达。信号(有时被称为刺激)可以提高或降低与此类表达控制区可操作连接的核酸的表达。对信号做出响应提高表达的此类表达控制区通常被称为诱导型。对信号做出响应降低表达的此类表达控制区通常被称为阻遏型。通常,由此类元件提供的提高或降低的量与存在的信号的量成正比;信号的量越大,表达的提高或降低越大。

[0060] 在其他方面,本公开提供了如上所述的非哺乳动物表达细胞(即“宿主细胞”),其包含编码本文描述的D1L2酶的表达载体。在一些实施方式中,所述细胞是酵母细胞,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0061] 在各个实施方式中,所述D1L2酶含有一个或多个聚乙二醇(PEG)组分或其他偶联物例如脂肪酸或酰基偶联物。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸选自赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。在一些实施方式中,适合于PEG化的一个或多个氨基酸通过取代D1L2中的一个或多个氨基酸而被引入。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸是赖氨酸或精氨酸,并且PEG化通过胺偶联来进行。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸是谷氨酰胺(Gln或Q),并且PEG化通过转谷氨酰胺酶(TGase)介导的酶偶联来进行。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸是半胱氨酸(Cys或C),并且PEG化通过硫醇偶联来进行。例如,NHS-PEG试剂可用于修饰D1L2中的伯胺。在一些实施方式中,一个或多个PEG化氨基酸与独立地选自具有独立选择并在约2kDa至约60kDa范围内的分子量的直链或支链PEG的PEG部分偶联。在一些实施方式中,所述PEG部分具有独立选择并在约5kDa至约60kDa、或约5kDa至约40kDa、或约5kDa至约30kDa、或约10kDa至约60kDa、或约10kDa至约40kDa、或约10kDa至约30kDa的范围的分子量。

[0062] 在一些实施方式中,所述重组表达系统具有在成对碱性氨基酸处切割的一种或多种蛋白酶的缺失或失活。示例性的酶包括由巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或其他酵母系统表达的天冬氨酸蛋白酶3(Ysp1)和Kexin(Kex2)。在一些实施方式中,这些酶通常不被缺失或失活,但在重组蛋白生产期间其活性被蛋白酶抑制剂抑制。

[0063] 此外,在一些实施方式中,用于所述非哺乳动物表达系统的生长培养基补充有聚阴离子例如硫酸葡聚糖、肝素、柠檬酸铁和EDTA。在其他实施方式中,所述生长培养基补充有平均分子量在5kDa至100kDa之间的硫酸葡聚糖。在一些实施方式中,所述硫酸葡聚糖具有约10kDa以下、或约20kDa以下、或约30kDa以下、或约40kDa以下、或约50kDa以下、或约75kDa以下、或约100kDa以下的平均分子量。在各个实施方式中,所述聚阴离子以足以与产生的重组蛋白复合的量添加到培养物中。在一些实施方式中,所述重组D1L2酶或其变体通过包括将所述酶从聚阴离子例如硫酸葡聚糖、肝素、EDTA解离的方法从培养基纯化。在一些实施方式中,纯化方法包括强阴离子交换树脂例如三乙基氨基甲基。

[0064] 在其他方面,本公开提供了用于外用或局部施用的药物组合物。所述组合物包含本文描述的或按照本公开生产的重组D1L2酶以及药学上可接受的载体。

[0065] 在一些实施方式中,所述药物组合物被配制用于局部施用,例如霜剂、洗剂、凝胶、溶液、泡沫、喷剂、软膏、漱口水、洗发水或皂。在一些实施方式中,所述药物组合物用于具有

酸性环境的组织和/或生物膜的局部或外用治疗。例如,所述酸性环境可能具有约6.0以下、约5.5以下、或约5.0以下、或约4.5以下、或约4.0以下的pH。在一些实施方式中,所述组合物是用于维持皮肤健康和皮肤美观的皮肤护理组合物。在这些实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防皮肤感染和/或炎症的方法。例如,在一些实施方式中,所述组合物被施用到包含角化不良病变的皮肤。角化不良是一种以细胞核滞留在角质层中为特征的角化模式。在皮肤中,这个过程导致环状鳞屑被有核细胞的异常代替。角化不良与颗粒层变薄或丧失有关,通常见于细胞更新增加的疾病,无论是炎性还是肿瘤性的。角化不良见于银屑病斑块和头皮屑中。

[0066] 在使用局部组合物的一些实施方式中,所述受试者可能患有影响皮肤、毛发或指甲的外观或健康的病症。在一些实施方式中,所述受试者患有诸如银屑病、皮炎、大疱性表皮松解症或过敏反应(例如包括荨麻疹或皮疹)的病症。在一些实施方式中,受试者具有干燥的皮肤,例如干皮病。在一些实施方式中,受试者患有寻常痤疮。在其他实施方式中,受试者的皮肤的特征可以是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的过度生长,这可能与特异性皮炎相关。在一些实施方式中,受试者患有银屑病,并且所述组合物被施用到银屑病病变。

[0067] 在其他实施方式中,所述局部组合物可用于促进伤口愈合和/或减少或预防纤维化的方法中,例如在US 2018/0271953中所描述的方法,该专利的全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,所述受试者具有慢性伤口,例如糖尿病溃疡、截肢伤口或皮肤或组织移植(包括供体部位)。在一些实施方式中,所述伤口是烧伤,例如一度或二度烧伤。在一些实施方式中,所述受试者具有晒伤,其可以用根据本公开的外用洗剂、凝胶或软膏治疗。

[0068] 在其他实施方式中,所述组合物被配制用于施用到眼部、耳部、鼻腔或鼻窦腔和口腔中的一者或多者。根据这些实施方式的组合物可用于治疗或预防受试者眼部的炎症或感染的方法中,例如其中所述组合物被配制成滴眼液或洗眼液(包括眼睑清洁剂)。在一些实施方式中,所述受试者可能患有干眼病或可能患有过敏性、细菌性或病毒性结膜炎。细菌性结膜炎可因生物膜形成而恶化。在一些实施方式中,所述受试者具有发炎的眼部导管,其可能表现为睑缘炎或相关病症(例如睑板腺囊肿)。在其他实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防受试者耳部的炎症或感染,例如其中所述组合物被配制成滴耳液。示例性病症是耳部感染例如中耳炎。在其他实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防受试者的鼻腔或鼻窦炎症或感染的方法中,例如其中所述组合物被配制成鼻喷剂。示例性病症包括鼻炎、鼻窦炎和术后鼻整形术。在一些实施方式中,所述受试者具有鼻窦感染或复发性鼻窦感染。在其他实施方式中,所述受试者具有口腔感染或炎症,包括牙龈炎和牙脓肿。

[0069] 在一些实施方式中,所述组合物可用于治疗核酸相关眼部疾病的方法中,如US 9,867,871中所述的方法,该专利的全部内容通过引用并入本文。此类疾病包括干眼病、板层角膜炎、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎、感染性结晶性角膜病、眼瘢痕性类天疱疮(OCP)、干燥性角结膜炎(KCS)、干燥综合征(SS)、干燥综合征相关性干燥性角结膜炎、非干燥综合征相关性干燥性角结膜炎、干燥性角膜炎、干燥综合征、干眼症、泪膜障碍、泪液生成减少、水液缺乏性干眼症(ATD)和睑板腺功能障碍(MGD)。

[0070] 在其他实施方式中,所述组合物被配制用于肺部递送,例如粉末或溶液气雾剂。

在一些实施方式中,所述组合物被配制用于通过雾化器递送。在各个实施方式中,所述组合物可用于治疗或预防患者肺部炎症或感染的方法。在一些实施方式中,所述受试者患有囊性纤维化、肺炎(包括呼吸机相关性肺炎或VAP)、支气管炎、哮喘、下呼吸道感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、输血相关性肺损伤(TRALI)或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在一些实施方式中,所述受试者患有肺纤维化(例如特发性肺纤维化或IPF)。在其他实施方式中,所述受试者患有慢性或复发性肺部感染。

[0071] 在囊性纤维化的情况下,很难根除或控制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染,这部分由于物膜的形成导致。通过施用根据本公开的所述D1L2酶,例如通过雾化器,可能可以控制囊性纤维化患者中的假单胞菌感染,并减轻抗生素的过度使用。在各个实施方式中,本文提供的所述D1L2酶与PULMOZYME(链道酶 α)相比在CF肺分泌物中具有更高活性。

[0072] 在其他实施方式中,所述患者可能具有留置的医疗装置,其倾向于有利于微生物定殖和生物膜形成。在一些实施方式中,将所述D1L2酶或包含所述D1L2酶的组合物施用到机械通气的患者,以避免或减少生物膜形成。

[0073] 本文描述的组合物可用于治疗或控制生物膜微生物的感染和/或定殖,包括在哺乳动物组织上以及在留置的医疗装置的表面上。形成生物膜的病原体 and 机会病原体包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、A组 β -溶血性链球菌、肠道细菌、分枝杆菌(包括非结核分枝杆菌)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。这些细菌的生物膜形成导致对抗生素的耐药性。这些病原体引起下述感染(但不限于):自体瓣膜心内膜炎(NVE)、中耳炎(OM)、慢性细菌性前列腺炎、囊性纤维化(CF)、血液感染、尿路感染(任选地与导尿管上的生物膜相关)、人工瓣膜心内膜炎(PVE)、眼部感染(任选地与隐形眼镜上的生物膜相关)和盆腔炎(任选地与宫内节育器(IUD)上的生物膜相关)。

[0074] 本文所使用的“治疗”指的是治疗性治疗,其中目的是减缓(减轻)不期望的生理病症、障碍或疾病,或获得有益或期望的临床结果。有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;病症、障碍或疾病程度的减轻;病症、障碍或疾病状态的稳定(即不恶化);病症、障碍或疾病发作延迟或进展减缓;病症、障碍或疾病状态的改善;以及病症、障碍或疾病的缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测还是不可检测的,或增强或改善。治疗包括在不产生过多副作用的情况下引发临床显著的反应。在其他实施方式中,“治疗”是指预防性措施,其中目的是延迟不期望的生理病症、障碍或疾病的发作或降低其严重程度,例如在易患疾病的人中。

[0075] 本文所使用的术语“约”是指相关数值的 $\pm 10\%$ 。

[0076] 实施例

[0077] DNASE1L2的重组表达和细胞外染色质降解活性

[0078] DNASE1L2亚型1和2的氨基酸序列比对在DNASE1L2亚型1的中心鉴定到富含脯氨酸的结构域GERAPPLPSRRALTPPPLPAA(SEQ ID NO:3)(图1)。使用天然分泌信号肽在巴斯德毕

赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中克隆并表达 DNASE1L2 亚型1 (SEQ ID NO:1)。对培养上清液的分析仅检测到可忽略量的 DNASE1L2 蛋白,表明 DNASE1L2 亚型1 不适合于在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中生产 (图2)。用 α -交配因子前肽原 (aMF; SEQ ID NO:9) 取代天然分泌信号肽,增强巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的蛋白质分泌。然而,新的 aMF-DNASE1L2 亚型1 构建物在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的分泌仍然较低,因为在培养上清液中未能检测到显著量的靶蛋白。

[0079] 在本研究中,我们调查了包含 aMF 和 DNASE1L2 亚型2 的表达载体。令人震惊的是,该新的构建物能够在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中强烈地表达并分泌,并且可以在培养上清液中检测到显著量的靶蛋白 (图2)。因此,PRD 的消除使得能够在酵母表达系统例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中大规模制备 DNASE1L2。

[0080] 进行了 5L 规模的发酵,并使用亲和层析纯化 PRDD-DNASE1L2 (SEQ ID NO:2)。测试纯化的蛋白质的酶活性。尽管以前的报告已测量了 DNASE1L2 对纯化的 DNA 的降解,但在本实施例中使用来自于 HEK293 细胞的完整细胞核的高分子量染色质作为底物。在低于 6.5 的 pH 水平下观察到 PRDD-DNASE1L2 的强烈的染色质降解活性,而缺失碱性结构域的 DNASE1L3 在中性 pH 下显示出任选的染色质降解 (图3)。这些数据表明 DNASE1L2 中 PRD 的缺失使得能够大规模制备在酸性环境中高效降解染色质的酶。

[0081] Uniprot 中来自于不同物种的 DNASE1L2 氨基酸序列的比对表明包含 PRD 的亚型1 在人类、黑猩猩和狒狒中表达,而在小鼠、大鼠、兔、狗、猪、豚鼠、牛和象中则不表达。此外,只有来自于人类、黑猩猩和狒狒的 DNASE1L2 的特征是具有 C-端精氨酸残基 (图4)。因此研究了具有 C-端精氨酸残基缺失的衍生物,希望找到具有改进特征的 DNASE1L2 变体。令人惊讶的是,如图5 中所示,通过筛选表达 DNASE1L2 亚型2 R278del 变体 (SEQ ID NO:7) 的巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 克隆,鉴定到 3 个克隆与 DNASE1L2 亚型2 (SEQ ID NO:6) 相比具有显著提高的生产水平。

[0082] PRDD-DNASE1L2 及其变体特别适合于在酸性条件下降解包括中性粒细胞细胞外诱捕网 (NET) 在内的细胞外染色质,例如在炎性肺病例如囊性纤维化和哮喘患者的酸性痰液中 (Kodric M, Shah AN, Fabbri LM 等, 使用诱导的痰液调查哮喘中的气道酸化:可行性和相关性研究 (An investigation of airway acidification in asthma using induced sputum: A study of feasibility and correlation), Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175 (9) :905-10; 滴酸:为什么囊性纤维化黏液异常? (Dropping acid: why is cystic fibrosis mucus abnormal?), Eur Respir J. 2018 Dec 6; 52 (6) :1802057) 以及在天然具有酸性 pH 的皮肤上。

[0083] 在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中也实现了 PRDD-DNASE1L2 与白蛋白的融合体的重组表达。通过由 Gly 和 Ser 组成的柔性接头将白蛋白融合在 PRDD-DNASE1L2 的 N-端处。在这些实施方式中,PRDD-DNASE1L2 融合体利用人白蛋白分泌信号肽 (SEQ ID NO:10) 分泌。这一系统同样提供了 PRDD-DNASE1L2 的良好表达。

[0084] 序列

[0085] 野生型 DNASE1L2 酶

[0086] SEQ ID NO:1

[0087] 人 D1L2 亚型1, 信号肽, 成熟蛋白, 富含脯氨酸的结构域

[0088] MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAV
SALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPL
PSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLR
SSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRLSLKPKSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

[0089] SEQ ID NO:2

[0090] 人D1L2亚型2,信号肽,成熟蛋白:

[0091] MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAV
SALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTAQNLVLI
PLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSSEVFKWLIPDSADTTVGNSD
CAYDRIVACGARLRRLSLKPKSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

[0092] DNASE1L2亚型1中的富含脯氨酸的结构域

[0093] SEQ ID NO:3

[0094] GERAPPLPSRRALTPPPLPAA

[0095] DNASE1L2变体

[0096] SEQ ID NO:4

[0097] 人D1L2亚型1:成熟蛋白,富含脯氨酸的结构域

[0098] LRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQ
PLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLI
PLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSSEVFKWLIPDSADTTVGNSD
CAYDRIVACGARLRRLSLKPKSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

[0099] SEQ ID NO:5

[0100] 人D1L2亚型1变体:R299de1突变体,成熟蛋白,富含脯氨酸的结构域

[0101] LRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQ
PLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLI
PLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSSEVFKWLIPDSADTTVGNSD
CAYDRIVACGARLRRLSLKPKSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFH

[0102] SEQ ID NO:6

[0103] 人D1L2亚型2:成熟蛋白

[0104] LRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQ
PLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYL
DVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRLSLKPKS
ATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

[0105] SEQ ID NO:7

[0106] 人D1L2亚型2变体:R278de1突变体,成熟蛋白

[0107] LRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQ
PLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYL
DVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRLSLKPKS
ATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFH

[0108] 分泌信号肽

- [0109] SEQ ID NO:8
- [0110] D1L2信号肽
- [0111] MGGPRALLAALWALEAAGTAA
- [0112] SEQ ID NO:9
- [0113] 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的 α 交配因子
- [0114] MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLGDFDVAVL PFSNSTNNGLLFINTT
IASIAAKEEGVS
- [0115] SEQ ID NO:10
- [0116] 人白蛋白分泌信号肽+前肽
- [0117] MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR
- [0118] SEQ ID NO:13
- [0119] D1信号肽
- [0120] MRGMKLLGALLALAALLQGAVS
- [0121] SEQ ID NO:14
- [0122] D1L1信号肽
- [0123] MHYPTALLFLILANGAQA
- [0124] SEQ ID NO:15
- [0125] D1L3信号肽
- [0126] MSRELAPLLLLLSIHSALA
- [0127] 白蛋白序列
- [0128] SEQ ID NO:11
- [0129] 人血清白蛋白(成熟蛋白):
- [0130] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL
FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRH
PYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRF
PKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLG EYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE
LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLV AASQAALGL
- [0131] 接头序列
- [0132] SEQ ID NO:12
- [0133] 柔性肽接头:
- [0134] GGGSGGGSGGGGS

DNASE II2-L 序列标识	MGGPRATTAATWALEAAGTAALRIGAFNIQSGDSKVSQDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVRRDPOLSAVSALMEQINSVSEHEYSVSSQPLGRDQYKEM	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
DNASE II2-L(成熟的)	-----LRIGAFNIQSGDSKVSQDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVRRDPOLSAVSALMEQINSVSEHEYSVSSQPLGRDQYKEM	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
DNASE II2-S 序列标识	MGGPRATTAATWALEAAGTAALRIGAFNIQSGDSKVSQDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVRRDPOLSAVSALMEQINSVSEHEYSVSSQPLGRDQYKEM	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
DNASE II2-S(成熟的)	-----LRIGAFNIQSGDSKVSQDPACGSIIAKILAGYDLALVQEVRRDPOLSAVSALMEQINSVSEHEYSVSSQPLGRDQYKEM	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320

DNASE II2-L 序列标识	YLEFVY8KDAVSVDIYLYPDPEDVFSREPTVVKFSAPGIGERAPPESSRAITPPPPFAAAGNIYLIPIHAAPHQAAVEIDALYDVYLDVICKWGTDDMI	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
DNASE II2-L(成熟的)	-----YLEFVY8KDAVSVDIYLYPDPEDVFSREPTVVKFSAPGIGERAPPESSRAITPPPPFAAAGNIYLIPIHAAPHQAAVEIDALYDVYLDVICKWGTDDMI	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
DNASE II2-S 序列标识	YLEFVY8KDAVSVDIYLYPDPEDVFSREPTVVKFSAPGIGERAPPESSRAITPPPPFAAAGNIYLIPIHAAPHQAAVEIDALYDVYLDVICKWGTDDMI	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
DNASE II2-S(成熟的)	-----YLEFVY8KDAVSVDIYLYPDPEDVFSREPTVVKFSAPGIGERAPPESSRAITPPPPFAAAGNIYLIPIHAAPHQAAVEIDALYDVYLDVICKWGTDDMI	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400

DNASE II2-L 序列标识	FLGDFNADGCSYVRAQDWAALIRLSSEVFKWLIIPDSADITVGNSDCAVDRIVACGAHRLRSIKPQSAIVHDFQEEFGDQQAALISDHFPPVILKTHR	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460
DNASE II2-L(成熟的)	-----FLGDFNADGCSYVRAQDWAALIRLSSEVFKWLIIPDSADITVGNSDCAVDRIVACGAHRLRSIKPQSAIVHDFQEEFGDQQAALISDHFPPVILKTHR	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460
DNASE II2-S 序列标识	FLGDFNADGCSYVRAQDWAALIRLSSEVFKWLIIPDSADITVGNSDCAVDRIVACGAHRLRSIKPQSAIVHDFQEEFGDQQAALISDHFPPVILKTHR	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460
DNASE II2-S(成熟的)	-----FLGDFNADGCSYVRAQDWAALIRLSSEVFKWLIIPDSADITVGNSDCAVDRIVACGAHRLRSIKPQSAIVHDFQEEFGDQQAALISDHFPPVILKTHR	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460

图1

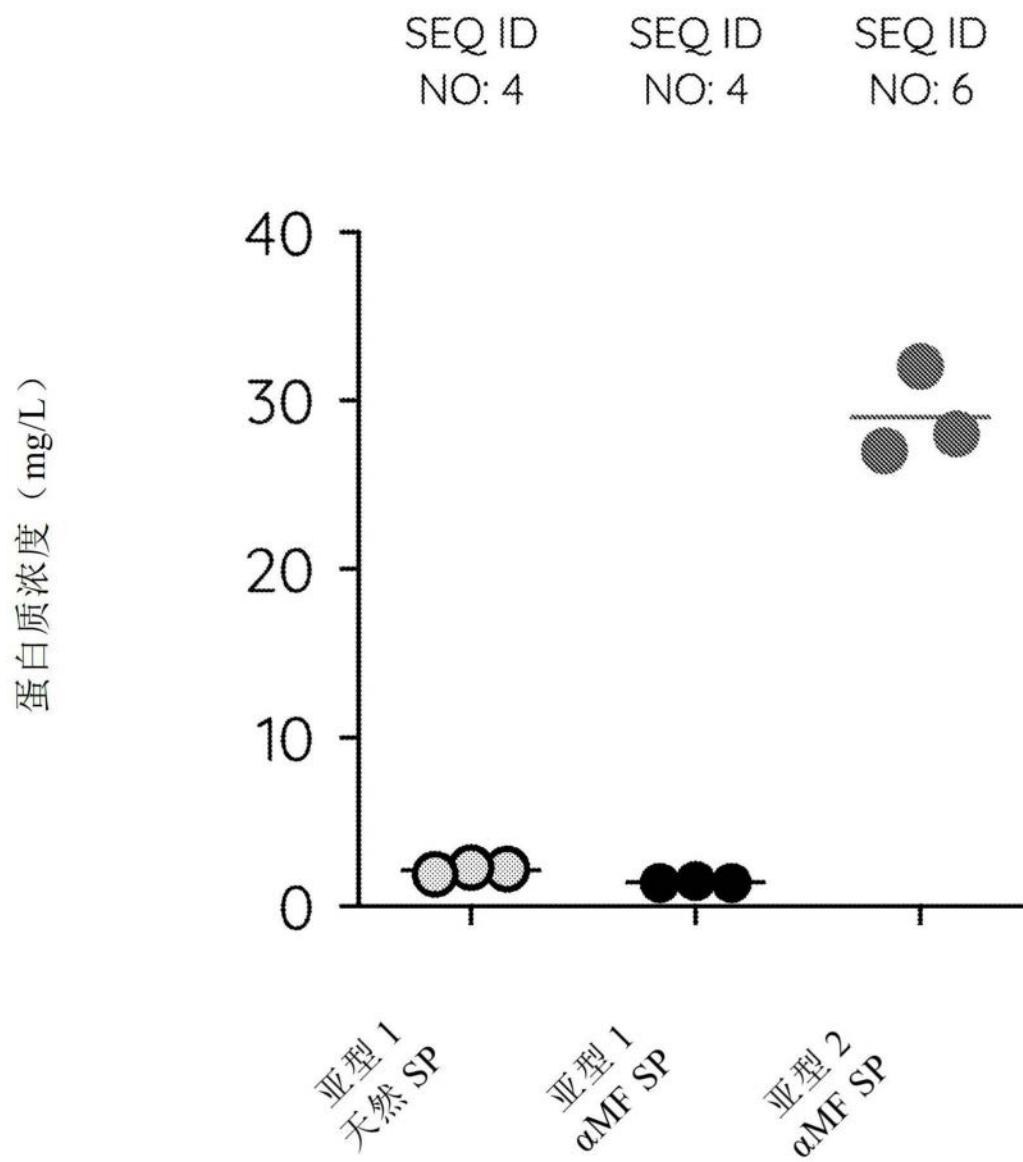


图2

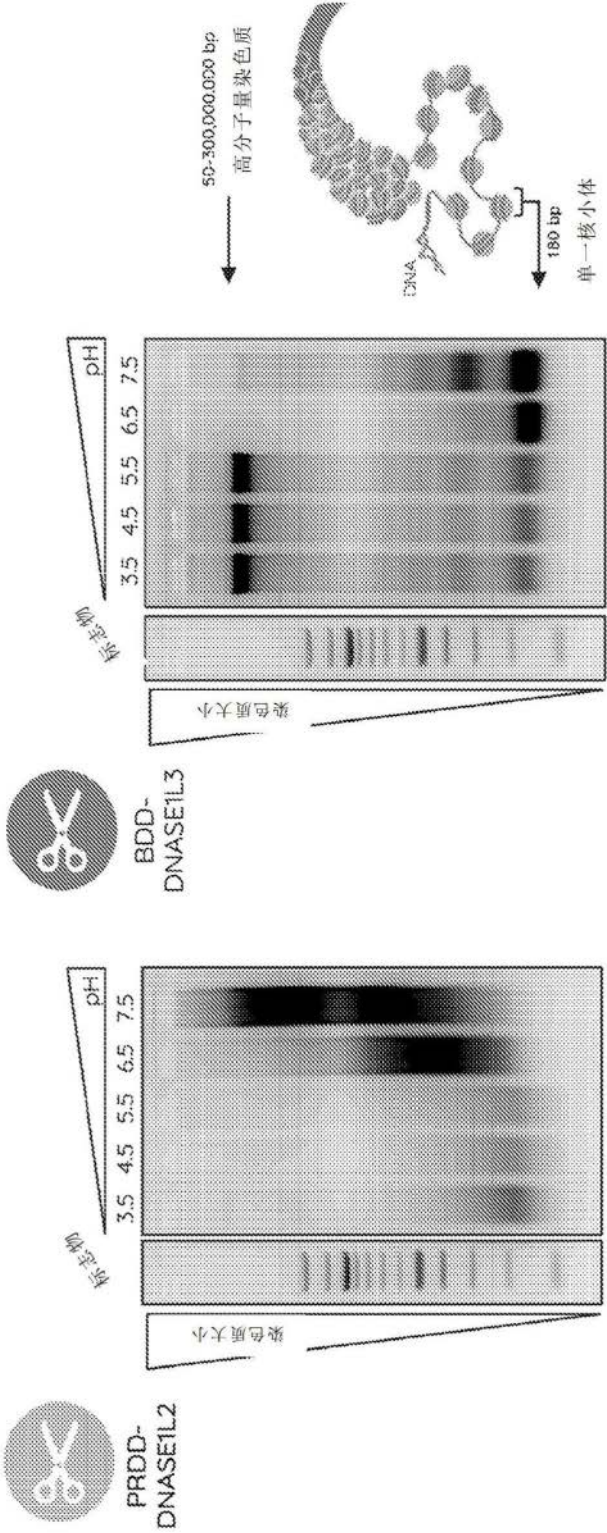


图3

[illegible]

图4

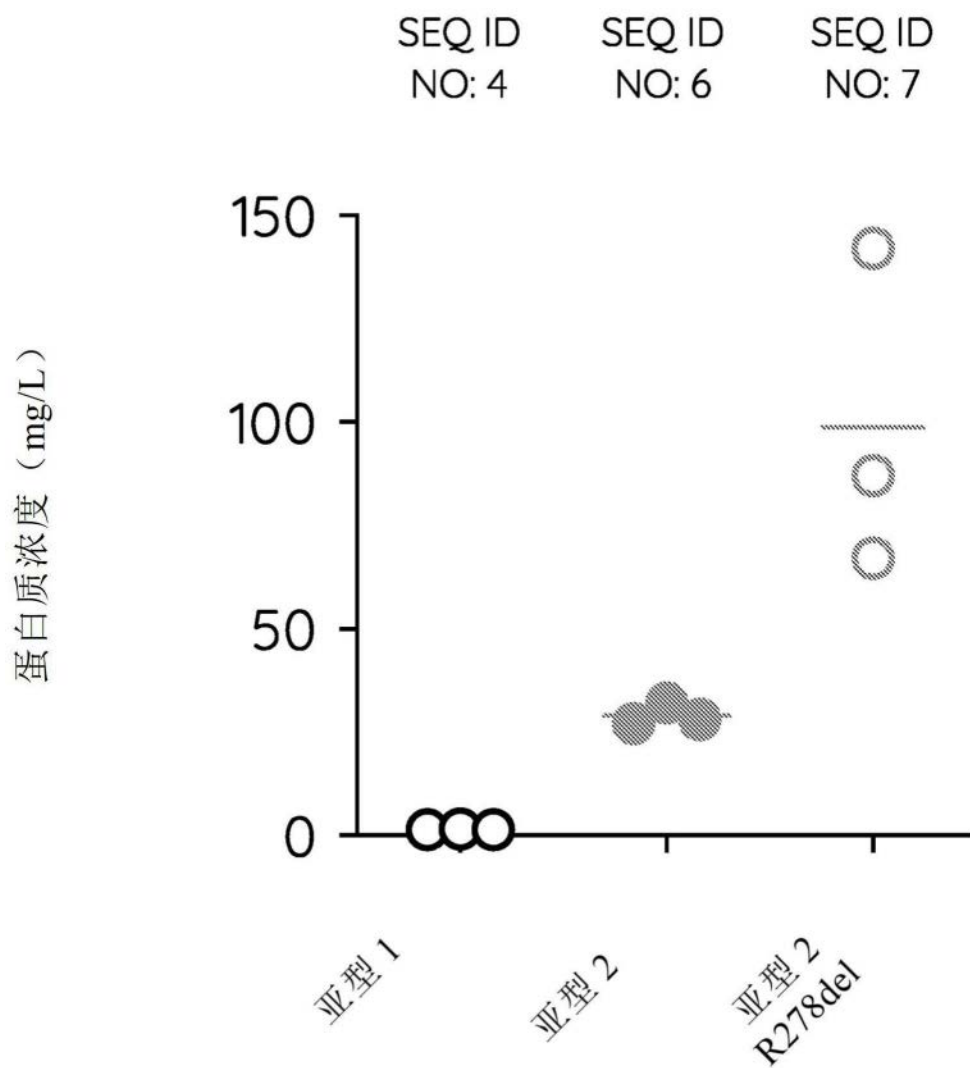


图5

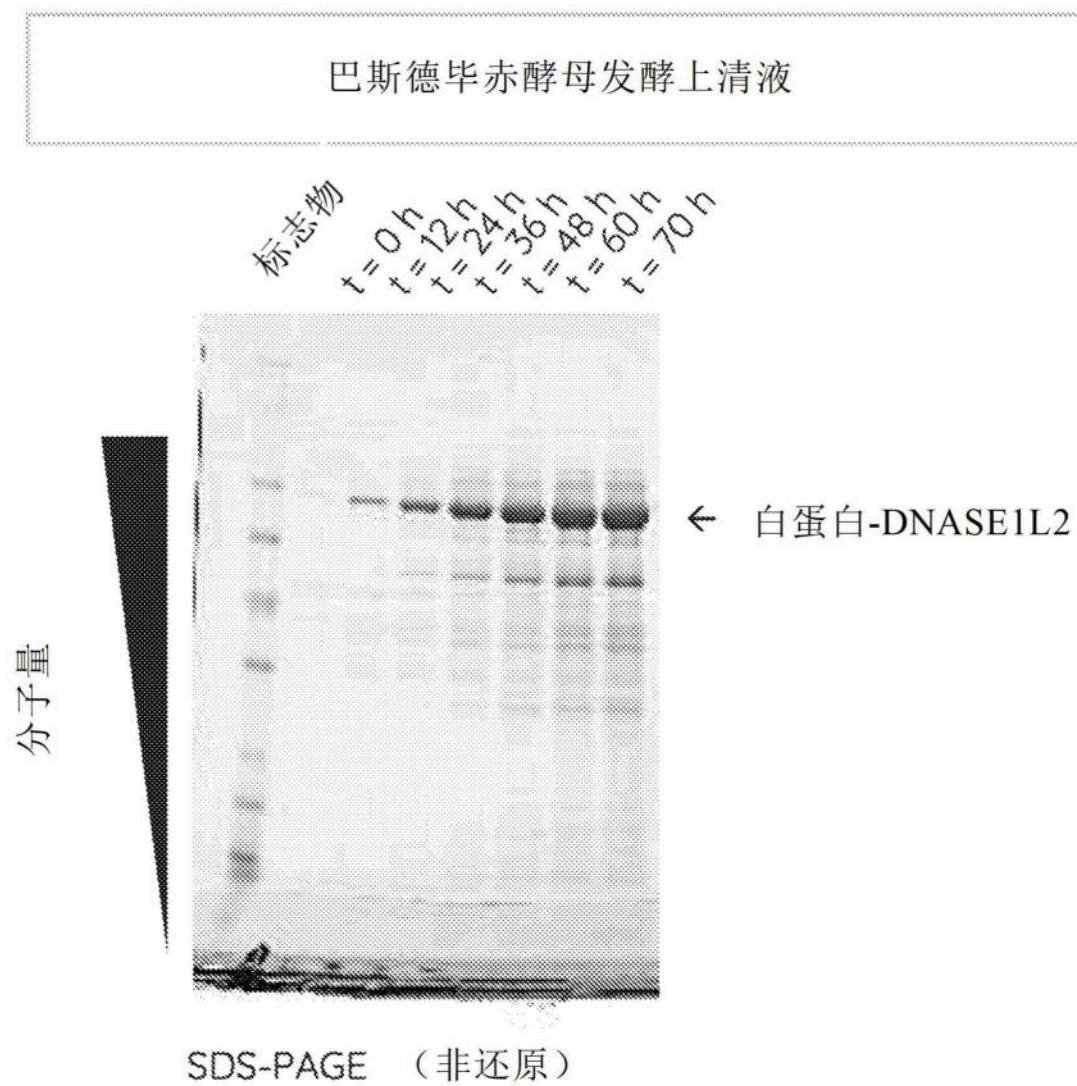


图6