

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577314号
(P7577314)

(45)発行日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(24)登録日 令和6年10月25日(2024.10.25)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/14
請求項の数 23 (全98頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-531567(P2020-531567)	(73)特許権者	520055939
(86)(22)出願日	平成30年8月20日(2018.8.20)		ニュートロリス インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2020-534865(P2020-534865 A)		アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチュー
(43)公表日	令和2年12月3日(2020.12.3)	(74)代理人	セッツ ケンブリッジ ブロードウェイ 1
(86)国際出願番号	PCT/US2018/047084		110000796
(87)国際公開番号	WO2019/036719	(72)発明者	弁理士法人三枝国際特許事務所
(87)国際公開日	平成31年2月21日(2019.2.21)		フックス トビアス エー.
審査請求日	令和3年8月18日(2021.8.18)		アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
(31)優先権主張番号	62/611,166		セッツ ケンブリッジ ノース メイン ス
(32)優先日	平成29年12月28日(2017.12.28)		トリート 7 0 0 シー／オー ニュート
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ロリス セラピューティクス インコーポ
(31)優先権主張番号	62/547,220		レイテッド
(32)優先日	平成29年8月18日(2017.8.18)		ヒメネスーアルカサル ミゲル
最終頁に続く			アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
			セッツ ケンブリッジ ノース メイン ス
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改変型DNAse酵素及び治療における使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
配列番号2により定義される酵素に対して少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号33により定義されるC末端テールの少なくとも5アミノ酸残基が短縮されたDNAse1様3(D1L3)バリエーションを含み、該D1L3バリエーションは、配列番号2の野生型D1L3と比較して増大したクロマチン分解活性を有する、細胞外クロマチン分解を必要とする対象を治療するための医薬組成物。

【請求項2】
前記バリエーションがタンパク質または担体部分に融合または結合されており、任意に担体部分がアルブミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】
前記バリエーションが、配列番号33によって定義されるC末端テールの全部の欠失を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】
前記バリエーションが、配列番号2で定義される酵素に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項5】
配列番号2で定義される酵素に対して少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号33により定義されるC末端テールの少なくとも5アミノ酸残基が短縮されたDNAse1様3(D1L3)バリエーションをコードする単離されたポリヌクレオチドを含み、

該D 1 L 3 バリエントは、配列番号 2 の野生型 D 1 L 3 と比較して増大したクロマチン分解活性を有する、細胞外クロマチン分解を必要とする対象を治療するための医薬組成物。

【請求項 6】

前記バリエントがタンパク質または担体部分に融合または結合されており、任意に担体部分がアルブミンである、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記バリエントが、配列番号 3 3 によって定義される C 末端テールの全部の欠失を含む、請求項 5 又は 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記バリエントが、配列番号 2 で定義される酵素に対して少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドがベクターに含まれる、請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】

前記ベクターが宿主細胞に含まれる、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

更に薬学的に許容される担体を含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

前記医薬組成物が非経口投与用に製剤化されている、請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記対象が、

慢性または急性炎症性障害を有するか；

急性または慢性感染症を有するか；或いは、

N E T を含む血管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記対象が、慢性好中球増加症、好中球凝集又は白血球停滞；血栓症又は血管閉塞；腸軸捻転、精巣捻転、四肢虚血再灌流、重要臓器虚血再灌流及び臓器移植から選択される虚血再灌流障害；外科的又は外傷性組織損傷、急性または慢性炎症反応または疾患；全身性エリテマトーデス（S L E）、ループス腎炎、関節リウマチ、血管炎、及び全身性硬化症から選択される自己免疫疾患；心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、及び血栓溶解療法を含む静脈血栓塞栓症から選択される心血管疾患；代謝性疾患；全身性炎症反応症候群（S I R S）、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群（D I C）、及び血栓性微小血管障害（T M A）から選択される全身性炎症；嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、急性肺損傷（A L I）、喫煙性肺損傷、輸血関連急性肺損傷（T R A L I）、急性呼吸促迫症候群（A R D S）、喘息、無気肺、気管支炎、及び膿胸から選択される気道の炎症性疾患；急性腎障害（A K I）及び慢性腎疾患（C K D）を含む急性及び慢性腎疾患から選択される腎炎症性疾患；移植組織に関連する炎症性疾患；或いは白血病、腫瘍転移、及び固形腫瘍から選択される癌を有する、請求項 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記対象が、管系における管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、請求項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記対象が、D 1 L 3 の欠損、又は D 1 と D 1 L 3 の欠損を特徴とする疾患または病態に罹患しており、任意に、前記対象は、D n a s e 1 及び／または D n a s e 1 l 3 遺伝子に変異を有し、任意に前記対象は、D 1 及び／または D 1 L 3 の後天性の阻害剤を有し、任意に前記対象は、自己免疫疾患又は炎症性疾患を有する、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか

10

20

30

40

50

に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記対象が、全身性エリテマトーデス（SLE）を有する、請求項 1～16 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記対象が、ウイルス感染症を有する、請求項 1～16 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記対象が、急性呼吸促進症候群（ARDS）又は急性肺損傷（ALI）を有する、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記対象が、白血病及び固形腫瘍から任意に選択される癌を有する、請求項 1～15 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記対象が、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、脾炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷、胸水滲出、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、又は閉塞性肺疾患を有する、請求項 1～12 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記対象が、脳卒中を患っているかそのリスクを有する、請求項 14 又は 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記対象が、ドライアイ疾患を患っているかそのリスクを有する、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2017 年 12 月 28 日に出願された米国出願第 62 / 611, 166 号及び 2017 年 8 月 18 日に出願された米国出願第 62 / 547, 220 号の利益及び優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

炎症は、侵入してくる微生物を制御し、損傷した組織を治癒するために不可欠な宿主反応である。制御されない持続的な炎症は、過剰な炎症性疾患で組織損傷を引き起こす。好中球は、急性炎症の主要な白血球である。感染中、好中球は、好中球細胞外トラップ（NET）、毒性ヒストンで装飾された DNA フィラメントの格子、及び細菌を固定化して中和する酵素を生成する。宿主保護における NET の関連性は、細胞外 DNase がいくつかの病原菌の毒性因子として機能するという事実によって示されている。しかしながら、不適切に放出された NET は、細胞毒性、炎症誘発性、及び血栓形成活性のために、宿主細胞に害を及ぼし得る。実際、NET は、炎症性または虚血性の臓器損傷に頻繁に関連しており、DNase の治療的注入は様々な動物モデルにおいて宿主の損傷を制限している。

【0003】

他の白血球、すなわち単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、及びマスト細胞も ET を放出することから、細胞外トラップ（ET）形成は好中球に限定されるものではない。さらに、急性前骨髄球性白血病（APL）細胞を含むがん細胞、及び損傷した内皮細胞

10

20

30

40

50

は、E T様の特徴を有するDNAフィラメントを露出させ得る。

【0004】

炎症のエピソード中の組織損傷を制限するために、宿主がどのように*in vivo*でNETを分解するかはよくわかっていない。血清中のDNase 1 (D1)は、NETのDNAバックボーンを*in vitro*で消化することが示されている。循環中のDNase 1様3 (D1L3)など、細胞外微粒子関連クロマチンを消化することができる他の細胞外DNaseが同定されている。

【0005】

D1及びD1L3は、DNase 1様1 (D1L1)及びDNase 1様2 (D1L2)とともに、DNase 1タンパク質ファミリー、すなわち、ヒトにおいて発現し、NET関連疾患の薬物候補となる、相同的な分泌性DNase酵素の一群、を形成する。しかしながら、これらの酵素の物理的、酵素的、薬物動態学的特性は、治療には理想的ではない。

10

【0006】

本発明は、急性炎症性エピソード中のNETの放出に起因し得る血管閉塞を予防するかまたは治療することを含む療法のための、DNase 1様3及びDNase 1を含む改変型DNaseを提供する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、好中球細胞外トラップ (NET) の蓄積及び／または放出を特徴とする病態の治療に有用な改変型DNaseタンパク質 (DNase 1様3及びDNase 1を含む) を提供する。いくつかの態様では、本発明は、NETが関与する血管閉塞を予防または治療するための組成物及び方法を提供する。本明細書中に示すように、NETは、血管閉塞の非標準的なメカニズムに関与しており、フィブリン及び血小板に非依存的である。

20

【0008】

いくつかの態様では、本発明は、例えば対象におけるNET蓄積を低減または予防するための治療により適した物理的、薬力学的、及び／または酵素的特性を有するように改変したDNase 1様3 (D1L3) バリエントを提供する。いくつかの実施形態では、D1L3酵素は製造上の利点を有し、治療用途に適した組換え酵素の産生を提供する。様々な実施形態において、本発明は、1つ以上のグリコシル化、核局在化シグナルの不活性化、及び／またはC末端テールの全体もしくは一部の欠失をもたらす1つ以上のアミノ酸変化を有する組換えD1L3バリエントを提供する。

30

【0009】

様々な実施形態において、D1L3タンパク質バリエントは、野生型D1L3タンパク質に比べて、タンパク質安定性の増加、プロテアーゼによる阻害に対する耐性の増加、バイオアベイラビリティの増加、及び実質的に同じまたはより良好なDNA及び／またはクロマチン及び／またはNET分解活性 (*in vitro*または*in vivo*での) を有する。様々な実施形態において、D1L3バリエントは、野生型D1L3 (例えば、配列番号2) に比べて以下の特性の1つ以上を含む：同等または実質的に同等の (またはより高い) タンパク質フリーDNA (裸のDNA) 分解活性、同等または実質的に同等の (またはより高い) 染色体DNA (クロマチン) 分解活性、プロテアーゼ耐性、循環半減期の増加、及び*in vitro*発現系 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞及び／または*Pichia pastoris*) でのより高い産生レベル。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエントは、本明細書中でビルディングブロック置換として記載する、ヒトDNase 1 (配列番号1) からの1つ以上のブロック置換を含む。

【0011】

いくつかの態様では、本発明は、例えば対象におけるNET蓄積を低減または予防するための療法により適した物理的、薬力学的、及び／または酵素的特性を有するように改変

50

したDNase 1 (D 1) バリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、D 1 酵素は製造上の利点を有し、治療用途に適した組換え酵素の産生を提供する。様々な実施形態において、改変型D 1 バリエーションは、配列番号 1 のアミノ酸配列の成熟酵素に対して少なくとも 80% 同一であり、変異型DNA 結合部位、変異型クロマチン結合部位、変異型アクチン結合部位、変異型グリコシル化部位、核局在シグナルの付加（例えば、D 1 L 3 のNLS 1 またはNLS 2 との類似性または同一性）、及び／またはD 1 L 3 のC 末端テールと同様または同一のC 末端ドメインのうちの 1 つ以上をもたらし 1 つ以上のアミノ酸置換、付加（挿入を含む）、または欠失を含むアミノ酸配列を有する。

【0012】

様々な実施形態において、D 1 バリエーションを、野生型酵素に関連する以下の特徴のうちの 1 つ以上を含むように改変する：同等またはより高いタンパク質フリーDNA（裸のDNA）分解活性、より高い染色体DNA（クロマチン）分解活性、同様または向上したプロテアーゼ耐性、アクチン耐性、血液から尿及び／または胆汁への同様または向上した浸透、及び *in vitro* 発現系（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞及び／または *Pichia pastoris*）におけるより高い産生レベル。

【0013】

本明細書に記載のD 1 バリエーションは、カチオン性残基の付加を含む点変異の組み合わせを有していてもよく、及び／またはD 1 L 3（配列番号 2）からの 1 つ以上のブロック置換を含んでいてもよい。そのようなブロック置換は、本明細書に記載され、「ビルディングブロック置換」と呼ばれる。

【0014】

いくつかの態様では、本発明は、D 1 L 3 及び／またはD 1 バリエーション、またはそれをコードするポリヌクレオチドもしくはベクター、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。様々な実施形態において、組成物を、非経口投与または肺投与用に製剤化する。いくつかの実施形態では、組成物を、静脈内、動脈内、腹腔内、関節内、筋肉内、局所、または皮下投与用に製剤化する。いくつかの実施形態では、組成物は、それぞれ場合により本明細書に記載する改変型バリエーションであるD 1 L 3 及びD 1 の両方を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、D 1 及びD 1 L 3 の両方に由来するブロック配列を含むキメラタンパク質を含む。D 1 とD 1 L 3 との間の例示的なブロック置換を図 31 に示す。

【0015】

さらに他の態様では、本発明は、キメラ配列を生成することによる、DNase 酵素改変のためのプロセスを提供する。例えば、これらの態様において、本方法は、ドナー及びレシピエントDNase 酵素のタンパク質-タンパク質アライメントを提供し；転移のための可変アミノ酸配列（「ビルディングブロック」）を同定することを含む。1 つまたは複数の可変アミノ酸は、ドナー及びレシピエントDNase 酵素の 1 つ以上の保存アミノ酸に隣接している（ビルディングブロックの上流及び下流）。これらのビルディングブロックを、レシピエントタンパク質とドナータンパク質の間で交換することができる。次いで、キメラ酵素を組換え産生する。

【0016】

さらに他の態様では、本発明は、好中球細胞外トラップ（NET）の蓄積を低減または予防するための医薬組成物の製造方法を提供する。これらの実施形態では、本発明は、D 1 及びD 1 L 3 活性、ならびにG-C-S-Fポリヌクレオチドの異種発現（例えば、肝細胞内の）、または持続的な内在性G-C-S-F発現の誘導（例えば、微生物化合物の反復投与による）を欠損した遺伝子改変型マウスを使用する。このマウスモデルはNETを蓄積し、NET関連性の血管閉塞を急速に発症する。これらの実施形態では、本発明は、候補NET阻害剤または候補DNase 酵素（本開示によるD 1 L 3 またはD 1 バリエーションを含む）を遺伝子改変型マウスに投与し、NETの蓄積を減少させるNET阻害剤またはDNase 酵素を選択することを含む。選択した阻害剤または酵素を、ヒト患者への投与用に製剤化する。

【0017】

いくつかの態様では、本発明は、好中球細胞外トラップ（NET）分解を必要とする対象の治療方法を提供する。方法は、本開示による治療有効量のD1L3及び／またはD1、及び／またはそのバリエーションを投与することを含む。D1L3またはD1バリエーションは、組換えタンパク質、またはいくつかの実施形態ではコードするDNAもしくはRNA、またはいくつかの実施形態ではそれを含むベクターを含む医薬組成物として投与してもよい。

【0018】

様々な実施形態において、本発明は、NETの存在または蓄積を特徴とする疾患または病態の治療に関する。そのような疾患または病態として、慢性好中球増加症（例えば、好中球数の増加）、好中球凝集及び白血球停滞、血栓症及び血管閉塞（例えば、鎌状赤血球症）、虚血再灌流障害（例えば、腸軸捻転、精巣捻転、四肢虚血再灌流、重要臓器虚血再灌流、臓器移植）、外科的及び外傷性組織損傷、急性または慢性炎症反応または疾患、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、関節リウマチ、血管炎、全身性硬化症）、心血管疾患（例えば、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血栓溶解療法を含む静脈血栓塞栓症）、代謝性疾患（例えば、糖尿病）、全身性炎症（例えば、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群（DIC）、及び血栓性微小血管障害（TMA））、気道の炎症性疾患（例えば、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、急性肺損傷（ALI）、喫煙性肺損傷、輸血関連急性肺損傷（TRALI）、急性呼吸促迫症候群（ARDS）、及び喘息、無気肺、気管支炎、膿胸）、腎炎症性疾患（急性腎障害（AKI）及び慢性腎疾患（CKD）を含む急性及び慢性腎疾患、移植組織に関連する炎症性疾患（例えば、移植片対宿主病）ならびにがん（例えば、白血病、腫瘍転移、及び固形腫瘍）に関連する疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

いくつかの実施形態では、対象は、管系における管閉塞を有するか、またはそのリスクがある。管系または管系を含む器官または組織の非限定的な例として、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、脾臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓が挙げられる。したがって、本発明は、脾炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有する対象の治療に有用である。

【0020】

他の実施形態では、対象は、内皮表面（例えば、術後癒着）、皮膚（例えば、創傷／瘢痕、潰瘍）、または滑膜関節（例えば、痛風、関節炎）に蓄積するNETを有するか、またはそのリスクがある。例えば、NETは、例えば侵襲的な医療処置後の術後癒着に寄与する。本発明を手術中に投与して、術後癒着の形成を予防または抑制することができる。いくつかの場合では、本明細書中で概説するD1、D1L3（そのバリエーションを含む）、またはD1とD1L3の組み合わせ（もしくはそのバリエーション）を皮膚に局所投与して、創傷及び／または瘢痕を予防または治療することができる。他の例では、本明細書中で概説するD1、D1L3、もしくはバリエーション、またはそれらの組み合わせを滑膜関節に投与して、痛風及び関節炎を予防または治療することができる。

【0021】

いくつかの実施形態では、対象は、NETを含む血管閉塞を有するか、またはそのリスクがある。

【0022】

様々な実施形態において、本発明は、D1及びストレプトドルナーゼを含むDNase酵素で治療可能な疾患の治療に関する。そのような疾患または病態として、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、脾炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷、胸水滲出

、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、及び閉塞性肺疾患が挙げられる。

【0023】

さらに他の実施形態では、本発明は、*Pichia pastoris*などの非哺乳類発現系を使用した、D1もしくはD1L3、またはそのバリエーションの組換え産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、*Pichia pastoris*は、宿主細胞からの分泌を可能にする天然のシグナルペプチドを有するDNase酵素をコードする。

10

【0024】

本発明の他の目的、実施形態及び利点は、以下の詳細な説明において明らかである。

項1

配列番号2により定義される酵素に対して少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号2と比較して：変異DNA結合部位または変異クロマチン結合部位、グリコシル化部位、核局在化シグナルの不活性化、及びC末端テールの全部または一部の欠失から選択される1つ以上の改変を有するDNase1様3（D1L3）バリエーション。

項2

前記D1L3タンパク質バリエーションが、配列番号2の野生型D1L3タンパク質に比べて、タンパク質安定性の増大、プロテアーゼ耐性の増大、バイオアベイラビリティの増大、循環中の半減期の増大、in vitro発現系でのより高い産生レベル、及び／または実質的に同等またはより良好なDNA及び／またはクロマチン及び／またはNET分解活性を有する、項1に記載のD1L3バリエーション。

20

項3

前記バリエーションを、タンパク質または担体部分に融合または結合させる、項1に記載のD1L3バリエーション。

項4

前記バリエーションが、NX（T/S）の1つ以上のグリコシル化コンセンサス配列を含む、項1に記載のD1L3バリエーション。

30

項5

前記グリコシル化コンセンサス配列が、配列番号2の対応するアミノ酸位置に対して、D38N置換及びN40TまたはN40S置換、及び／またはA127N置換及びV129TまたはV129S置換を含有する、項4に記載のD1L3バリエーション。

項6

前記バリエーションが、不活性化核局在化シグナル（NLS）を含む、項1に記載のD1L3バリエーション。

項7

配列番号2のNLS1及び／またはNLS2の全部または一部の欠失によりNLSを不活性化する、項6に記載のD1L3バリエーション。

40

項8

NLS1及び／またはNLS2内のアミノ酸の置換及び／または欠失によりNLSを不活性化する、項6に記載のD1L3バリエーション。

項9

配列番号2のNLS2を欠失させる、項8に記載のD1L3バリエーション。

項10

配列番号33によって定義される前記C末端テールの全部または一部の欠失、及び／または前記C末端テールのアミノ酸の置換を含む、項1に記載のD1L3バリエーション。

項11

前記バリエーションが、DNase1（D1）由来の少なくとも1つのビルディングブロッ

50

ク置換を有する、項1～10のいずれか1項に記載のD1L3バリエーション。

項12

前記バリエーションが：配列番号2の、M1 A20delinsMRGMKLLGALL
ALAAALLQGA VS、M21 S25delinsLKIAA、V28 S30de
linsIQT、E33 S34delinsET、Q36 I45delinsMSN
ATLVSYI、K47 K50delinsQILS、C52Y、I54 M58de
linsIALVQ、I60 K61delinsVR、S63 I70delinsS
HLTAVGK、M72 K74delinsLDN、R77 T84delinsQD
APDT、N86H、V88 I89delinsVV、S91 R92delinsE
P、N96 T97delinsNS、Q101R、A103L、L105V、K107
L110delinsRPDQ、V113 S116delinsAVDS、H118
Y、H120D、Y122 A127delinsGCEPCGN、V129T、S13
1N、135F 136VdelinsAI、W138R、Q140 H143deli
nsFSRF、A145 D148delinsAVKD、V150A、I152A、T
156 T157delinsAA、E159 S161delinsGDA、K163
A、E167A、V169 E170delinsYD、T173L、K176 R17
8delinsQEK、K180 A181delinsGL、N183 F186de
linsDVML、P198 A201delinsRPSQ、K203 N204de
linsSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q22
0 E221delinsSA、V225 S228delinsATP、N230H、
L238 R239delinsVA、Q241 S246delinsMLLRGA、
K250D、N252 V254delinsALP、D256N、K259 A260
delinsAA、K262G、T264 E267delinsSDQL、L269
V271delinsQAI、F275Y、F279 K280delinsVM、及び
Q282 S305delinsKから選択される1つ以上のビルディングブロック置換
を有する、項11に記載のD1L3バリエーション。

10

20

項13

配列番号2に関して、以下のアミノ酸改変：F275Y／F279 K280deli
nsVM／Q282 S305delinsKを含む、項11に記載のD1L3バリアン
ト。

30

項14

配列番号2に関して、以下のアミノ酸改変：Q36 I45delinsMSNATL
VSYIを含む、項11に記載のD1L3バリエーション。

項15

配列番号2に関して、以下のアミノ酸改変：Y122 A127delinsGCEP
CGN／V129T／S131Nを含む、項11に記載のD1L3バリエーション。

項16

配列番号2に関して、F275Y／F279 K280delinsVM／Q282
S305delinsK、Q36 I45delinsMSNATLVSYI、及びY1
22 A127delinsGCEPCGN／V129T／S131Nから選択される2
つまたは3つの改変を含む、項11に記載のD1L3バリエーション。

40

項17

配列番号2のアミノ酸配列の酵素に対して少なくとも80％同一のアミノ酸配列を含み
、ヒトDNase1由来の少なくとも1つのビルディングブロック置換を含む、DNase
酵素。

項18

前記酵素が、ビルディングブロック置換F275Y／F279 K280delins
VM／Q282 S305delinsKを含み、場合により配列番号17のアミノ酸配
列を含む、項17に記載のDNase酵素。

項19

50

前記酵素が、配列番号2に関して、以下の改変：Q36 I45delinsMSNA TLVSYI/Y122 A127delinsGCEPCGN/V129T/S131Nを含み、及び場合により配列番号19または配列番号20のアミノ酸配列を有する、項17に記載のDNase酵素。

項20

配列番号2の酵素に対して少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含むDNase酵素であって、前記酵素が、配列番号2の38位及び／または127位に対応する位置にアスパラギンの置換を有し、前記N38及び／またはN127のアスパラギンがグリコシル化されている、前記DNase酵素。

項21

項1～20のいずれか1項に記載のD1L3バリエントをコードする単離されたポリヌクレオチド。

項22

項21に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

項23

項22に記載のベクターを含む宿主細胞。

項24

項1～20のいずれか1項に記載のD1L3バリエント、項21に記載のポリヌクレオチド、または項22に記載のベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

項25

局所、非経口、または肺投与用に製剤化したD1L3バリエントを含む、項24に記載の医薬組成物。

項26

皮内、筋肉内、腹腔内、関節内、静脈内、皮下、動脈内、経口、舌下、肺、または経皮用に製剤化した、項24に記載の医薬組成物。

項27

非哺乳類発現系において産生するD1L3バリエントを含む、項24～26のいずれか1項に記載の医薬組成物。

項28

前記非哺乳類発現系が*Pichia pastoris*である、項24に記載の医薬組成物。

項29

前記*Pichia pastoris*が、配列番号2の野生型ヒトD1L3のシグナルペプチドを含むD1L3バリエントをコードする、項28に記載の医薬組成物。

項30

DNase1タンパク質もしくはそのバリエント、DNase1タンパク質もしくはそのバリエントをコードする単離されたポリヌクレオチド、または前記単離されたポリヌクレオチドを含むベクターをさらに含む、項24～29のいずれか1項に記載の医薬組成物。

項31

D1L3バリエント及びDNase1タンパク質またはそのバリエントを、100:1～1:100の比(m/m)で含む、項30に記載の医薬組成物。

項32

前記比が10:1～1:10であり、場合により約1:1である、項31に記載の医薬組成物。

項33

配列番号1の酵素に対して少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、配列番号1に関して：1つ以上の変異DNA結合部位または変異クロマチン結合部位、変異アクチン結合部位、変異グリコシル化部位、核局在化シグナルの付加、配列番号2の野生型D1L3型タンパク質のC末端テールに少なくとも50%の配列同一性を有するC末端テールの付加；及び／または半減期延長部分へのN末端またはC末端融合から選択される1つ以上の

10

20

30

40

50

改変、を有するDNase1(D1)バリエント。

項34

配列番号1において、1M S22delinsMSRELAPLLLLLLLSIHS
ALA、L23 A27delinsMRIICS、I30 T32delinsVRS、
E35 T36delinsES、M38 I47delinsQEDKNAMDVI、
Q49 S52delinsKVIK、Y54C、I56 Q60delinsIILV
M、V62 R63delinsIK、S65 K72delinsSNNRICPI、
L74 N76delinsMEK、Q79 T84delinsRNSRRGIT、H
86N、V88 V89delinsVI、E91 P92delinsSR、N96
S97delinsNT、R101Q、L103A、V105L、R107 Q110d
elinsKEKL、A113 S116delinsVKRS、Y118H、D120
H、G122 N128delinsYQDGD A、T130S、N132S、A136
I137delinsFV、R139W、F141 F144delinsQSPH、
E146 E149delinsAVKD、A151V、V153I、A157 A15
8delinsTT、G160 A162delinsETS、A164K、A168E
、Y170 D171delinsVE、L174T、Q177 K179delins
KHR、G181 L182delinsKA、D184 L187delinsNFI
F、R199 Q202delinsPKKA、S204 S205delinsKN、
W209R、S211D、T213R、Q215V、P219G、S221 A222d
elinsQE、A226 P228delinsVKKS、H230N、V238 A
239delinsLR、M241 A246delinsQEIVSS、D250K、
A252 P254delinsNSV、N256D、A259 A260delins
KA、G262K、S264 L267delinsTEEE、Q269 I271de
linsLDV、Y275F、V279 M280delinsFK、及びK282de
linsQSSRAFTNSKKSVTLRKKT KSKRSから選択される1つ以上の
ビルディングブロック置換を含む、項33に記載のD1バリエント。

10

20

項35

配列番号1に関して以下の改変：Q79 T84delinsRNSRRGITを含む
、項34に記載のD1バリエント。

項36

配列番号1に関して以下の改変：H86N/V88 V89delinsVI/E91
P92delinsSRを含む、項34に記載のD1バリエント。

30

項37

配列番号1に関して以下の改変：A136 I137delinsFVを含む、項34
に記載のD1バリエント。

項38

配列番号1に関して以下の改変：
R199 Q202delinsPKKA/S204 S205delinsKN/W2
09R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221 A222del
insQEを含む、項34に記載のD1バリエント。

40

項39

配列番号1に関して以下の改変：A226 P228delinsVKKSを含む、項
34に記載のD1バリエント。

項40

配列番号1に関して以下の改変：
Y275F/V279 M280delinsFK/K282delinsQSSRAF
TNSKKSVTLRKKT KSKRSを含む、項34に記載のD1バリエント。

項41

配列番号1の酵素に対して少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、1つ以上のアル
ギニン及び/またはリジン残基の置換、挿入、または付加を含むDNase酵素であっ

50

て、前記D N a s e酵素が、配列番号1の酵素に比べてクロマチン分解活性が増加している、前記D N a s e酵素。

項42

前記1つ以上のアルギニン及び／またはリジン残基が、配列番号1の、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、及び280の位置に対応する位置における置換から選択されるアミノ酸置換である、項41に記載のD N a s e酵素。

項43

2つ以上のアルギニン及び／またはリジン残基の置換及び／または挿入を含む、項41に記載のD N a s e酵素。

10

項44

3つ以上のアルギニン及び／またはリジン残基の置換及び／または挿入を含む、項43に記載のD N a s e酵素。

項45

配列番号1の31、49、76、92、109、164、177、201、204、及び213位に対応する1つ以上の位置にアルギニンまたはリジンを含む、項41～44のいずれか1項に記載のD N a s e酵素。

項46

配列番号1の31、49、79、及び209位に対応する位置にアルギニンまたはリジンを含む、項41に記載のD N a s e酵素。

20

項47

配列番号1の31、49、79、177、209、262位に対応する位置にアルギニンまたはリジンを含む、項41に記載のD N a s e酵素。

項48

配列番号1の31及び227位に対応する位置にリジンまたはアルギニン残基を含む、項41に記載のD N a s e酵素。

項49

前記酵素が、配列番号1の164位に対応する位置にリジンまたはアルギニンを有する、項41に記載のD N a s e酵素。

30

項50

配列番号1に関して136位にアミノ酸置換を含み、場合によりそれがA136Fである、項41～49のいずれか1項に記載のD N a s e酵素。

項51

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、及びK280Mから選択される1つ以上のアミノ酸改変を含み、場合によりアクチン耐性をもたらす改変を有する、項42に記載のD N a s e酵素であって、前記アクチン耐性をもたらす改変が、場合により、配列番号1に関してA136Fである、前記D N a s e酵素。

40

項52

酵素が、Q31RまたはT227Kの置換を含む場合、前記酵素が、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、及びK280Mから選択される少なくとも2つのアミノ酸改変を含む、項42に記載のD N a s e酵素。

50

項 5 3

配列番号 1 に関してアミノ酸置換 Q 3 1 R 及び T 2 2 7 K を含む、項 5 2 に記載の D N a s e 酵素。

項 5 4

配列番号 1 に関してアミノ酸置換 A 1 6 4 K を含む、項 5 1 記載の D N a s e 酵素。

項 5 5

Q 3 1 R、Q 4 9 K、N 7 6 K、Q 7 9 R、P 9 2 R、D 1 0 9 K、A 1 6 4 K、Q 1 7 7 K、P 2 0 0 K、S 2 0 1 K、S 2 0 4 R、T 2 1 3 R、及び G 2 6 2 K から選択される 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、項 4 5 に記載の D N a s e 酵素。

項 5 6

以下のアミノ酸置換：Q 3 1 R、Q 4 9 K、Q 7 9 R、A 1 6 4 K、及び W 2 0 9 R を含む、項 5 5 に記載の D N a s e 酵素。

項 5 7

以下のアミノ酸置換：Q 3 1 R、Q 4 9 K、Q 7 9 R、A 1 3 6 F、Q 1 7 7 K、W 2 0 9 R、G 2 6 2 K を含む、項 5 5 に記載の D N a s e 酵素。

項 5 8

以下のアミノ酸置換：Q 3 1 R、T 2 2 7 K、及び A 1 3 6 F を含む、項 4 8 に記載の D N a s e 酵素。

項 5 9

以下のアミノ酸置換：A 1 6 4 K 及び A 1 3 6 F を含む、項 4 9 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 0

前記酵素が、配列番号 1 に関して N 4 0 S 置換及び／または N 1 2 8 S 置換を含むグリコシル化コンセンサス配列を含む、項 4 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の D N a s e 酵素。

項 6 1

配列番号 1 に関して、アミノ酸置換 Q 3 1 R、N 4 0 S、A 1 3 6 F、N 1 2 8 S、及び T 2 2 7 K を含む、項 6 0 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 2

前記酵素が、配列番号 1 の酵素に対して少なくとも 9 0 % 同一であるか、または配列番号 1 の酵素に対して少なくとも約 9 5 % 同一であるか、または配列番号 1 の酵素に対して少なくとも約 9 7 % 同一である、項 4 1 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載の D N a s e 酵素。

項 6 3

配列番号 1 の酵素に対して少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、配列番号 2 のアミノ酸配列由来の少なくとも 1 つのビルディングブロック置換を含む D N a s e 酵素であって、前記 D N a s e 酵素が、配列番号 1 の D N a s e 酵素に比べてクロマチン分解活性が増加している、前記 D N a s e 酵素。

項 6 4

前記酵素が、配列番号 2 由来の少なくとも 2 つの隣接するビルディングブロック置換を含む、項 6 3 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 5

前記酵素が、ビルディングブロック置換 Q 7 9 T 8 4 d e l i n s R N S R R G I T を含み、場合により配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む、項 6 3 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 6

前記酵素が、ビルディングブロック置換 H 8 6 N V 8 8 V 8 9 d e l i n s V I E 9 1 P 9 2 d e l i n s S R を含み、場合により配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む、項 6 4 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 7

前記酵素が、ビルディングブロック置換 A 1 3 6 I 1 3 7 d e l i n s F V を含み、場合により配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む、項 6 3 に記載の D N a s e 酵素。

項 6 8

10

20

30

40

50

前記酵素が、ビルディングブロック置換 R199 Q202 del ins PKKA / S204 S205 del ins KN / W209R / S211D / T213R / Q215V / P219G / S221 A222 del ins QE を含む、場合により配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、項 64 に記載の DNase 酵素。

項 69

前記酵素が、ビルディングブロック置換 A226 P228 del ins VKKS を含む、場合により配列番号 14 のアミノ酸配列を含む、項 63 に記載の DNase 酵素。

項 70

ビルディングブロック置換 Q79 T84 del ins RNSRRGIT, H86N / V88 V89 del ins VI / E91 P92 del ins SR, A136 I137 del ins FV, R199 Q202 del ins PKKA / S204 S205 del ins KN / W209R / S211D / T213R / Q215V / P219G / S221 A222 del ins QE, A226 P228 del ins VKKS を含む、場合により配列番号 15 のアミノ酸配列を含む、項 63 に記載の DNase 酵素。

10

項 71

ビルディングブロック置換 Y275F / V279 M280 del ins FK / K282 del ins QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS を含む、項 41 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の DNase 酵素。

項 72

前記酵素が：配列番号 1 の酵素と比較してタンパク質フリー DNA に対する同様またはより高い親和性、配列番号 1 の酵素と比較してより高いクロマチン分解活性、配列番号 1 の酵素と比較してアクチンによる阻害に耐性のある酵素活性、及びそれらの組み合わせから選択される 1 つ以上の特性を示す、項 41 ~ 71 のいずれか 1 項に記載の DNase 酵素。

20

項 73

配列番号 15 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む DNase 酵素。

項 74

項 41 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の DNase 酵素をコードする単離されたポリヌクレオチド。

項 75

項 74 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

30

項 76

項 75 に記載のベクターを含む宿主細胞。

項 77

項 41 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の酵素、項 74 に記載の単離されたポリヌクレオチド、または項 75 に記載のベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

項 78

非経口または肺投与用に製剤化した DNase 酵素を含む、項 77 に記載の医薬組成物。

項 79

皮内、筋肉内、腹腔内、関節内、静脈内、皮下、動脈内、経口、舌下、肺、局所、または経皮投与用に製剤化した、項 77 に記載の医薬組成物。

40

項 80

前記酵素を、チャイニーズハムスター卵巣細胞において産生する、項 77 に記載の医薬組成物。

項 81

前記酵素がグリコシル化されておらず、前記酵素を非哺乳類発現系で産生する、項 77 に記載の医薬組成物。

項 82

前記非哺乳類発現系が、*Pichia pastoris* である、項 81 に記載の医薬組成物。

50

項 8 3

前記 *Pichia pastoris* が、配列番号 1 のシグナルペプチドとともに酵素をコードする、項 8 2 に記載の医薬組成物。

項 8 4

D N a s e 1 様 3 タンパク質 (D 1 L 3) またはそのバリエーションをさらに含む、項 7 7 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

項 8 5

細胞外 DNA 分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ (E T) 分解及び／または好中球細胞外トラップ (N E T) 分解を必要とする対象の治療方法であって、前記方法が、項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の治療有効量の D 1 L 3 バリエーション、または項 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の D N a s e 酵素、または項 2 4 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組成物、または項 3 3 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の D 1 バリエーション、または項 4 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の D N a s e 酵素、または項 7 7 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与することを含む、前記治療方法。

10

項 8 6

治療に際して、前記対象が、細胞外 DNA 分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ (E T) 分解及び／または好中球細胞外トラップ (N E T) 分解を示す、項 8 5 に記載の方法。

項 8 7

前記対象が、慢性または急性炎症性障害を有する、項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

20

項 8 8

前記対象が、急性または慢性感染症を有する、項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

項 8 9

対象が、N E T を含む血管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、項 8 5 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 9 0

前記対象が、慢性好中球増加症（例えば、好中球数の増加）、好中球凝集及び白血球停滞、血栓症及び血管閉塞（例えば、鎌状赤血球症）、虚血再灌流障害（例えば、腸軸捻転、精巣捻転、四肢虚血再灌流、重要臓器虚血再灌流、臓器移植）、外科的及び外傷性組織損傷、急性または慢性炎症反応または疾患、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス (S L E)、ループス腎炎、関節リウマチ、血管炎、全身性硬化症）、心血管疾患（例えば、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血栓溶解療法を含む静脈血栓塞栓症）、代謝性疾患（例えば、糖尿病）、全身性炎症（例えば、全身性炎症反応症候群 (S I R S)、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群 (D I C)、及び血栓性微小血管障害 (T M A)）、気道の炎症性疾患（例えば、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、急性肺損傷 (A L I)、喫煙性肺損傷、輸血関連急性肺損傷 (T R A L I)、急性呼吸促進症候群 (A R D S)、及び喘息、無気肺、気管支炎、膿胸）、腎炎症性疾患（急性腎障害 (A K I) 及び慢性腎疾患 (C K D)）を含む急性及び慢性腎疾患、移植組織に関連する炎症性疾患（例えば、移植片対宿主病）ならびにがん（例えば、白血病、腫瘍転移、及び固形腫瘍）を有する、項 8 5 に記載の方法。

30

40

項 9 1

前記タンパク質または組成物を、静脈内、動脈内、関節内、筋肉内、皮下、局所、または肺投与により投与する、項 8 5 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 9 2

前記対象が、管系における管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、項 8 5 に記載の方法。

項 9 3

前記管系が、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、膵臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓である、項 9 2 に記載の方法。

50

項 9 4

前記対象が、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有する、項 9 3 に記載の方法。

項 9 5

前記 D N a s e 酵素を、静脈内、動脈内、または腹腔内投与により投与する、項 9 0 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 9 6

前記対象が、原発性硬化性胆管炎を有する、項 9 5 に記載の方法。

項 9 7

前記対象が、内皮表面（例えば、術後癒着）、皮膚（例えば、創傷／瘢痕、潰瘍）、または滑膜関節（例えば、痛風、関節炎）に蓄積する N E T を有するか、またはそのリスクがある、項 8 5 に記載の方法。

10

項 9 8

前記対象が、侵襲的医療処置を受けたことがあるか、または受けており、術後癒着のリスクがある、項 9 7 に記載の方法。

項 9 9

前記 D N a s e 療法を手術中に投与し、術後癒着の形成を予防または阻害する、項 9 8 に記載の方法。

項 1 0 0

前記 D N a s e 療法を、皮膚に局所的に投与して、創傷及び／または瘢痕を予防または治療する、項 9 7 に記載の方法。

20

項 1 0 1

前記 D N a s e 療法を、滑膜関節に投与して、痛風及び関節炎を予防または治療する、項 9 7 に記載の方法。

項 1 0 2

前記対象が、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、膵炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷、胸水滲出、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、及び閉塞性肺疾患を有する、項 8 5 に記載の方法。

30

項 1 0 3

前記対象が、冠動脈疾患をさらに示す、項 8 5 ～ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 0 4

前記対象が、嚢胞性線維症を有する、項 1 0 2 に記載の方法。

項 1 0 5

前記対象由来の血液、血漿、または血清の N E T 分解活性をモニタリングすることを含む、項 8 5 ～ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

項 1 0 6

N E T が関与する血管内閉塞を示すか、またはそのリスクがある対象の治療方法であって、前記方法が、治療有効量の D 1 L 3 またはそのバリエント、及び／または治療有効量の D 1 またはそのバリエントを投与することを含む、前記治療方法。

項 1 0 7

前記対象に、配列番号 2 により定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素を投与する、項 1 0 6 に記載の方法。

項 1 0 8

前記酵素が、配列番号 2 により定義される酵素のアミノ酸配列を含む、項 1 0 7 に記載

50

の方法。

項 1 0 9

治療有効量の D 1 L 3 またはそのバリエーション、及び／または治療有効量の D 1 またはそのバリエーションを投与することを含む、管系における管閉塞を有するか、または管閉塞のリスクがある対象の治療方法。

項 1 1 0

前記対象に、配列番号 2 により定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素、及び／または配列番号 1 により定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素を投与する、項 1 0 9 に記載の方法。

項 1 1 1

前記酵素が、配列番号 2 によって定義される酵素のアミノ酸配列を含み、及び／または配列番号 1 によって定義される酵素のアミノ酸配列を含む、項 1 1 0 に記載の方法。

項 1 1 2

前記管系が、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、膵臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓である、項 1 0 9 ～ 1 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 1 3

前記対象が、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有する、項 1 0 9 ～ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 1 4

前記 D N a s e 酵素を、静脈内、動脈内、または腹腔内投与によって投与する、項 1 0 9 ～ 1 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 1 5

前記対象が、原発性硬化性胆管炎を有する、項 1 1 4 に記載の方法。

項 1 1 6

細胞外 D N A 分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ（E T）分解及び／または好中球細胞外トラップ（N E T）分解を必要とする対象の治療方法であって、前記方法が、治療有効量の D 1 L 3 またはそのバリエーション及び D 1 またはそのバリエーションを投与することを含む、前記治療方法。

項 1 1 7

前記 D 1 L 3 またはそのバリエーション、及び前記 D 1 またはそのバリエーションを、単一の医薬組成物または別個の医薬組成物で投与し、D 1 L 3 またはそのバリエーションと D 1 またはそのバリエーションの比が、場合により、質量で 1 0 0 : 1 ～ 1 : 1 0 0、質量で 1 0 : 1 ～ 1 : 1 0 の範囲であり、場合により約 1 : 1 である、項 1 1 6 に記載の方法。

項 1 1 8

治療に際して、前記対象が、細胞外 D N A 分解、細胞外クロマチン分解、細胞外トラップ（E T）分解及び／または好中球細胞外トラップ（N E T）分解を示す、項 1 1 7 に記載の方法。

項 1 1 9

前記対象が、慢性または急性炎症性障害を有する、項 1 1 6 ～ 1 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 2 0

前記対象が、急性または慢性感染症を有する、項 1 1 6 ～ 1 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 2 1

前記対象が、N E T を含む血管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、項 1 1 6 ～ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 2 2

前記対象が、慢性好中球増加症（例えば、好中球数の増加）、慢性好中球増加症（例えば、好中球数の増加）、好中球凝集及び白血球停滞、血栓症及び血管閉塞（例えば、鎌状

10

20

30

40

50

赤血球症)、虚血再灌流障害(例えば、腸軸捻転、精巣捻転、四肢虚血再灌流、重要臓器虚血再灌流、臓器移植)、外科的及び外傷性組織損傷、急性または慢性炎症反応または疾患、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、関節リウマチ、血管炎、全身性硬化症)、心血管疾患(例えば、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血栓溶解療法を含む静脈血栓塞栓症)、代謝性疾患(例えば、糖尿病)、全身性炎症(例えば、全身性炎症反応症候群(SIRS)、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群(DIC)、及び血栓性微小血管障害(TMA))、気道の炎症性疾患(例えば、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、急性肺損傷(ALI)、喫煙性肺損傷、輸血関連急性肺損傷(TRALI)、急性呼吸促迫症候群(ARDS)、及び喘息、無気肺、気管支炎、膿胸)、腎炎症性疾患(急性腎障害(AKI)及び慢性腎疾患(CKD))を含む急性及び慢性腎疾患、移植組織に関連する炎症性疾患(例えば、移植片対宿主病)ならびにがん(例えば、白血病、腫瘍転移、及び固形腫瘍)を有する、項116~117に記載の方法。

10

項123

前記D1L3またはそのバリエーション及び前記D1またはそのバリエーションのそれぞれを、静脈内、動脈内、関節内、筋肉内、皮下、局所、及び肺投与から独立して選択される経路によって投与する、項116~122のいずれか1項に記載の方法。

項124

前記対象が、管系における管閉塞を有するか、またはそのリスクがある、項123に記載の方法。

20

項125

前記管系が、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、膵臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓である、項124に記載の方法。

項126

前記対象が、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有する、項125に記載の方法。

項127

前記DNase酵素を、静脈内、動脈内、または腹腔内投与により投与される単一の組成物として投与する、項124~126のいずれか1項に記載の方法。

30

項128

前記対象が、原発性硬化性胆管炎を有する、項127に記載の方法。

項129

前記対象が、内皮表面、皮膚、または滑膜関節にNETが蓄積するか、蓄積するリスクがある、項116~118のいずれか1項に記載の方法。

項130

前記対象が、侵襲的医療処置を受けたことがあるか、または受けており、術後癒着のリスクがある、項129に記載の方法。

項131

前記DNase療法を手術中に投与し、術後癒着の形成を予防または阻害する、項130に記載の方法。

40

項132

前記DNase療法を皮膚に局所的に投与して、創傷及び／または癒着を予防または治療する、項129に記載の方法。

項133

前記DNase療法を滑膜関節に投与して、痛風及び関節炎を予防または治療する、項129に記載の方法。

項134

前記対象が、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治療、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、

50

肺炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷、胸水滲出、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、及び閉塞性肺疾患を有する、項 1 1 6～1 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 3 5

前記対象が、冠動脈疾患をさらに示す、項 1 1 6～1 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 3 6

前記対象が、嚢胞性線維症を有する、項 1 3 4 に記載の方法。

項 1 3 7

前記対象由来の血液、血漿、または血清の N E T 分解活性をモニタリングすることを含む、項 1 1 6～1 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 3 8

N E T が関与する血管内閉塞を示すか、または血管内閉塞のリスクがある対象の治療方法であって、前記方法が、治療有効量の D 1 L 3 またはそのバリエーション、及び／または治療有効量の D 1 またはそのバリエーションを投与することを含む、前記治療方法。

項 1 3 9

前記対象に、配列番号 2 により定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素を投与する、項 1 3 8 に記載の方法。

項 1 4 0

前記酵素が、配列番号 2 によって定義される酵素のアミノ酸配列を含む、項 1 3 9 に記載の方法。

項 1 4 1

治療有効量の D 1 L 3 またはそのバリエーション、及び／または治療有効量の D 1 またはそのバリエーションを投与することを含む、管系において管閉塞を有するか、または管閉塞のリスクがある対象の治療方法。

項 1 4 2

前記対象に、配列番号 2 によって定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素、及び／または配列番号 1 によって定義される酵素に対して 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素を投与する、項 1 4 1 に記載の方法。

項 1 4 3

前記酵素が、配列番号 2 によって定義される酵素のアミノ酸配列、及び／または配列番号 1 によって定義される酵素のアミノ酸配列を含む、項 1 4 2 に記載の方法。

項 1 4 4

前記管系が、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、脾臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓である、項 1 4 1～1 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 4 5

前記対象が、肺炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有する、項 1 4 1～1 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 4 6

前記 D N a s e 酵素を、静脈内、動脈内、または腹腔内投与により投与する、項 1 4 1～1 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

項 1 4 7

前記対象が、原発性硬化性胆管炎を有する、項 1 4 6 に記載の方法。

項 1 4 8

好中球細胞外トラップ (N E T) の蓄積を低下させるための医薬組成物の作製方法であ

10

20

30

40

50

って：DNase 1 及び DNase 1 様 3 活性が欠損した遺伝子改変マウスを提供し、異種 GCSF ポリヌクレオチドを発現させるか、または微生物化合物で繰り返し刺激し、前記遺伝子改変マウスに NET を蓄積させ；候補 NET 阻害剤または候補 DNase 酵素を投与し；NET の蓄積を低下させる NET 阻害剤または DNase 酵素を選択し；そして、ヒト患者への投与のために NET 阻害剤または DNase 酵素を製剤化することを含む、前記作製方法。

項 1 4 9

前記組成物を、非経口投与または肺投与用に製剤化する、項 1 4 8 に記載の方法。

項 1 5 0

静脈内、動脈内、関節内、筋肉内、皮下、局所、または肺投与用に製剤化する、項 1 4 8 に記載の方法。

項 1 5 1

前記遺伝子改変マウスが、肝細胞において異種 GCSF ポリヌクレオチドを発現する、項 1 4 8 に記載の方法。

項 1 5 2

ヒト D1、ヒト D1L3、またはそのバリエーションから選択される DNase 酵素の組換え産生方法であって：天然シグナルペプチドとともに前記 DNase 酵素をコードする *Pichia pastoris* 宿主細胞を培養し；前記 DNase を培地から回収することを含む、前記組換え産生方法。

項 1 5 3

前記 DNase 酵素が、配列番号 2 の酵素に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するヒト D1L3 またはそのバリエーションである、項 1 5 2 に記載の方法。

項 1 5 4

前記 DNase 酵素がヒト D1L3 である、項 1 5 3 に記載の方法。

項 1 5 5

DNase 酵素改変のための方法であって：

ドナー及びレシピエント DNase 酵素のタンパク質-タンパク質アライメントを提供し；

転移のための可変アミノ酸配列を同定し、その場合、前記可変アミノ酸は前記ドナー及びレシピエント DNase 酵素の 1 つ以上の保存アミノ酸に隣接し；前記レシピエント DNase の前記可変アミノ酸を、前記ドナー DNase の前記可変アミノ酸で置換して、キメラ DNase を作成し；前記キメラ DNase を組換え産生することを含む、前記方法。

項 1 5 6

前記 DNase 酵素が、ヒト D1、配列番号 38 により定義されるヒト DNase 1 様 1 (D1L1)、配列番号 39 により定義されるヒト DNase 1 様 2 (D1L2)、及びヒト D1L3 から選択される、項 1 5 5 に記載の方法。

項 1 5 7

前記ビルディングブロック置換が、少なくとも 2 つのアミノ酸、または少なくとも 3 つのアミノ酸、または少なくとも 4 つのアミノ酸、または少なくとも 5 つのアミノ酸を有する、項 1 5 5 または 1 5 6 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】循環中の DNase 1 及び DNase 1 l3 が *in vitro* で NET を分解することを示すとともに、WT、DNase 1-/- (D1-/-)、DNase 1 l3-/- (D1L3-/-)、DNase 1/DNase 1 l3-/- (D1/D1L3-/-) マウス由来の血清の DNA 分解活性を特徴付けている。図 1A は、ザイモグラフィ-アッセイ DPZ 及び SRED による DNase 1 (D1)、DNase 1 l3 (D1L3)、及び総 DNase 活性の検出を提供する。図 1B は画像を示し、図 1C は、記載する遺伝子型由来の血清の存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成され

10

20

30

40

50

るNETのDNA染色の定量化を示す(N=6)。スケールバー: 50 μ m。図1Dは、DNase1(D1)、DNase1 Δ 3(D1 Δ 3)を含むプラスミド、または対照プラスミド(Ctrl)を安定的に発現するD1/D1 Δ 3-/-マウス由来の血清のDPZ及びSRED分析を示す。図1Eは画像を示し、図1Fは、緩衝液、またはD1、D1 Δ 3、もしくはCtrlを発現するD1/D1 Δ 3-/-マウスの血清の存在下でインキュベートした後に*in vitro*で生成されるNETのDNA染色の定量化を示す(N=5)。スケールバー: 50 μ m。画像は2つ以上の独立した実験の代表例である。統計: (図1C及び図1F) 一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定。他の全群に対して、 $\$P < 0.001$ 。

【図2】慢性好中球増加症に抵抗するためにDNase1またはDNase1 Δ 3が必要であることを示す。G-CSF発現プラスミド(CSF3)の注入により慢性好中球増加症を誘発した。対照には空のプラスミド(Ctrl)を与えた。図2Aは、2週間後のWTマウス及び対照の血中好中球数を示す(N=3~6)。図2Bは、1週間後のWTマウスの血液塗抹のDNA染色におけるNET様構造(矢印)を示す(N=3)。スケールバー: 20 μ m。図2Cは、WT(N=7)、DNase1-/- (D1-/-、N=6)、DNase1 Δ 3-/- (D1 Δ 3-/-、N=6)、DNase1/DNase1 Δ 3-/-マウス(D1/D1 Δ 3-/-、N=6)及び対照(Ctrl、N=4)の生存率を示す。図2Dは、CSF3と、DNase1(CSF3/D1、N=5)、DNase1 Δ 3(CSF3/D1 Δ 3、N=6)、及び対照(CSF3/Ctrl、N=4)とを共発現するD1/D1 Δ 3-/-マウスの生存率を示す。図2E~2Iは、慢性好中球増加症時の死亡率を特徴付けている(N=4)。図2Eは、末梢体温の変化を示す。図2Fは、血漿及び尿の写真を示す。図2Gは、血液中のヘモグロビンの濃度を示す。図2Hは、血液塗抹の画像を示す。矢印は破碎赤血球を指す。スケールバー: 20 μ m。図2Iは、血漿中のLDH濃度を示す。UT: 未処置マウス(N=5~6)。画像は3匹以上のマウスの代表例である。統計: (図2A、2H、2I) 一元配置分散分析及び(図2E) 二元配置分散分析と、その後のボンフェローニの多重比較事後検定、(図2B) スチューデントt検定、(図2C、2D) 対数順位検定; 他の全群またはベースライン(BL)に対して、 $\#P < 0.01$ 、 $\$P < 0.001$ 。

【図3】DNase1及びDNase1 Δ 3が慢性好中球増加症時のNET血餅による血管閉塞を予防することを示す。CSF3と、DNase1(CSF3/D1、N=4)、DNase1 Δ 3(CSF3/D1 Δ 3、N=4)、または対照プラスミド(CSF3/Ctrl、N=4)とを共発現するDNase1/DNase1 Δ 3-/-マウス(D1/D1 Δ 3-/-)の組織学的分析。図3Aは、肺のヘマトキシリン及びエオシン染色(H&E)を示す。スケールバー: 500 μ m(概略)、25 μ m(詳細)。図3Bは、視野(FOV)あたりのヘマトキシリン陽性血餅によって閉塞された肺の血管の定量化を示す。未処置のWTマウス(UTWT、N=4)、未処置のD1/D1 Δ 3-/-マウス(UT; N=4)。図3Cは、好中球マーカーのミエロペルオキシダーゼ(MPO)及びクロマチンに対する閉塞血管の免疫染色を示す。図3D及び3Eは、フォンウィルブランド因子(vWF)、フィブリン、及びDNAの免疫染色を示す。3種類のNET血餅を検出した(α 、vWF+/フィブリン-; β 、vWF+/フィブリン+; γ 、vWF-/フィブリン-)。図3Fは、NET血餅のvWFとフィブリンの定量化を示す。データは平均 $\pm$ SDとして示し、n=108である。図3Gは、IgG(N=4)、抗血小板IgG(N=5)、及びダビガトラン(N=5)で処置した、CSF3を発現するD1/D1 Δ 3-/-マウスの生存率を示す。スケールバー: 50 μ m。画像は3匹以上のマウスの代表例である。(図3C、3D、3E) 点線は血管壁を示す。統計: (図3B) 一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定; 他の全群に対して、 $\$P < 0.001$ 、(図3G) 対数順位検定; IgGに対する抗血小板IgGまたはダビガトランの $P > 0.05$ 。

【図4】敗血症における宿主損傷に対し、DNase1及びDNase1 Δ 3が保護することを示す。WTマウス(N=5)、ならびにDNase1(D1、N=7)、DNase1 Δ 3(D1 Δ 3、N=7)及び対照(Ctrl、N=5)マウスに敗血症を誘発した。図4Aは、敗血症誘発後の生存率を示す。図4Bは、敗血症誘発後の死亡率を示す。図4Cは、敗血症誘発後の末梢体温の変化を示す。図4Dは、敗血症誘発後の血漿及び尿の写真を示す。図4Eは、敗血症誘発後の血液中のヘモグロビンの濃度を示す。図4Fは、敗血症誘発後の血液塗抹の画像を示す。矢印は破碎赤血球を指す。スケールバー: 20 μ m。図4Gは、敗血症誘発後の血漿中のLDH濃度を示す。UT: 未処置マウス(N=5~6)。画像は3匹以上のマウスの代表例である。統計: (図4A、4D、4G) 一元配置分散分析及び(図4B) 二元配置分散分析と、その後のボンフェローニの多重比較事後検定、(図4C) スチューデントt検定、(図4E、4F) 対数順位検定; 他の全群またはベースライン(BL)に対して、 $\#P < 0.01$ 、 $\$P < 0.001$ 。

10

20

30

40

50

e1l3 (D1L3、N=8)、または対照プラスミド (Ctrl、N=11) を発現するDNase1及びDNase1l3 (D1/D1L3-/-) 複合欠損マウスを、リポ多糖及び熱殺菌したE. coliで処置して敗血症を誘発した。図4Aは、敗血症マウスの生存時間を示す。図4Bは、血液中のヘモグロビン濃度を示す。図4Cは、血漿及び尿の写真を示す。図4Dは、血漿中のLDH濃度を示す。図4Eは、視野 (FOV) あたりの血液中の破碎赤血球の定量化を示す。図4Fは、FOVあたりの肺の閉塞血管の定量化を示す。図4Gは、肺のヘマトキシリン及びエオシン染色 (H&E) を示す。矢印は閉塞した血管を指す。スケールバー：500 μ m。図4H及び4Iは、部分的に及び完全に閉塞した血管のH&E染色を示す。矢印は、細胞間空間を覆うNETを指す。挿入図は概略図である。スケールバー：50 μ m。統計：(図4A) 対数順位検定；他の全群に対して、#P<0.01、(図4B~4F) 一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定；§P<0.001、#P<0.01。

10

【図5】慢性好中球増加症のマウスモデルを示す。4週齢のWTマウスにCSF3発現プラスミド (CSF3) または空の対照プラスミド (Ctrl) を注射した。図5Aは、血漿中のG-CSFレベルを示す (N=3~6)。BL：ベースライン、注射前；Ctrl：CSF3を含まない対照プラスミドを2週間発現させたマウス (N=4~5)。図5Bは、肺、腎臓、及び肝臓の好中球エラスターゼの免疫染色を示す。スケールバー：200 μ m。図5Cは、脾臓の写真及び重量を示す (N=5~6)。スケールバー：1 cm。図5Dは、記載する時間におけるマウスの体重を示す (N=3~5)。図5Eは、注射の2週間後のALT、AST、BUN、及びクレアチニンの全血及び血漿レベルにおける好中球数を示す。画像は3匹以上のマウスの代表例である。統計：(図5A、5C) 一元配置分散分析と(図5D)、その後のボンフェローニの多重比較事後検定、及び(図5E) スチューデントt検定；(図5A) BL、または(図5C) UTに対して、#P<0.01、§P<0.001。

20

【図6】慢性好中球増加症時のNET血餅の形成ならびに肝臓及び腎臓の臓器損傷をDNase1及びDNase1l3が予防することを示す。対照プラスミド (CSF3/Ctrl、N=4) のCSF3と、DNase1 (CSF3/D1、N=4)、またはDNase1l3 (CSF3/D1L3、N=4) とを共発現するDNase1/DNase1l3-/-マウス (D1/D1L3-/-) の解析。対照には、未処置のWTマウス (UTWT、N=4) 及び未処置のD1/D1L3-/-マウス (UT；N=4) が含まれる。図6Aは、アラニン及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ALT、AST) の血漿中レベルを示す。図6Bは、血中尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニンの血漿中レベルを示す。図6Cは、切片ごとの肝臓及び視野 (FOV) あたりの腎臓における血管内ヘマトキシリンに富む血餅の定量化を示す。図6Dは、肝臓と腎臓のH&E染色を示す。スケールバー：500 μ m (概略)、50 μ m (詳細)。画像は3匹以上のマウスの代表例である。統計：(図6A、6B、6C) 一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定；他の全群に対して、#P<0.01、§P<0.001。

30

【図7】ヘマトキシリン陽性血餅がNETからなることを示す。図3A~3Gに示す慢性好中球増加症 (D1/D1L3-/-+CSF3/Ctrl) を有するDNase1/DNase1l3-/-マウス (D1/D1L3-/-) 由来の肺の分析。図7Aは、DNA及び連続肺切片のクロマチンに対するヘマトキシリン及びエオシン (H&E) による染色を示す。スケールバー：200 μ m。図7Bは、クロマチン、CRAMP (カテリン関連抗菌ペプチド)、及びDNAの閉塞血管の免疫染色を示す。スケールバー：50 μ m。図7Cは、クロマチン、シトルリン化ヒストン3 (citH3)、及びDNAの閉塞血管の免疫染色を示す。スケールバー：50 μ m。画像は3匹以上のマウスの代表例である。

40

【図8】ヒトNETがin vitroで血餅を形成することを示す。図8Aは、in vitroでPMA活性化ヒト好中球によって生成されたNET血餅 (矢印) の写真を示す。未処置の好中球 (UT) または組換えヒトDNase1 (PMA+D1) の存在下で活性化させた好中球を対照として用いた。スケールバー：5 mm。図8Bは、ヘマトキシリン及びエオシン染色 (H&E) ならびにin vitroで生成されたNET血餅のクロ

50

マチン及び好中球マーカーであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の免疫染色を示す。スケールバー：200 μm 。画像は3つ以上の独立した実験の代表例である。

【図9】NET分解がSTEC-HUSの疾患活性と相関していることを示す。図9Aは画像を示し、図9Bは、緩衝液、正常な健康なドナー由来の血漿 (N=7)、または急性疾患病態 (Acute) 及び寛解 (Rem.) において回収した11名のSTEC-HUS患者の血漿の存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたNETのDNA染色の定量化を示す。スケールバー：50 μm 。統計：一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定；他の全群に対して、 $SP < 0.001$ 。

【図10】剖検報告書 (ARDS、急性呼吸促迫症候群) に示されるように、患者数、死因など、試験した様々な患者由来のヒト組織の分類記載の表を示す。患者の性別及び年齢。分析した組織のタイプ。組織を3段階の手順で分析した：第一に、ヘマトキシリン及びエオシン染色におけるヘマトキシリンに富む血餅／凝集体の同定；第二に、クロマチン及びミエロペルオキシダーゼ (MPO) の免疫染色による、ヘマトキシリンが豊富な血餅におけるNETの同定；第三に、肺構造内のNET血餅の局在の同定。

【図11】ヒトNETが *in situ* で血餅を形成することを示す。敗血症の2名の患者から剖検で採取した肺組織 (図10の患者#6及び#7)。図11Aは、患者#6由来の肺組織における2つのヘマトキシリンに富む血管内血餅のH&E染色を示す。図11Bは、パネルAに示す左の血管のクロマチン及びミエロペルオキシダーゼ (MPO) の連続切片の免疫染色を示す。図11Cは、患者#7由来の肺組織のH&E染色血管を示し、ヘマトキシリンに富む血管内血餅を示す。図11Dは、クロマチン及びMPOの連続切片の免疫染色を示す。矢印はNETの血餅を指し示す。スケールバー：50 μm 。

【図12】敗血症マウスのNET血餅が血管を閉塞させることを示す。敗血症DNase1/DNase1 Δ 3-マウスの完全に閉塞した血管の、DNA、クロマチン、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) に対する免疫染色。NETのDNA及びクロマチン染色 (矢印) は、核染色 (アスタリスク) よりも暗く見え、細胞間スペースを覆っている。スケールバー：10 μm 。

【図13】DNase1とDNase1 Δ 3が別個のメカニズムによってNETを劣化させることを示す。図13Aは、WT、DNase1-/- (D1-/-)、DNase1 Δ 3-/- (D1 Δ 3-/-)、DNase1/DNase1 Δ 3-/-マウス (D1/D1 Δ 3-/-) の血清存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたPFA固定NETのDNA染色を示す。データは3つ以上の独立した実験の代表例である。スケールバー：50 μm 。図13Bは、WT、D1-/-、D1 Δ 3-/-、及びD1/D1 Δ 3-/-マウス由来の血清存在下でのインキュベーション後にPFA固定NETから放出された無細胞DNA断片の濃度を示す。図13Cは、ビヒクル、組換えマウスDNase1 (rmD1)、または組換えマウスDNase1 Δ 3 (rmD1 Δ 3) 存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成された非固定化NETのDNA染色を示す。図13Dは、ビヒクル、rmD1、またはrmD1 Δ 3存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成された非固定化NETから放出された無細胞DNA断片の濃度を示す。図13Eは、ビヒクル、rmD1、またはrmD1 Δ 3存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたPFA固定化NETのDNA染色を示す。図13Fは、ビヒクル、rmD1、またはrmD1 Δ 3存在下でのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたPFA固定化NETから放出された無細胞DNA断片の濃度を示す。一元配置分散分析とその後のボンフェローニの多重比較事後検定による統計； $SP < 0.0001$ 。

【図14】ヒト及びマウスの循環中のDNase1及びDNase1 Δ 3活性を示す。図14A～図14Eは、SREDにより定量化したヒト及びマウス血漿中のDNase活性を示す。図14Aは、ヒトDNase1に対するポリクローナル抗体 (α -hDNase1) を、正常な健康なドナー (NHD) 由来の血漿に添加することにより、濃度依存的にDNA分解活性が遮断されるが、IgGでは遮断されないことを示す (IgGに対して、*： $p < 0.05$)。図14Bは、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の α -hDNase1、及びDNA

10

20

30

40

50

se1l3の阻害剤であるヘパリンを添加した血漿が、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\alpha\text{-hDNase1}$ を添加した血漿中の残留DNase活性を遮断することを示す(NHDに対して*
: $p<0.05$)。図14C~図14Eは、マウス及びNHD由来の血漿の連続希釈におけるDNase活性の比較を示す。図14Cは、WTマウスの総DNase活性がNHDよりもおよそ10倍高いことを示す。図14Dは、DNase1l3-/-マウス由来の血漿中のDNase1活性が、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリンを添加したヒト血漿よりもおよそ10倍高いことを示す。(E DNase1-/-マウスの血漿中のDNase1l3活性は、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\alpha\text{-hDNase1}$ を添加したヒト血漿に比べておよそ10倍高い。(F、G) *in vitro* NET分解を図14F及び図14Gに示す。図14Fは、NHD由来血漿単独または $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\alpha\text{-hDNase1}$ を添加した血漿、TMA患者由来の血漿、ならびにWT、DNase1-/-、及びDKOマウス由来の血漿の存在下でインキュベートした活性化好中球を示す(スケールバー: $200\mu\text{m}$)。図14Gは、記載する供給源由来の血漿の存在下でインキュベートした活性化好中球の上清中の無細胞DNAを示す(NHDに対して、 $\S:p<0.001$)。ヒト血漿中のDNase1l3はNETを分解させるのに十分ではないため、ヒト血漿による*in vitro* NET分解はDNase1に依存する。

【図15】DNase1/DNase1l3-/-マウスの代替系統における慢性好中球増加症の致死経過を示す。DNase1-/-マウスの代替系統(実施例1の方法を参照)をDNase1l3-/-マウスと交雑させて、複合欠損症のマウスを作製した。図15Aは、WT(N=9)、DNase1-/- (D1-/-、N=5)、及びDNase1/DNase1l3-/-マウス(D1/D1l3-/-、N=5)における好中球増加症の生存曲線を示す。CSF3発現プラスミド(CSF3)の注入によって慢性好中球増加症を誘発した。図15Bは、肺切片のヘマトキシリン及びエオシン染色(H&E)を示す。矢印は、D1/D1l3-/-マウスのヘマトキシリン陽性血餅を指し示す。スケールバー: $500\mu\text{m}$ 。図15Cは、CSF3と、対照プラスミド(CSF3/Ctrl、N=6)、DNase1(CSF3/D1、N=5)、またはDNase1l3(CSF3/D1l3、N=6)とを共発現するD1/D1l3-/-マウスの生存率を示す。統計:対数順位検定; $\S P<0.001$ 。

【図16】*in vitro*でDNase1及びDNase1l3の機能亢進性バリエーションを同定するためのスクリーニングアプローチを示す。図16Aは、野生型DNase1l3(I、D1l3)、野生型DNase1(II、D1)、及びそれらのバリエーションを含むDNaseのライブラリーを示す。D1及びD1l3バリエーションは、D1l3からD1(III、D1^V)に、及びD1からD1l3(IV、D1l3^V)にアミノ酸を転移させることによって設計した。DNase活性は、基質として高分子量(HMW)DNA、dsDNA及びクロマチンの分解を用いて試験した。図16Bでは、ザイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す(例えば、D1、 0.0005ng)。D1はdsDNAをD1l3に比べておよそ100倍効率的に分解する。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動(AGE)は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。D1l3はクロマチンをD1に比べておよそ100倍効率的に分解する。10:1または1:1(m/m)の比率では、クロマチンの分解においてD1とD1l3は相乗効果を示す。

【図17】ヒトDNase1(配列番号1)及びヒトDNase1l3(配列番号2)のアミノ酸配列アライメントを示す。シグナルペプチド、保存アミノ酸、D1l3の可変領域における追加のアルギニン及びリジン残基、ならびにD1l3のC末端テールを強調表示する。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。

【図18】DNase1l3のみに存在するアルギニン残基及びリジン残基のリストを示す。DNase1における対応するアミノ酸及びDNase1におけるアミノ酸置換を示す。括弧内の数字は、シグナルペプチドを含まない成熟タンパク質におけるアミノ酸位置

10

20

30

40

50

である。D1L3のC末端テールに位置するアルギニン及びリジン残基を、レーン29～37に示す。本出願では、可能性のある37のDNase1バリエーションのうち22を試験した。

【図19】図18に記載した単一のアルギニン及びリジンアミノ酸置換を有するDNase1バリエーションの特徴付けを示す。ザイモグラフィにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動(AGE)は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。クロマチン分解活性の増加を引き起こすアミノ酸置換を青色で強調表示する。そのような効果を有さないサンプルを水色で示す。

10

【図20】ヒトDNase1(配列番号1)、マウスDNase1(配列番号3)、ラットDNase1(配列番号4)、及びヒトDNase1L3(配列番号2)のアミノ酸配列アライメントを示す。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。シグナルペプチドは、灰色で強調表示する。マウス/ラットDNase1及びヒトDNase1L3には存在するが、ヒトDNase1には存在しないカチオン性アミノ酸残基(アルギニン:R、リジン:K)を強調表示する。マウスDNase1において、そのような4つのR/K残基を示す(Q31R、Q49K、Q79R、W209R)。ラットDNase1には、2つの追加のR/K残基(Q177K、G262K)が含まれる。

【図21】マウスとヒトのDNase1の比較を示す。(図21A)ザイモグラフィにより、dsDNA分解活性を黒丸として示す。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す(例えば、Ctrl)。マウスDNase1(mD1)及びヒトDNase1(D1)は、同様のレベルのdsDNA分解活性を示す。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動(AGE)は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。マウスDNase1(mD1)は、ヒトDNase1(D1)に比べてより高いクロマチン分解活性を示す。(図21B)ヒトDNase1による遺伝子治療は、NETによる致死的な血管閉塞からの部分的な保護のみを提供する。血管内NET形成を併発する慢性好中球増加症を、G-CSFをコードするCs f3の肝発現によって誘発した。データは、Cs f3発現Dnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスの生存曲線を示す。動物に、Cs f3と空の対照ベクター(Ctrl、N=6)、Cs f3とヒトDNase1の混合物(hDnase1、N=12)、及びCs f3とマウスDNase1(mDnase1、N=5)を注射した。対数順位検定を用いてP値を計算した。

20

30

【図22】*in vivo*及び*in vitro*でのげっ歯類様ヒトDNase1バリエーションの特徴付けを示す。(図20A)げっ歯類様DNase1バリエーションによる遺伝子治療は、NETによる致死的な血管閉塞からの完全な保護を提供する。血管内NET形成を併発する慢性好中球増加症を、G-CSFをコードするCs f3の肝発現によって誘発した。データは、Cs f3発現Dnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスの生存曲線を示す。図21に示すように、動物に、Cs f3と空の対照ベクター(Ctrl、N=6)、Cs f3とヒトDNase1の混合物(hDnase1、N=12)を注射した。第3群のDnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスには、Cs f3と、4つのアミノ酸変異Q31R/Q49K/Q79R/W209R(Q31R/Q49K/Q79R/W209R、N=6)を含むマウス様DNase1バリエーションをコードする遺伝子を注射した。第4群のDnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスには、Cs f3と、6つのアミノ酸変異Q31R、Q49K、Q79R、Q177K、W209R、及びG262K(Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K、N=6)を含むラット様DNase1バリエーションをコードする遺伝子を注射した。対数順位検定を用いてP値を計算した。(図22B)ザイモグラフィにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す(例えば、Ctrl)。消化されたクロマチンから分

40

50

離されたDNAのアガロースゲル電気泳動 (AGE) は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。ヒトDNase1のマウス様バリエーション (Q31R/Q49K/Q79R/W209R)、及びヒトDNase1のラット様バリエーション (Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K) は同様のdsDNA分解活性を示すが、クロマチン分解活性は野生型ヒトDNase1よりも高い。

【図23】ヒトDNase1 (D1、配列番号1) 及びヒトDNase1L3 (D1L3、配列番号2) のアミノ酸配列アライメントを示す。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。公開されている変異を有するD1のアミノ酸を強調表示する。ヒトD1L3には、ヒトDNase1の機能獲得に関連する3つの変異 (Q31R/T227K/A136F) と、活性の増加に関連しない4つの変異が含まれる。

【図24】変異Q31R、T227K、及び/またはA136Fを有するDNase1バリエーション (D1^V) の特徴付けを示す。(図24A) トランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清を分析した。野生型DNase1 (D1) 及びDNase1L3 (D1L3) をトランスフェクトしたHEK細胞を対照として用いた。サイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す (例えば、Ctrl)。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動 (AGE) は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。3つのアミノ酸変異Q31R/T227K/A136Fを特徴とするD1^Vは、D1、及びQ31R、T227K、A136F、またはQ31R/T227Kを特徴とするD1^Vと同様のdsDNA分解活性を有するが、クロマチン分解能力は高い。(図24B) 機能亢進性D1^Vによる遺伝子治療は、NETによる致死的な血管閉塞からの完全な部分的保護を提供する。血管内NET形成を併発する慢性好中球増加症を、G-CSFをコードするCs f3の肝発現によって誘発した。データは、Cs f3発現DNase1^{-/-}/DNase1L3^{-/-}マウスの生存曲線を示す。図21に示すように、動物に、Cs f3と空の対照ベクター (Ctrl、N=6)、Cs f3とヒトDNase1の混合物 (hDNase1、N=12) を注射した。さらに、DNase1^{-/-}/DNase1L3^{-/-}マウスの群に、Cs f3と、三重アミノ酸変異Q31R/T227K/A136F (Q31R/T227K/A136F、N=6) を含む、ヒトDNase1バリエーションでコードしている遺伝子を注射した。対数順位検定を用いてP値を計算した。

【図25】野生型DNase1 (D1) と変異Q31R/T227K/A136Fを特徴とするDNase1バリエーション (D1^V) の比較を示す。精製したタンパク質を指定量で分析した。サイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す (例えば、0 ng)。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動 (AGE) は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。変異Q31R/T227K/A136Fを特徴とするDNase1バリエーションは、野生型DNase1に比べておよそ10~20倍効率的にクロマチンを分解する。

【図26】アミノ酸変異A164K、A136F、及びA164K/A136Fを有するDNase1バリエーション (D1^V) と、野生型DNase1 (D1) 及び野生型 (D1L3) との比較を示す。トランスフェクトしたHEK細胞の培養上清を分析した。サイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す (例えば、Ctrl)。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動 (AGE) は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。A136F/A164Kを特徴とするDNase1バリエーションは、クロマチンを最も効率的に分解する。

【図27】変異A226__T227insKを有するDNase1バリエーションの開発を示す。(図27A)ヒトDNase1(配列番号1)及びヒトDNase1L3(配列番号2)のアミノ酸配列アライメント。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。DNase1L3の重要なアルギニン残基を強調表示する。DNase1とDNase1L3の間の共有アミノ酸を強調表示しているが、これらはDNase1のアミノ酸配列ATPをDNase1L3のVKKSに置き換えるアンカーとして機能する。(図27B)ザイモグラフィにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す(例えば、Ctrl)。ゲルに、野生型DNase1(D1)、変異A226__T227insK、T227K、及びA226__P228delinsVKKSを特徴とするDNase1バリエーション(D1^V)をロードした。A226__T227insKは、dsDNA分解活性の低下と相関するが、A226__P228delinsVKKSは相関しない。

10

【図28】ヒトDNase1[4AWN]の構造を示す。N末端βシート及びC末端βシートならびにD1タンパク質ファミリーのメンバー間で保存されているモチーフS272/D273/H274を強調表示する。

【図29】相同タンパク質のビルディングブロック改変の概念を示す。この技術は、保存された単一または複数の可変アミノ酸に隣接する単一または複数の可変アミノ酸を、ドナー及びレシピエントタンパク質間で転移させる。

【図30】マウス(配列番号3及び34)、ラット(配列番号4及び35)、チンパンジー(配列番号36及び37)、及びヒト(配列番号1及び2)のDNase1とDNase1L3のアミノ酸配列アライメントを示す。N末端シグナルペプチドと保存アミノ酸を強調表示する。可変アミノ酸は強調表示されておらず、これらはDNase1からDNase1L3へ、またはその逆へ転移させることができるビルディングブロックとして機能する。略語：AA、アミノ酸。

20

【図31A】ヒトDNase1(D1)及びヒトDNase1L3(D1L3)のビルディングブロックのリストを示す。D1及びD1L3における保存アミノ酸を示し、これらは、それぞれNアンカー及びCアンカーとして機能する。ビルディングブロックは、D1及びD1L3中の可変アミノ酸である。D1L3からD1へビルディングブロックを転移させる変異を示す。

【図31B】ヒトDNase1(D1)及びヒトDNase1L3(D1L3)のビルディングブロックのリストを示す。D1L3のNアンカー及びCアンカーを示す。D1からD1L3へビルディングブロックを転移させる変異を記載する。AA：アミノ酸。

30

【図32】相同タンパク質のビルディングブロック改変の応用法を示す。応用法は、最初のスクリーニング工程として、相同なドナー及びレシピエントタンパク質間のビルディングブロックのクラスターの転移を用いる。追加のオプション工程は、個々のビルディングブロックの転送と、その後の個々のアミノ酸の転移である。最終工程(図示せず)では、複数のアミノ酸、ビルディングブロック、及びビルディングブロッククラスターを組み合わせ、キメラ酵素を変性させてもよい。

【図33】DNase1L3(D1L3)由来のビルディングブロックを特徴とするDNase1バリエーション(D1^V)の特徴付けを示す。ザイモグラフィにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示した(例えば、Ctrl)。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動(AGE)は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。クロマチン分解活性の増加を引き起こすビルディングブロックの置換を、濃い陰影で強調表示する。そのような効果を有さないサンプルを明るい陰影で示す。ビルディングブロック11、12~14、26、41~48、及び49の組み合わせを特徴とするDNase1バリエーションは、野生型DNase1L3と同様のクロマチン分解活性を示す。

40

【図34】野生型DNase1L3のC末端テールを含まないDNase1L3バリエーション

50

トの開発を示す。図34Aは、ヒトDNase1（配列番号1）及びヒトDNase1L3（配列番号2）のアミノ酸配列アライメントを示す。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。DNase1L3のC末端を強調表示し、その核局在化シグナルを長方形で囲む。DNase1とDNase1L3の間の共有アミノ酸を示す。保存されたSDHモチーフの後に位置するアミノ酸は、DNase1とDNase1L3の間のビルディングブロッククラスター60～62で交換された。図34Bは、dsDNA分解活性を黒丸として示すザイモグラフィーを示す。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す（例えば、Ctrl）。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動（AGE）は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。野生型DNase1（D1）、D1由来のBBクラスター60～62を特徴とするDNase1バリエーション（D1^V）、D1由来のBBクラスター60～62を特徴とするDNase1L3バリエーション（D1L3^V）をゲルにロードし、また、2つの変異（K301A、K303A）を有するD1L3^Vを作製してNLS2を不活性化した。D1由来のBBクラスター60～62を含むD1L3^Vは、野生型D1L3よりも高いクロマチン分解活性を示した。

【図35】グリコシル化DNase1L3バリエーション（D1L3^V）の開発を示す。図35Aは、ヒトDNase1（配列番号1）及びヒトDNase1L3（配列番号2）のアミノ酸配列アライメントを示す。配列のルーラーは、アミノ酸の位置を示す。DNase1のグリコシル化モチーフN40-X-T42及びN128-X-T130を強調表示する。この部位は、ビルディングブロック（BB）4及びビルディングブロッククラスター（BB）23～25の一部である。DNase1とDNase1L3の間の関連する共有アミノ酸を強調表示する。（図35B）ザイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す（例えば、Ctrl）。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動（AGE）は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。野生型DNase1L3（D1L3）、D1のBB4を特徴とするDNase1L3バリエーション（D1L3^V）、及びD1のBBクラスター23～25を特徴とするDNase1L3バリエーション（D1L3^V）をゲルにロードした。D1L3に対する抗体を用いたウェスタンブロット（WB）により、D1L3^Vがより大きなタンパク質の量の増加を示したことが検出された。両方のグリコシル化DNase1L3バリエーション（D1L3^V）は、クロマチンを分解する能力を保持していた。

【図36】*in vivo*でのNETに対するDNase1L3（配列番号2）及びそのバリエーション（配列番号17）の治療効果を示す。図36Aは、ヘマトキシリンが豊富なマウス心臓及び心室内NETの密な血餅のH&E染色を示す。図36Bは、NETの誘発から始まり、NETによる血管閉塞及び死に至るタイムラインを示す。血尿と低体温は、*in vivo* NET血餅の外部徴候である。（図36C）実験計画の概要：Csrf3をDNase1-/-DNase1L3-/-で発現させて、NETの血管血餅を誘発した。血尿及び低体温を示したマウスを、ビヒクル（N=3）、ドルナーゼα（D1、N=3）、精製DNase1L3（D1L3、N=3）、または精製DNase1L3バリエーション（配列番号17、D1L3^V、N=3）の注射により無作為化した。30分後、肺及び血清を採取した。D1L3またはD1L3^Vによる治療は、肺のNETによる血管閉塞を有意に減少させ（図36D）、血清中のDNAレベルを増加させた（図36E）が、生理食塩水またはD1では変化がなかった。図36Fは、D1L3療法を受けたマウスの血清中のオリゴヌクレオソームを示す。D1L3^Vを投与したマウスは、より小さいモノヌクレオソーム及びジヌクレオソームを示した。D1療法を受けたマウスの血清由来のDNA単離物は、様々なサイズのかすかなDNAスメアを示し、一方、ビヒクルを注射したマウスの血清からはDNAを単離することができなかった。

【図37】虚血再灌流（IR）損傷のラットモデルにおけるDNase1L3バリエーション

(配列番号17)の治療効果を示す。(図37A)実験計画の概要：雄の野生型ラットの1つの精巣を精巣捻転に供した。手順は、虚血性組織損傷を引き起こす。マウスを無作為化した。精巣を減捻した後、ビヒクル(N=6)、ドルナーゼα(D1、N=6)、または精製DNase1L3バリエーション(配列番号17、D1L3^V、N=6)を注射した。未処置及び虚血精巣を7日後に採取した。図37Bは、D1L3^Vによる治療により虚血精巣の萎縮が有意に減少したが、生理食塩水またはD1では減少しなかったことを示す。図37Cは、巨視的な組織損傷を定量化した。すべての未処置の精巣は茶色がかっており、血管が発達しており、健康な組織であることを示している(Ctrl、スコア：0)。精巣捻転とその後の再灌流損傷させた組織は白みがかって見えた(IR、スコア：4)。D1L3^Vによる治療は、組織損傷を実質的に軽減し、4/6の精巣は損傷の徴候を示さなかったが、生理食塩水またはD1では軽減されなかった。スケールバー：1cm。

10

【図38】DNase1、DNase1L3、及びそのバリエーションの発現レベルを示す。(図38A)野生型DNase1(D1)、そのバリエーション(D1^V、配列番号7)、野生型D1L3、及びそのバリエーション(D1L3^V、配列番号17)を産生するCHO細胞の安定したプールを、バイオリアクター内で培養した。サンプルを定期的に採取し、ウェスタンブロットで分析した。D1及びD1^Vの発現が検出されたが、D1L3及びD1L3^Vのレベルは低かった。(図38B)D1L3及びD1L3^Vのロバストな発現をPichia pastorisにおいて達成した。(図38C)ザイモグラフィーにより、dsDNA分解活性を黒丸として示した。dsDNA分解活性は直径と相関する。活性のないサンプルは、ローディングウェルを小さな黒い斑点として示す(例えば、D1L3、0.0005ng)。消化されたクロマチンから分離されたDNAのアガロースゲル電気泳動(AGE)は、高分子量DNAからより低分子の、すなわち低分子量DNAへのシフトを示し、これはクロマチン分解活性と相関している。D1L3^Vは、クロマチンをD1L3よりもおよそ10倍効率的に分解する。

20

【図39】本開示による特定のDNaseバリエーションを示す。シグナルペプチドを含むDNase1及びDNase1L3のアミノ酸変異、ならびにシグナルペプチドを含まない成熟タンパク質を記載する。ビルディングブロック改変を用いて生成した変異には「+」のマークを付記し、ビルディングブロックを括弧内に示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

30

本発明は、好中球細胞外トラップ(NET)の蓄積及び／または放出を特徴とする病態の治療に有用な、改変型DNaseタンパク質、DNase1タンパク質ファミリーのメンバー(DNase1様3及びDNase1を含む)を提供する。いくつかの態様では、本発明は、NETが関与する血管閉塞を予防または治療するための組成物及び方法を提供する。本明細書中に示すように、NETは、血管閉塞の非標準的なメカニズムに関与しており、フィブリン及び血小板に非依存的である。

【0027】

本明細書中で使用する場合、用語「好中球細胞外トラップ」または「NET」とは、好中球、単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、マスト細胞、がん細胞、損傷細胞(例えば、損傷内皮細胞)などを含むがこれらに限定されない細胞によって形成される細胞外DNAを含む任意の細胞外トラップ(「ET」)を指す。文脈がそうでないことを示していない限り、本明細書中では用語NETとETは同じ意味で用いられる。

40

【0028】

ヒト及びマウスの循環中に見出される2つの細胞外DNase酵素、DNase1(D1)及びDNase1様3(D1L3)が存在する。これらの酵素は、in vitro及びin vivoでNETを分解する能力及びメカニズムを欠いている可能性があり、ヒト及びマウスにおいて比較的低濃度で見出される。天然酵素は、組換え療法、特に全身療法に理想的な物理的、酵素的、及び／または薬力学的特性を有していない。

【0029】

D1及びD1L3は、DNase1様1(D1L1)及びDNase1様2(D1L2

50

）とともに、DNase Iタンパク質ファミリーに属する。D1及びD1L3は、ヒト、霊長類、及びげっ歯類を含む様々な種で発現する。ヒトとマウスでは、D1とD1L3は、49～52%のタンパク質類似性を示す。しかしながら、それらの相同性にもかかわらず、D1とD1L3は細胞起源、阻害剤に対する感受性、及び基質親和性が異なる。D1はタンパク質フリーDNA（例えば、細菌DNA、プラスミドDNA）を優先的に切断するが、D1L3は真核細胞の核で一般的に認められるDNAとヒストンの複合体であるクロマチンを標的とする。D1活性は単量体アクチンと結合すると阻害され、生理的塩濃度に高感受性である。さらに、D1はN40（シグナルペプチドを含まない成熟酵素のN18に対応）及びN128（N106）でグリコシル化され、これにより酵素は血清プロテアーゼによる不活性化に耐性を示す。対照的に、D1L3はグリコシル化部位及びアクチン結合部位を欠いており、それぞれ、いくつかのプロテアーゼに対する感受性とアクチンに対する耐性を引き起こす。

【0030】

いくつかの態様では、本発明は、例えば対象におけるNET蓄積を低減または予防するための治療により適した物理的、薬力学的、及び／または酵素的特性を有するように改変したD1L3バリエーションを提供する。様々な実施形態において、本発明は、以下を含む組換えD1L3タンパク質バリエーションを提供する：1つ以上のグリコシル化、基質親和性の増加をもたらす1つ以上のアミノ酸変化、核局在化シグナルの不活性化、C末端テールの全部または一部の欠失、ペグ化、及びキャリアタンパク質または部分への融合。様々な実施形態において、D1L3バリエーションは、配列番号2の野生型D1L3タンパク質に比べて、タンパク質安定性の増加、プロテアーゼ耐性の増加、バイオアベイラビリティの増加、循環中の半減期の増加、及び／または実質的に同等またはより良好なDNA及び／またはクロマチン及び／またはNET分解活性、より高い産生レベルの*in vitro*発現系（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞及び／または*Pichia pastoris*）を有する。

【0031】

様々な実施形態において、D1L3バリエーションは、配列番号2のアミノ酸配列で定義される酵素に対して少なくとも80%の配列同一性を有し、本明細書に記載の配列番号2に対して1つ以上のアミノ酸改変を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号2により定義されるDNase酵素に対して、少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも97%、または少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0032】

本明細書中で使用する場合、野生型DNase酵素との配列同一性に言及する場合、及び特に明記しない限り、配列はシグナルペプチドを欠く成熟酵素を指す。さらに、特に明記しない限り、アミノ酸位置には、明確にするために、シグナルペプチドを含む完全な翻訳DNase配列について付番されている。したがって、例えば、配列番号2の酵素に対する配列同一性への言及は、N末端にM21を有する成熟酵素との同一性の割合を指す。同様に、配列番号1の酵素（ヒトD1）に対する配列同一性への言及は、N末端にL23を有する成熟酵素との同一性の割合を指す。

【0033】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列の類似性、すなわち配列同一性の割合は、当技術分野で公知の配列アライメントを介して決定することができる。そのようなアライメントは、いくつかの当技術分野で公知のアルゴリズム、例えば、カーリンとアルトシュルの数学アルゴリズム（Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877）、hmmalign（HMMERパッケージ、<http://hmmerr.wustl.edu/>）またはCLUSTALアルゴリズム（Thompson, JD, Higgins, DG & Gibson, TJ (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80）を用いて実施することができる。例示的なアルゴリズムは、Altschul et al (1990) J. Mo

10

20

30

40

50

l. Biol. 215:403-410のBLASTN及びBLASTPプログラムに組み込まれている。BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメーターを用いる。

【0034】

いくつかの実施形態では、組換えD1L3タンパク質バリエーションは、1つ以上のグリコシル化コンセンサス配列、例えばNX(T/S)を含む。ヒト野生型酵素（配列番号2）は、コンセンサスグリコシル化配列を含んでいない。しかしながら、グリコシル化コンセンサス配列をD1L3に組み込むと、酵素活性に実質的な影響を与えることなく、グリコシル化（及びプロテアーゼ耐性）を付与することができる。いくつかの実施形態では、グリコシル化コンセンサス配列は、野生型配列（例えば、配列番号2）からの、D38N置換及びN40TまたはN40S置換、及び／またはA127N置換及びV129TまたはV129S置換を含む。いくつかの実施形態では、組換えD1L3酵素は、1つ、2つ、3つ、または4つのグリコシル化部位を有する。コンセンサス配列は、その酵素活性に影響を与えない位置でタンパク質に導入することができ、いくつかの実施形態では、酵素の構造を維持するために重要な酵素部分の近くに位置する（例えば、アミノ酸25～289、及びいくつかの実施形態では、アミノ酸24～150）。

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号2により定義される酵素のアミノ酸配列に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するDNase酵素を提供し、その場合、酵素は、配列番号2の38位及び／または127位に対応する位置にアスパラギンの置換を有し、N38及び／またはN127はグリコシル化される。いくつかの実施形態では、38位及び／または127位での置換を、本明細書に記載の配列番号1からのビルディングブロック置換により行う。

【0036】

様々な実施形態において、1つ以上のグリコシル化を有するD1L3バリエーションは、野生型D1L3タンパク質（配列番号2）に比べて、血清プロテアーゼ分解に対する耐性の増加及び／または血清半減期の増加を示す。

【0037】

いくつかの実施形態では、D1L3タンパク質バリエーションは、核局在化シグナル(NLS)の不活性化を含む。D1L3には、2つの核局在部位(NLS1、NLS2)があり、どちらもアポトーシス中に酵素を核に向かわせる。実際、D1L3は、*in vivo*でのアポトーシス細胞及びネクロトーシス細胞の核DNAの断片化に必要である。NLS1は、N末端の近くに位置する（配列番号2に関して、約アミノ酸80～96位）。NLS2（配列番号2に関して、アミノ酸291～304位）は、C末端テール（配列番号2に関して、アミノ酸283～305位）の内部に組み込まれており、D1L3に固有であり、D1には存在しない。C末端テールは、D1L3が異なる細胞外DNA基質、すなわち脂質封入DNA及びアポトーシス小体内のクロマチンを分解するために必要であると考えられる。脂質はトランスフェクション中にDNAを封入する。簡潔に述べると、cDNA、タンパク質フリーDNA、及びカチオン性脂質が、標的細胞の細胞膜を貫通する複合体を形成する。D1L3はトランスフェクションを妨害するが、この機能にはC末端が重要である。D1L3の生理学的基質は、アポトーシス細胞由来のクロマチンで満たされた細胞外脂質小体であるアポトーシス小体である。C末端テールにより、D1L3はアポトーシス小体の脂質膜を貫通し、クロマチン充填物を分解することができる。C末端テールはまた、脂質フリーの細胞外クロマチンのD1L3による分解にも必要であると考えられている。したがって、D1L3に固有の分子的特徴であるC末端テールは、D1とD1L3の別個の基質親和性に関与していると思われる。

【0038】

1つ以上のNLSの不活性化は、循環中の酵素のアベイラビリティ及び／または活性を高める。いくつかの実施形態では、NLS不活性化を、NLS1及び／またはNLS2の全部または一部の欠失により行う。いくつかの実施形態では、NLSを、NLS1及び／

10

20

30

40

50

またはNLS2内のアミノ酸の置換及び／または欠失により不活性化する。いくつかの実施形態では、NLS2を完全にまたは部分的に欠失させる。いくつかの実施形態では、D1L3タンパク質バリエーションは、C末端テールの全部または一部の欠失、及び／またはC末端テールの1つ以上のアミノ酸の置換を含む。

【0039】

特定の実施形態では、D1L3バリエーションは、NLS1ドメインに、1つ以上、例えば、1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸置換、付加（例えば、挿入）、または欠失を含む。NLS2ドメインまたはその部分を欠失させてもよい。特定の実施形態では、D1L3タンパク質バリエーションは、C末端テールドメインに、1つ以上、例えば、1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。C末端テールドメインまたはその部分を欠失させてもよい。様々な実施形態において、D1L3タンパク質バリエーションは、C末端テールドメインに位置するNLS2ドメインに、1つ以上、例えば1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。D1L3タンパク質バリエーションにおいて、NLS2ドメインまたはその部分を欠失させることができる。

【0040】

様々な態様において、本発明は、DNase1タンパク質ファミリーメンバーなどのタンパク質ファミリーの2つのメンバー間の「ビルディングブロック」と呼ばれる単一アミノ酸または複数の隣接アミノ酸の転移に基づくタンパク質改変技術を提供し、DNase1タンパク質ファミリーメンバーの酵素的に活性なバリエーション（D1及びD1L3のバリエーションを含む）を生成する。「ビルディングブロック」は、DNase1タンパク質ファミリーの2つ以上のメンバー間で可変であるアミノ酸によって画定される。これらの可変アミノ酸には、DNase1タンパク質ファミリーの2つ以上のメンバーの間で保存されているアミノ酸が隣接している（「アンカー」）。保存された単一アミノ酸または複数の連続アミノ酸（「アンカー」）の間に可変の単一アミノ酸または複数の連続アミノ酸（「ビルディングブロック」）を移植することにより、DNase1タンパク質ファミリーのメンバー間でそれらを交換する。

【0041】

本アプローチは、本明細書において「ビルディングブロックタンパク質改変」と呼ばれる。3つ以上のアミノ酸を転移させる場合、最大1／3のアミノ酸をさらに置換してもよい。例えば、3つまたは6つのアミノ酸をビルディングブロックとして転移させる場合、それぞれ1つまたは最大2つの残基をさらに置換させてもよい。いくつかの実施形態では、4つ以上のアミノ酸をビルディングブロック置換として転移させ、転移させるアミノ酸の最大25％を、例えば保存的または非保存的アミノ酸改変でさらに置換する。例えば、4、8、または12個のアミノ酸を転移させる場合、1、2、または3個のアミノ酸を（それぞれ）ビルディングブロック置換でさらに置換してもよい。

【0042】

様々な態様（上記の実施形態に関連するものを含む）では、D1L3バリエーションはD1からの少なくとも1つのビルディングブロック置換を含む。図31は、D1とD1L3の間の62個のビルディングブロック置換を示す。

【0043】

D1からの例示的なビルディングブロック置換には、以下のうちの1つ以上が含まれる：
配列番号2の1～20（MSRELAPLLLLLLSIHSAALA）を配列番号1由来の1～22（MRGMKLLGALLAALLQGAVS）に置換；配列番号2の21～25（MRICS）を配列番号1由来の23～27（LKIAA）に置換；配列番号2の28～30（VRS）を配列番号1由来の30～32（IQT）に置換；配列番号2の33～34（ES）を配列番号1由来の35～36（ET）に置換；配列番号2の36～45（QEDKNAMDVI）を配列番号1由来の38～47（MSNATLVSYI）に置換；配列番号2の47～51（KVIK）を配列番号1由来の49～53（QILS）に置換；配列番号2の52（C）を配列番号1由来の54（Y）に置換；配列番号

2の54～58 (I I L V M) を配列番号1由来の56～60 (I A L V Q) に置換; 配列番号2の60～61 (I K) を配列番号1由来の62～63 (V R) に置換; 配列番号2の63～70 (S N N R I C P I) を配列番号1由来の65～72 (S H L T A V G K) に置換; 配列番号2の72～74 (M E K) を配列番号1由来の74～76 (L D N) に置換; 配列番号2の77～84 (R N S R R G I T) を配列番号1由来の79～84 (Q D A P D T) に置換; 配列番号2の86 (N) を配列番号1由来の86 (H) に置換; 配列番号2の88～89 (V I) を配列番号1由来の88～89 (V V) に置換; 配列番号2の91～92 (S R) を配列番号1由来の91～92 (E P) に置換; 配列番号2の96～97 (N T) を配列番号1由来の96～97 (N S) に置換; 配列番号2の101 (Q) を配列番号1由来の101 (R) に置換; 配列番号2の103 (A) を配列番号1由来の103 (L) に置換; 配列番号2の105 (L) を配列番号1由来の105 (V) に置換; 配列番号2の107～110 (K E K L) を配列番号1由来の107～110 (R P D Q) に置換; 配列番号2の113～116 (V K R S) を配列番号1由来の113～116 (A V D S) に置換; 配列番号2の118 (H) を配列番号1由来の118 (Y) に置換; 配列番号2の120 (H) を配列番号1由来の120 (D) に置換; 配列番号2の122～127 (Y Q D G D A) を配列番号1由来の122～128 (G C E P C G N) に置換; 配列番号2の129 (V) を配列番号1由来の130 (T) に置換; 配列番号2の131 (S) を配列番号1由来の132 (N) に置換; 配列番号2の135～136 (F V) を配列番号1由来の136～137 (A I V) に置換; 配列番号2の138 (W) を配列番号1由来の139 (R) に置換; 配列番号2の140～143 (Q S P H) を配列番号1由来の141～144 (F S R F) に置換; 配列番号2の145～148 (A V K D) を配列番号1由来の146～149 (E V R E) に置換; 配列番号2の150 (V) を配列番号1由来の151 (A) に置換; 配列番号2の152 (I) を配列番号1由来の153 (V) に置換; 配列番号2の156～157 (T T) を配列番号1由来の157～158 (A A) に置換; 配列番号2の159～161 (E T S) を配列番号1由来の160～162 (G D A) に置換; 配列番号2の163 (K) を配列番号1由来の164 (A) に置換; 配列番号2の167 (E) を配列番号1由来の168 (A) に置換; 配列番号2の169～170 (V E) を配列番号1由来の170～171 (Y D) に置換; 配列番号2の173 (T) を配列番号1由来の174 (L) に置換; 配列番号2の176～178 (K H R) を配列番号1由来の177～179 (Q E K) に置換; 配列番号2の180～181 (K A) を配列番号1由来の181～182 (G L) に置換; 配列番号2の183～186 (N F I F) を配列番号1由来の184～187 (D V M L) に置換; 配列番号2の198～201 (P K K A) を配列番号1由来の199～202 (R P S Q) に置換; 配列番号2の203～204 (K N) を配列番号1由来の204～205 (S S) に置換; 配列番号2の208 (R) を配列番号1由来の209 (W) に置換; 配列番号2の210 (D) を配列番号1由来の211 (S) に置換; 配列番号2の212 (R) を配列番号1由来の213 (T) に置換; 配列番号2の214 (V) を配列番号1由来の215 (Q) に置換; 配列番号2の218 (G) を配列番号1由来の219 (P) に置換; 配列番号2の220～221 (Q E) を配列番号1由来の221～222 (S A) に置換; 配列番号2の225～228 (V K K S) を配列番号1由来の226～228 (A T P) に置換; 配列番号2の230 (N) を配列番号1由来の230 (H) に置換; 配列番号2の238～240 (L R G) を配列番号1由来の238～240 (V A G) に置換; 配列番号2の241～246 (Q E I V S S) を配列番号1由来の241～246 (M L L R G A) に置換; 配列番号2の250 (K) を配列番号1由来の250 (D) に置換; 配列番号2の252～254 (N S V) を配列番号1由来の252～254 (A L P) に置換; 配列番号2の256 (D) を配列番号1由来の256 (N) に置換; 配列番号2の259～260 (K A) を配列番号1由来の259～260 (A A) に置換; 配列番号2の262 (K) を配列番号1由来の262 (G) に置換; 配列番号2の264～267 (T E E E) を配列番号1由来の264～267 (S D Q L) に置換; 配列番号2の269～271 (L D V) を配列番号1由来の269～271 (Q A I) に置換; 配列番号2由

10

20

30

40

50

来の275 (F) を配列番号1由来の275 (Y) に置換；配列番号2の279～280 (FK) を配列番号1由来の279～280 (VM) に置換；及び配列番号2の282～305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) を配列番号1由来の282 (K) に置換。

【0044】

D1からのこれらのビルディングブロック置換は、以下の変異の1つ以上を特徴とするD1L3のバリエーションをもたらす：M1__A20delinsMRGMKLLGALLA
LAALLQGAVS、M21__S25delinsLKIAA、V28__S30del
insIQT、E33__S34delinsET、Q36__I45delinsMSNA
TLVSYI、K47__K50delinsQILS、C52Y、I54__M58del
insIALVQ、I60__K61delinsVR、S63__I70delinsSH
LTAVGK、M72__K74delinsLDN、R77__T84delinsQDA
PDT、N86H、V88__I89delinsVV、S91__R92delinsEP
、N96__T97delinsNS、Q101R、A103L、L105V、K107__
L110delinsRPDQ、V113__S116delinsAVDS、H118Y
、H120D、Y122__A127delinsGCEPCGN、V129T、S131
N、135F__136VdelinsAI、W138R、Q140__H143delin
sFSRF、A145__D148delinsAVKD、V150A、I152A、T1
56__T157delinsAA、E159__S161delinsGDA、K163A
、E167A、V169__E170delinsYD、T173L、K176__R178
delinsQEK、K180__A181delinsGL、N183__F186del
insDVML、P198__A201delinsRPSQ、K203__N204del
insSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220
__E221delinsSA、V225__S228delinsATP、N230H、L
238__R239delinsVA、Q241__S246delinsMLLRGA、K
250D、N252__V254delinsALP、D256N、K259__A260d
elinsAA、K262G、T264__E267delinsSDQL、L269__V
271delinsQAI、F275Y、F279__K280delinsVM、Q28
2__S305delinsK。

【0045】

用語「delins」とは、欠失部位にアミノ酸またはアミノ酸の配列が挿入された、記載する2つのアミノ酸の間の欠失を指す。例えば、表記E91__P92delinsSRは、E91からP92のアミノ酸を欠失させ、アミノ酸SRを欠失部位に挿入することを意味する（例えば、得られるアミノ酸配列はS91及びR92となる）。

【0046】

用語「ins」とは、記載する2つのアミノ酸間のアミノ酸の挿入を指す。例えば、表記E91__P92insSRは、E91とP92の間にアミノ酸SRを挿入し、配列E91、S92、R93、及びP94が生じることを意味する。

【0047】

1つの酵素における複数の突然変異は、「/」によって分離され、例えば、T227K/A136FまたはR199__Q202delinsPKKA/S204__S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221__A222delinsQEである。

【0048】

いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、1つ以上の隣接するビルディングブロック置換を含む。例えば、D1L3バリエーションは、配列番号2に関して、変異F275Y/F279__K280delinsVM/Q282__S305delinsK（配列番号17）を含み得る。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号2に関して、変異Q36__I45delinsMSNATLVSYI（配列番号19）を含み得る。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号2に関して、変異Y12

2__A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N（配列番号20）を含み得る。

【0049】

例示的な実施形態では、D1L3バリエーションは、配列番号2に関する変異：Q36__I45delinsMSNATLVSYI、Y122__A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N、F275Y/F279__K280delinsVM/Q282__S305delinsKから選択される2つまたは3つの置換を含む。

【0050】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号2によって定義される酵素のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有し、配列番号1のアミノ酸配列由来の少なくとも1つのビルディングブロック置換を含むDNase酵素を提供する。配列番号1と2の間のビルディングブロック置換を図31に図示し、付番する。例えば、いくつかの実施形態では、酵素は、変異F275Y/F279__K280delinsVM/Q282__S305delinsKを含み、場合により配列番号17のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、酵素は、変異Q36__I45delinsMSNATLVSYI、Y122__A127delinsGCEPCGN、V129T、またはS131N、及び場合により配列番号19または配列番号20のアミノ酸配列を有する。

【0051】

例示的なD1L3バリエーションとして、配列番号17～20のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号17～20のいずれかに比べて、1～10（例えば、1～5）のアミノ酸挿入、欠失、または置換を有する誘導体を含む。いくつかの実施形態では、D1L3バリエーションは、相同DNase（例えば、D1由来）からの1つ以上の追加のブロックアミノ酸置換を含む。そのようなブロック置換は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個のアミノ酸を置き換え得る。いくつかの実施形態では、ブロック置換は、2～20アミノ酸、例えば3～15アミノ酸、または3～10アミノ酸を、相同DNase由来の同等のビルディングブロックで置き換える。

【0052】

D1L3タンパク質の改変型バリエーションは、ヒトD1L3のアミノ酸配列（配列番号2）に1つ以上の追加のアミノ酸置換、付加（挿入）、欠失、または切除を含み得る。アミノ酸置換には、保存的及び／または非保存的置換が含まれ得る。

【0053】

例えば、「保存的置換」は、例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解性、疎水性、親水性、及び／または両親媒性の類似性に基づいて行ってもよい。20種類の天然アミノ酸は、以下の6つの標準アミノ酸群に分類することができる：（1）疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；（2）中性親水性：Cys、Ser、Thr；Asn、Gln；（3）酸性：Asp、Glu；（4）塩基性：His、Lys、Arg；（5）鎖の向きに影響を与える残基：Gly、Pro；（6）芳香族：Trp、Tyr、Phe。「保存的置換」は、上記の6つの標準アミノ酸群の同じ群内に記載する別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。例えば、AspからGluへの交換は、そのように改変したポリペプチド中の1つの負電荷を保持する。さらに、グリシン及びプロリンは、 α -ヘリックスを破壊する能力に基づいて相互に置換し得る。本明細書中で使用する場合、「非保存的置換」は、あるアミノ酸から、上記の6つの標準アミノ酸群（1）～（6）の異なる群に記載する別のアミノ酸への交換として定義される。

【0054】

いくつかの実施形態では、DIL3タンパク質バリエーションは、アルブミン、トランスフェリン、Fc、またはエラスチン様タンパク質などの半減期延長部分へのN末端またはC末端の融合を含む。参照によりその全体を本明細書に援用するUS9,458,218を参照されたい。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンヒンジ領域によってD1L3を

10

20

30

40

50

二量体化させる。例えば、本明細書に記載の改変型酵素は、Fc融合ドメイン（例えば、免疫グロブリンのヒンジならびにCH2ドメイン及びCH3ドメイン）も含み得る。他の場合では、改変型D1L3タンパク質を、アルブミン、例えば、ヒトアルブミンまたはその断片に融合させる。参照によりその全体を本明細書に援用するWO2015/066550；US9,221,896を参照されたい。アルブミンは、改変型D1タンパク質のN末端またはC末端で結合することができ、場合によりアミノ酸リンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、Fcヒンジ領域によってD1L3とD1を結合して二量体化し、NETを分解するための相乗的機能特性を有する二量体分子を作成する。

【0055】

いくつかの実施形態では、組換えD1L3タンパク質バリエーションは、1つ以上の位置またはC末端でコンジュゲートし得る1つ以上のポリエチレングリコール（PEG）部分を含む。いくつかの実施形態では、その位置の天然アミノ酸を、親水性部分との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸に置換し、その親水性部分のペプチドへの結合を促進する。他の実施形態では、親水性基を含むように改変したアミノ酸をペプチドのC末端に付加する。PEG鎖（複数可）は、約500～約40,000ダルトンの範囲の分子量を有し得る。いくつかの実施形態では、PEG鎖（複数可）は、約500～約5,000ダルトンの範囲の分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG鎖は、約10,000～約20,000ダルトンの分子量を有する。

【0056】

様々な実施形態において、D1L3タンパク質バリエーションは、野生型D1L3タンパク質に比べて、タンパク質安定性の増加、血清のアベイラビリティの増加、及び実質的に同等またはより良好なNET分解活性（*in vitro*または*in vivo*で測定）を有する。様々な実施形態において、D1L3バリエーションは、野生型D1L3に比べて、以下の特性の1つ以上を含む：より高いタンパク質フリーDNA（裸のDNA）分解活性、同等または実質的に同等（例えば、少なくとも50%）の染色体DNA分解活性、プロテアーゼ耐性、半減期の延長、及びより高い産生レベルの*in vitro*発現系（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞及び／または*Pichia pastoris*）。

【0057】

DNA断片化は、ゲル電気泳動及びDNase活性アッセイなどの当業者に公知の方法を使用して測定することができる。NET、NET分解、及びDNA断片化活性の定量化方法は、例えば、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、及びJimenez-Alcazar et al., J Thromb Haemost, 2015, 13, 732-742に記載されている。

【0058】

いくつかの態様では、本発明は、例えば対象におけるNET蓄積を低減または予防するための治療により適した物理的、薬力学的、及び／または酵素的特性を有するように改変したDNase1（D1）バリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、バリエーションは組換え発現に適しており、それにより大きな製造上の利点を提供する。様々な実施形態において、改変型D1バリエーションは、配列番号1のアミノ酸配列によって定義される成熟酵素に対して少なくとも80%同一であり、1つ以上の変異DNA結合部位、クロマチン結合部位の付加、変異アクチン結合部位、グリコシル化部位の変異、核局在化シグナルの付加（例えば、D1L3のNLS1またはNLS2と類似性または同一性を有する）、及び／またはD1L3のC末端テールと同様のC末端ドメインを生じる1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を有するアミノ酸配列を有する。D1バリエーションは、本明細書に記載するように、配列番号1により定義される酵素のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有し、配列番号1に関して1つ以上のアミノ酸改変を有するアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を有する。いくつかの実施形態では、D 1 L 3 バリエーションは、配列番号 1 の酵素に対して、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %、または少なくとも 97 %、または少なくとも 98 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0059】

様々な実施形態において、D 1 バリエーションは、ヒト D 1 のアミノ酸配列（配列番号 1）に 1 つ以上のアミノ酸置換、付加、欠失、または切除を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、記載する保存的及び／または非保存的置換を含み得る。例えば、D 1 バリエーションは、配列番号 1 の酵素に関して、1 ～ 20 個（または 1 ～ 10 個、または 1 ～ 5 個）のアミノ酸置換、欠失、または挿入を含む得る。

【0060】

いくつかの実施形態では、D 1 バリエーションは、相同 DNase（例えば、D 1 L 3 由来の）からの 1 つ以上の追加のブロックアミノ酸置換を含む。そのようなブロック置換は、相同 DNase 由来の 1 ～ 24 アミノ酸、例えば 3 ～ 15 アミノ酸、または 3 ～ 10 アミノ酸をそれぞれ置換し得る。いくつかの実施形態では、D 1 バリエーションは、相同 DNase（例えば、D 1 L 3）由来の 2 ～ 5 個のブロック置換を含む。いくつかの実施形態では、2 つまたは 3 つの連続したビルディングブロック置換を転移させる。

【0061】

様々な実施形態において、D 1 バリエーションを、野生型酵素に比べて以下の特徴の 1 つ以上を含むように改変する：実質的に同等またはより高いタンパク質フリー DNA（裸の DNA）分解活性（例えば、少なくとも 50 % 以上）、より高い染色体 DNA 分解活性、同様または向上したプロテアーゼ耐性、アクチン耐性、血清半減期の延長、血液から尿または胆汁への浸透の向上、またはそのような特性の組み合わせ。

【0062】

いくつかの実施形態では、改変型 D 1 酵素は、野生型 D 1 L 3 タンパク質の C 末端ドメイン（例えば、配列番号 2 のアミノ酸 283 ～ 305）に対して、少なくとも 50 %（または少なくとも 70 %、80 %、90 %）の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0063】

いくつかの実施形態では、D 1 酵素は、野生型 D 1 L 3 の NLS1（配列番号 2 のアミノ酸 35 ～ 51）に対して、少なくとも 50 % または少なくとも 75 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、野生型 D 1 L 3 タンパク質の核局在化シグナル 2（NLS2）（配列番号 2 のアミノ酸 296 ～ 304）に対して実質的な配列同一性を有する NLS2 を有する。

【0064】

様々な態様において、組換え D 1 バリエーションは、以下から選択される 1 つ以上のビルディングブロック置換を含む：配列番号 1 由来の 1 ～ 22（MRGMKLLGALLALAA L L Q G A V S）を配列番号 2 由来の 1 ～ 20（MSRELAPLLL L L L S I H S A L A）に置換；配列番号 1 由来の 23 ～ 27（LKIAA）を配列番号 2 由来の 21 ～ 25（MRICS）に置換；配列番号 1 由来の 30 ～ 32（IQT）を配列番号 2 由来の 28 ～ 30（VRS）に置換；配列番号 1 由来の 35 ～ 36（ET）を配列番号 2 由来の 33 ～ 34（ES）に置換；配列番号 1 由来の 38 ～ 47（MSNATLVSYI）を配列番号 2 由来の 36 ～ 45（QEDKNAMDVI）に置換；配列番号 1 由来の 49 ～ 52（QILS）を配列番号 2 由来の 47 ～ 50（KVIK）に置換；配列番号 1 由来の 54（Y）を配列番号 2 由来の 52（C）に置換；配列番号 1 由来の 56 ～ 60（IALVQ）を配列番号 2 由来の 54 ～ 58（IILVM）に置換；配列番号 1 由来の 62 ～ 63（VR）を配列番号 2 由来の 60 ～ 61（IK）に置換；配列番号 1 由来の 65 ～ 72（SHLTAVGK）を配列番号 2 由来の 63 ～ 70（SNNRICPI）に置換；配列番号 1 由来の 74 ～ 76（LDN）を配列番号 2 由来の 72 ～ 74（MEK）に置換；配列番号 1 由来の 79 ～ 84（QDAPDT）を配列番号 2 由来の 77 ～ 84（RNSRRGIT）に置換；配列番号 1 由来の 86（H）を配列番号 2 由来の 86（N）に置換；配列番号 1 由来の 88 ～ 89（VV）を配列番号 2 由来の 88 ～ 89（VI）に置換；配列

10

20

30

40

50

番号1由来の91～92 (EP) を配列番号2由来の91～92 (SR) に置換; 配列番号1由来の96～97 (NS) を配列番号2由来の96～97 (NT) に置換; 配列番号1由来の101 (R) を配列番号2由来の101 (Q) に置換; 配列番号1由来の103 (L) を配列番号2由来の103 (A) に置換; 配列番号1由来の105 (V) を配列番号2由来の105 (L) に置換; 配列番号1由来の107～110 (RPDQ) を配列番号2由来の107～110 (KEKL) に置換; 配列番号1由来の113～116 (AVDS) を配列番号2由来の113～116 (VKRS) に置換; 配列番号1由来の118 (Y) を配列番号2由来の118 (H) に置換、配列番号1由来の120 (D) を配列番号2由来の120 (H) に置換; 配列番号1由来の122～128 (GCEPCGN) を配列番号2由来の122～127 (YQDGD A) に置換、配列番号1由来の130 (TF) を配列番号2由来の129 (V) に置換; 配列番号1由来の132 (N) を配列番号2由来の131 (S) に置換; 配列番号1由来の136～137 (AI) を配列番号2由来の135～136 (FV) に置換; 配列番号1由来の139 (R) を配列番号2由来の138 (W) に置換; 配列番号1由来の141～144 (FSRF) を配列番号2由来の140～143 (QSPH) に置換; 配列番号1由来の146～149 (EVRE) を配列番号2由来の145～148 (AVKD) に置換; 配列番号1由来の151 (A) を配列番号2由来の150 (V) に置換; 配列番号1由来の153 (V) を配列番号2由来の152 (I) に置換; 配列番号1由来の157～158 (AA) を配列番号2由来の156～157 (TT) に置換; 配列番号1由来の160～162 (GDA) を配列番号2由来の159～161 (ETS) に置換; 配列番号1由来の164 (A) を配列番号2由来の163 (K) に置換; 配列番号1由来の168 (A) を配列番号2由来の167 (E) に置換; 配列番号1由来の170～171 (YD) を配列番号2由来の169～171 (VE) に置換; 配列番号1由来の174 (L) を配列番号2由来の173 (T) に置換; 配列番号1由来の177～179 (QEK) を配列番号2由来の176～178 (KHR) に置換; 配列番号1由来の181～182 (GL) を配列番号2由来の180～181 (KA) に置換; 配列番号1由来の184～187 (DVML) を配列番号2由来の183～187 (NFI F) に置換; 配列番号1由来の199～202 (RPSQ) を配列番号2由来の198～201 (PKKA) に置換; 配列番号1由来の204～205 (SS) を配列番号2由来の203～204 (KN) に置換; 配列番号1由来の209 (W) を配列番号2由来の208 (R) に置換; 配列番号1由来の211 (S) を配列番号2由来の210 (D) に置換; 配列番号1由来の213 (T) を配列番号2由来の212 (R) に置換; 配列番号1由来の215 (Q) を配列番号2由来の214 (V) に置換; 配列番号1由来の219 (P) を配列番号2由来の218 (G) に置換; 配列番号1由来の221～222 (SA) を配列番号2由来の220～221 (QE) に置換; 配列番号1由来の226～228 (ATP) を配列番号2由来の225～228 (VKKS) に置換; 配列番号1由来の230 (H) を配列番号2由来の230 (N) に置換; 配列番号1由来の238～239 (VA) を配列番号2由来の238～239 (LR) に置換; 配列番号1由来の241～246 (MLLRGA) を配列番号2由来の241～246 (QEI VS S) に置換; 配列番号1由来の250～251 (D) を配列番号2由来の250～251 (K) に置換; 配列番号1由来の252～254 (ALP) を配列番号2由来の252～254 (NSV) に置換; 配列番号1由来の256 (N) を配列番号2由来の256 (D) に置換; 配列番号1由来の259～260 (AA) を配列番号2由来の259～260 (KA) に置換; 配列番号1由来の262 (G) を配列番号2由来の262 (K) に置換; 配列番号1由来の264～267 (SDQ) を配列番号2由来の264～267 (TEE E) に置換; 配列番号1由来の269～271 (QAI) を配列番号2由来の269～271 (LDV) に置換; 配列番号1由来の275 (Y) を配列番号2由来の275 (F) に置換; 配列番号1由来の279～280 (VM) を配列番号2由来の279～280 (FK) に置換; 及び配列番号1由来の282 (K) を配列番号2由来の282～305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) に置換。

【0065】

10

20

30

40

50

D1L3からのビルディングブロック置換は、以下の変異の1つ以上を特徴とするD1のバリエーションをもたらす：1M__S22delinsMSRELAPLLLLLSIH SALA、L23__A27delinsMRI CS、I30__T32delinsVRS、E35__T36delinsES、M38__I47delinsQEDKNAMDVI、Q49__S52delinsKVIK、Y54C、I56__Q60delinsIIL VM、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__N128delinsYQD GDA、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__L187delinsNFI F、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。

【0066】

いくつかの実施形態では、組換えD1バリエーションは、配列番号1に関して以下の改変を含む：Y275F、V279__M280delinsFK、及びK282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS（配列番号16）。そのようなバリエーションは、C末端テールを含み、DNA-脂質複合体に対してより高い親和性を示す。

【0067】

いくつかの実施形態では、組換えD1バリエーションは、配列番号1に関して以下のアミノ酸改変を含む：Q79__T84delinsRNSRRGIT（例えば、配列番号10）；H86N、及び／または、V88__V89delinsVI、及び／またはE91__P92delinsSR（例えば、3つすべてを含む配列番号11）；A136__I137delinsFV（例えば、配列番号12）；R199__Q202delinsPKKA、及び／またはS204__S205delinsKN、及び／またはW209R、及び／またはS211D、及び／またはT213R、及び／またはQ215V、及び／またはP219G、及び／またはS221__A222delinsQE（例えば、8つすべてを含む配列番号13）；及びA226__P228delinsVKKS（例えば、配列番号14）。

【0068】

D1バリエーションが置換H86Nを含むいくつかの実施形態では、バリエーションは、少なくとも1つのさらなる改変、例えば、本明細書に記載のビルディングブロック置換または他の点変異（例えば、アクチンに対する耐性をもたらすカチオン性アミノ酸の付加または置換）を含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、D1バリエーションは、以下の配列番号1に関する変異をもたらす少なくとも2つの隣接する連続的なビルディングブロック置換を含む：H86N/V88__V89delinsVI（例えば、配列番号11）；R199__Q202delinsPKKA/S204__S205delinsKN/W209R/S211D/T213

10

20

30

40

50

R/Q215V/P219G/S221__A222delinsQE（例えば、配列番号13）；Y275F/V279__M280delinsFK/K282delinsQS SRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS（配列番号16）。

【0070】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1によって定義される酵素のアミノ酸配列に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有し、配列番号2のアミノ酸配列由来の少なくとも1つのビルディングブロック置換を含むDNase酵素を提供し、その場合、DNase酵素は、配列番号1のDNase酵素に比べてクロマチン分解活性が増加している。いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号2由来の少なくとも2つの隣接するビルディングブロック置換を含む。D1（配列番号1）とD1L3（配列番号2）との間のビルディングブロック置換を図31に示す。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：Q79__T84delinsRNSRRGITを含み、場合により配列番号10のアミノ酸配列を有する。

【0072】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：H86N/V88__V89delinsVI/E91__P92delinsSRを含み、場合により配列番号11のアミノ酸配列を有する。

【0073】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：A136__I137delinsFVを含み、場合により配列番号12のアミノ酸配列を有する。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：R199__Q202delinsPKKA、及び／またはS204__S205delinsKN、及び／またはW209R、及び／またはS211D、及び／またはT213R、及び／またはQ215V、及び／またはP219G、及び／またはS221__A222delinsQEのうちの2つ以上を含み、場合により配列番号13のアミノ酸配列（8つすべてを含む）を有する。

【0075】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：A226__P228delinsVKKSを含み、場合により配列番号14のアミノ酸配列を有する。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：Q79__T84delinsRNSRRGIT、及び／またはH86N、及び／またはV88__V89delinsVI、及び／またはE91__P92delinsSR、及び／またはA136__I137delinsFV、及び／またはR199__Q202delinsPKKA、及び／またはS204__S205delinsKN、及び／またはW209R、及び／またはS211D、及び／またはT213R、及び／またはQ215V、及び／またはP219G、及び／またはS221__A222delinsQE、及び／またはA226__P228delinsVKKSのうちの2つ以上を含み、場合により配列番号15のアミノ酸配列を有する。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関して以下の改変：Y275F、及び／またはV279__M280delinsFK、及び／またはK282delinsQS SRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRSのうちの2つ以上を含み、場合により配列番号16のアミノ酸配列を有する。

【0078】

例示的なD1バリエーションとして、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、及び配列番号16のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。いくつか

50

の実施形態では、本発明は、配列番号 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 のいずれか 1 つに対して 1～10（例えば、1～5）のアミノ酸挿入、欠失、または置換を有する誘導体を含む。いくつかの実施形態では、D1 バリエーションは、相同 DNase（例えば、D1L3）由来の 1 つ以上の追加のブロックアミノ酸置換を含む。そのようなブロック置換は、D1 バリエーションの 2～20 個のアミノ酸、例えば 3～15 個のアミノ酸、または 3～10 個のアミノ酸を、相同 DNase 由来のビルディングブロックアミノ酸（例えば、D1L3、配列番号 2）に置き換える。D1 と D1L3 との間のビルディングブロック置換を図 31 に示す。いくつかの実施形態では、DNase 酵素は、配列番号 15 に対して少なくとも 95% または少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列を有する。

【0079】

様々な実施形態において、酵素は：配列番号 1 の酵素と同様またはより高いタンパク質フリー DNA への親和性、配列番号 1 の酵素に比べてより高いクロマチン分解活性、配列番号 1 の酵素に比べてアクチンによる阻害に耐性を有する酵素活性、及びその組み合わせから選択される 1 つ以上の特性を示す。

【0080】

いくつかの実施形態では、D1 バリエーションは、D1L3 について記載するように、アルブミン、トランスフェリン、Fc、またはエラスチン様タンパク質などの半減期延長部分への N 末端または C 末端融合を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンヒンジ領域によって D1 酵素を二量体化する。

【0081】

様々な実施形態において、D1 バリエーションは：同等またはより高いタンパク質フリー DNA（裸の DNA）分解活性、より高い染色体 DNA（クロマチン）分解活性、同様または向上したプロテアーゼ耐性、アクチン耐性、同様または向上した血液から尿及び／または胆汁への浸透、及びより高い産生レベルの *in vitro* 発現系（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞及び／または *Pichia pastoris*）、ならびにそれらの組み合わせから選択される 1 つ以上の特性を示す。

【0082】

様々な実施形態において、DNase 酵素は、配列番号 1 により定義される酵素のアミノ酸配列に対して少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を有し、1 つ以上のアルギニン及び／またはリジン残基の置換、挿入、または付加を含み、その場合、DNase 酵素は、配列番号 1 の酵素に比べてクロマチン分解活性が増加している。いくつかの実施形態では、1 つ以上のアルギニン及び／またはリジン残基は、配列番号 1 の 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、及び 280 位に対応する位置での置換から選択されるアミノ酸置換である。これらの位置での例示的な改変として、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、及び K280M が挙げられる。様々な実施形態において、酵素は、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つ、または少なくとも 6 つのアルギニン及び／またはリジン残基の置換及び／または挿入を含む。いくつかの実施形態では、DNase 酵素は、配列番号 1 の 31、49、76、79、92、109、164、177、200、201、204、209、213、及び 262 位に対応する 1 つ以上の位置にアルギニンまたはリジンを含み、それらは、場合により、Q31R、Q49R、N76K、Q79R、P92R、D109K、A164K、Q177K、P200K、S201K、S204R、W209R、T213R、W209R、及び G262K から選択される。これらの位置／置換は、独立して、クロマチンを分解する活性などのより良好な活性を提供することができる。

10

20

30

40

50

【0083】

様々な実施形態において、酵素がQ31RまたはT227Kの置換を含む場合、酵素は、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、及びK280Mから選択される少なくとも2つのアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換には、配列番号1に関してQ31R及びT227Kが含まれる。

【0084】

いくつかの実施形態では、DNase酵素は、配列番号1の31、49、79、及び209位に対応する位置にアルギニンまたはリジンを有し、場合により以下のアミノ酸置換を含み得る：Q31R、Q49K、Q79R、及びW209R。これらの位置は、マウスD1ではアルギニンまたはリジンを保持するが、野生型ヒトD1においては保持しておらず、クロマチン分解活性をヒトD1に転移させることができる。

【0085】

いくつかの実施形態では、DNase酵素は、配列番号1の31、49、79、177、209、及び262位に対応する位置にアルギニンまたはリジンを有し、場合によりアミノ酸置換Q31R、Q49K、Q79R、A136F、Q177K、W209R、G262Kを含み得る。これらの位置のうち4つは、ラットD1ではアルギニンまたはリジンを保持するが、野生型ヒトD1においては保持しておらず、共同でクロマチン分解活性をヒトD1に転移させることができる。

【0086】

いくつかの実施形態では、DNase酵素は、配列番号1の31及び227位に対応する位置にリジンまたはアルギニン残基を有する。

【0087】

いくつかの実施形態では、DNase酵素は、配列番号1の164位に対応する位置にリジンまたはアルギニンを有し、これは場合によりリジン（A164K）である。

【0088】

様々な実施形態において、改変型D1タンパク質は、アクチン結合部位（例えば、A136の置換、例えばA136F）に1つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、付加、及び欠失）を含み、それによりアクチン結合を妨害するかまたは予防する。そのように、改変型D1タンパク質は、アクチン耐性または実質的にアクチン耐性であり得る。Ulmer et al., PNAS USA Vol. 93, pp 8225-8229 (1996)を参照のこと。したがって、様々な実施形態において、DNase酵素は、配列番号1に関して136位にアミノ酸置換を含み、これは場合によりA136Fである。アクチン耐性を提供するD1への変異、例えば、136位での変異（例えば、A136F、またはこの位置での別のかさ高い、疎水性、環状または芳香族アミノ酸の置換）を、カチオン性残基の付加またはビルディングブロック置換を含む本明細書に記載の他の変異と組み合わせてもよい。

【0089】

いくつかの実施形態では、D1バリエーションはアクチン阻害に耐性があり、クロマチンを分解することができる。例えば、D1バリエーションは、配列番号1に関して以下のアミノ酸置換：Q31R、T227K、及びA136Fを含み得る。いくつかの実施形態では、DNase酵素は、以下のアミノ酸置換：A164K及びA136Fを含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、DNase酵素は、配列番号1に関してN40S置換及び／またはN128S置換を含むグリコシル化コンセンサス配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号1に関してアミノ酸置換：Q31R、N40S、A136F、N128S、及びT227Kを含む。

10

20

30

40

50

【0091】

様々な実施形態において、D1バリエーションは、グリコシル化部位に1つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、付加、挿入、及び欠失）を含み、それにより脂質封入DNAに対する親和性を増加させる。そのため、改変型D1タンパク質は、トランスフェクション反応において脂質封入DNAを分解することができる。Wilber et al., Mol Ther 6, 35-42 (2002) 参照。

【0092】

様々な実施形態において、D1バリエーションは、グリコシル化されているか、または、特に、長い循環半減期が必要とされない場合ではグリコシル化されていなくてもよい。本明細書に記載のアミノ酸の変化は、グリコシル化または非グリコシル化バリエーションに関して行うことができる。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、D1バリエーションはアクチン阻害に耐性であり、脂質小胞内のクロマチンを分解することができる。例示的なD1バリエーションは、配列番号1に従って付番したアミノ酸で：Q31R、T227K、A136F、N40DまたはN40A、及びN128DまたはN128Sから選択される1つ以上のアミノ酸改変を含む。そのようなバリエーションはグリコシル化部位を欠いている場合があり、これは製造の観点からは有利である。

【0094】

いくつかの実施形態では、D1バリエーションはアクチン阻害に耐性であり、脂質小胞内のクロマチンを分解することができ、配列番号1に関してアミノ酸改変Q31R、T227K、A136F、N40D、及びN128Dを含む。

20

【0095】

D1に対する他の改変は、その開示全体を参照により本明細書に援用するJ Biol Chem, 1998, 273, 11701-11708及びUS2014/0199329に記載されている通りであり得る。

【0096】

改変型D1バリエーションは、野生型D1タンパク質（配列番号1）に比べて、血清半減期を増加、すなわち延長させることができる。いくつかの実施形態では、改変型D1は、Fc融合ドメイン（例えば、免疫グロブリンのヒンジ領域、及び／またはCH2ドメイン及びCH3ドメイン）を含む。いくつかの実施形態では、改変型D1を、アルブミン、例えば、ヒトアルブミンまたはその断片に融合する。アルブミンは、場合によりアミノ酸リンカーを介して、改変型D1酵素のN末端またはC末端に結合させることができる。

30

【0097】

いくつかの態様では、本発明は、組換えD1L3及び／またはD1バリエーション、またはそれをコードするポリヌクレオチドもしくはベクター、及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。様々な実施形態において、組換えD1L3タンパク質バリエーションを、非経口投与または肺投与用に製剤化する。いくつかの実施形態では、組成物を、静脈内、動脈内、腹腔内、関節内、筋肉内、局所、もしくは皮下投与、または本明細書に記載の他の経路用に製剤化する。いくつかの実施形態では、組成物は、それぞれ場合により本明細書に記載の改変型バリエーションであるD1L3及びD1の両方を含む。いくつかの実施形態では、組換えD1L3バリエーション及び組換えD1バリエーションを、非経口投与または肺投与用に製剤化する。

40

【0098】

用語「薬学的に許容される担体」には、成分の生物学的活性の有効性を妨げず、それを投与する患者に対して毒性がない任意の担体が含まれるが、これらに限定されない。適切な医薬担体の例は当技術分野で周知であり、リン酸緩衝生理食塩水、水、油／水乳剤などの乳剤、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。そのような担体は、従来の方法で製剤化することができ、適切な用量で対象に投与することができる。好ましくは、組成物は無菌である。また、これらの組成物に、防腐剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュ

50

バントを含ませてもよい。様々な抗菌剤及び抗真菌剤を含ませることにより、微生物の作用を確実に予防してもよい。

【0099】

投与経路として、例えば：皮内、筋肉内、腹腔内、関節内、静脈内、皮下、動脈内、経口、舌下、肺、または経皮が挙げられる。いくつかの実施形態では、投与は、経口的に、または非経口注射もしくは注入により行う。いくつかの実施形態では、投与経路は、点眼薬または洗口剤としてなど、局所的である。

【0100】

さらに他の態様では、本発明は、好中球細胞外トラップ（NET）蓄積を低減または予防するための医薬組成物の製造方法を提供する。これらの実施形態では、本発明は、D1及びD1L3活性を欠く遺伝子改変マウス、ならびにG-CSFポリヌクレオチドの異種発現（例えば、肝細胞内の）または持続的な内在性G-CSF発現の誘導（例えば、微生物化合物の反復投与による）を用いる。このマウスモデルはNETを蓄積し、NET関連の血管閉塞を急速に発症する。これらの実施形態では、本発明は、候補NET阻害剤または候補DNase酵素（本開示によるD1L3またはD1バリエーションを含む）を遺伝子改変マウスに投与し、NETの蓄積を減少させるNET阻害剤またはDNase酵素を選択することを含む。選択された阻害剤または酵素を、ヒト患者への投与のために製剤化する（記載するように）。

【0101】

当業者であれば、ダブルノックアウトDnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスを生成するための標準的な方法を認識している。詳細な説明は、例えば欧州出願第EP17152528.0に見出すことができる。

【0102】

いくつかの態様では、本発明は、好中球細胞外トラップ（NET）分解を必要とする対象の治療方法を提供する。方法は、本開示に従って治療有効量のD1L3及び／またはD1（D1L3及びD1の併用療法のためのものを含む、本明細書に記載のバリエーション、またはいくつかの実施形態では1つ以上の野生型酵素を含み得る）を投与することを含む。D1L3またはD1は、組換えタンパク質を含むか、またはいくつかの実施形態では、コードするDNAもしくはRNAまたはそれを含むベクターを含む医薬組成物として投与してもよい。

【0103】

いくつかの実施形態では、方法は、治療有効量のD1L3またはそのバリエーション及びD1またはそのバリエーションを投与することを含む。D1L3またはそのバリエーション、及びD1またはそのバリエーションは、単一の医薬組成物または別個の医薬組成物で投与してもよい。いくつかの実施形態では、D1L3またはそのバリエーションとD1またはそのバリエーションの比は、質量で100：1～1：100、または質量で10：1～1：10の範囲であり、場合により約1：1である。

【0104】

いくつかの実施形態では、対象は、NET分解の不全及び／またはNET蓄積の異常を示す。いくつかの実施形態では、対象は、慢性または急性炎症性障害を有する。いくつかの実施形態では、対象は、急性または慢性感染症を有する。

【0105】

様々な実施形態において、本発明は、NETの存在または蓄積を特徴とする疾患または病態の治療に関する。そのような疾患または病態として、慢性好中球増加症（例えば、好中球数の増加）、好中球凝集及び白血球停滞、血栓症及び血管閉塞（例えば、鎌状赤血球症）、虚血再灌流障害（例えば、腸軸捻転、精巣捻転、四肢虚血再灌流、重要臓器虚血再灌流、臓器移植）、外科的及び外傷性組織損傷、急性または慢性炎症反応または疾患、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、関節リウマチ、血管炎、全身性硬化症）、心血管疾患（例えば、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血栓溶解療法を含む静脈血栓塞栓症）、代謝性疾患（例えば、糖尿病）、全身性

10

20

30

40

50

炎症（例えば、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症、敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群（DIC）、及び血栓性微小血管障害（TMA））、気道の炎症性疾患（例えば、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、急性肺損傷（ALI）、喫煙性肺損傷、輸血関連急性肺損傷（TRALI）、急性呼吸促迫症候群（ARDS）、及び喘息、無気肺、気管支炎、膿胸）、腎炎症性疾患（急性腎障害（AKI）及び慢性腎疾患（CKD）を含む急性及び慢性腎疾患、移植組織に関連する炎症性疾患（例えば、移植片対宿主病）ならびにがん（例えば、白血病、腫瘍転移、及び固形腫瘍）に関連する疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

いくつかの実施形態では、対象は、管系を閉塞するNETを有するか、またはそのリスクがある。本発明は、膵炎、胆管炎、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を治療するために対象に投与することができる。そのような実施形態では、方法は、治療有効量のD1L3またはそのバリエーション、及び／または治療有効量のD1またはそのバリエーションを投与することを含む。例えば、対象に、配列番号2により定義される酵素に対して80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する酵素、及び配列番号1により定義される酵素に対して80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する酵素を投与してもよい。いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号2により定義される酵素のアミノ酸配列及び配列番号1により定義される酵素のアミノ酸配列を有する。

【0107】

いくつかの実施形態では、管系は、胆管、涙管、乳管、胆嚢管、肝管、射精管、耳下腺管、顎下腺管、大舌下腺管、バルトリン管、中脳水道、膵臓、乳腺、輸精管、尿管、膀胱、胆嚢、及び肝臓である。例えば、対象は、膵炎、胆管炎（例えば、原発性硬化性胆管炎）、結膜炎、乳腺炎、ドライアイ疾患、輸精管の閉塞、または腎疾患を有している場合がある。いくつかの実施形態では、DNase酵素は、静脈内、動脈内、または腹腔内投与により投与する。様々な実施形態において、DNaseは、例えば静脈内に投与する場合、様々な管系において、例えば胆汁液中で酵素的に活性な形態で存在する。

【0108】

いくつかの実施形態では、対象は、内皮表面（例えば、術後癒着）、皮膚（例えば、創傷／癒着）、または滑膜関節（例えば、痛風及び関節炎）に蓄積するNETを有するか、またはそのリスクがある。本発明を対象に投与して、限定するものではないが術後癒着などの内皮表面上のNETの蓄積を特徴とする病態を治療することができる。様々な実施形態において、本発明を対象に投与して、限定するものではないが創傷及び癒着などの皮膚上のNETの蓄積を特徴とする病態を治療することができる。特定の実施形態では、本発明を対象に投与して、限定するものではないが痛風及び関節炎などの滑膜関節におけるNETの蓄積を特徴とする病態を治療することができる。

【0109】

いくつかの実施形態では、対象は、NETを含む血管閉塞を有するか、またはそのリスクがある。そのような実施形態では、方法は、治療有効量のD1L3またはそのバリエーション、及び／または治療有効量のD1またはそのバリエーションを投与することを含む。例えば、対象に、配列番号2により定義される酵素に対して80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する酵素を投与してもよい。いくつかの実施形態では、酵素は、配列番号2によって定義される酵素のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、対象に、配列番号1によって定義される酵素に対して80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する酵素、例えば、配列番号1によって定義される酵素をさらに投与する。

【0110】

いくつかの実施形態では、対象は、参照によりその全体を本明細書に援用するWO 2016/118476及びUS 9,642,822に記載されるようなNETに関連する病態を有する。

【0111】

様々な実施形態において、対象は、D1及びストレプトドルナーゼを含む野生型DNA

10

20

30

40

50

s eで治療するか、または治療された疾患を有する。そのような疾患または病態として、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、脾炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷、胸水滲出、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査、肺炎球菌性髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、及び閉塞性肺疾患が挙げられる。

10

【0112】

特定の実施形態では、本発明は、D 1の欠損、D 1 L 3の欠損、ならびにD 1及びD 1 L 3の欠損を特徴とする疾患または病態の治療に関する。いくつかの場合では、対象はD n a s e 1及び／またはD n a s e 1 l 3遺伝子に変異を有する。そのような対象はまた、自己免疫疾患（例えば、S L E、全身性硬化症）または炎症性疾患を有し得る。いくつかの場合では、対象は、後天性のD 1阻害剤（例えば、抗D N a s e 1抗体及びアクチン）及び／またはD 1 L 3（例えば、抗D N a s e 1 l 3抗体）を有する。そのような対象はまた、自己免疫疾患（例えば、S L E、全身性硬化症）または炎症性疾患（例えば、敗血症及び虚血再灌流損傷）を有し得る。

【0113】

いくつかの実施形態では、対象は嚢胞性線維症を有しており、D N a s e組成物を肺送達により投与する。

20

【0114】

様々な実施形態において、例えば、対象がN E T関連血管閉塞のリスクがあるか、またはN E T関連血管閉塞の症状を示す場合、タンパク質または組成物（例えば、D 1 L 3、D 1、または本明細書に記載のバリエーションを含むD 1 L 3もしくはD 1のバリエーションを含む）を、静脈内、筋肉内、皮下、または動脈内に投与してもよい。

【0115】

様々な実施形態において、血液、血漿、または血清のN E T分解活性について対象をモニタリングする。例えば、対象を、約1週間～約4週間モニタリングし、N E Tによる血管閉塞もしくは管閉塞、またはN E Tに関連した臓器損傷のリスクを低減する。いくつかの実施形態では、必要に応じて、対象に1週間～1か月（または1～2週間）にわたって1～4回投与して、急性感染または炎症事象時の血管内N E T蓄積（N E T関連血管内閉塞を含む）を予防または低減してもよい。他の実施形態では、対象に、1時間～1か月（または1～2週間）にわたって継続的に注入してもよい。いくつかの場合では、敗血症、脳卒中、または心筋梗塞などの重篤な疾患の場合、対象に、毎日少なくとも1回、例えば（限定するものではないが）、1、2、3、4回またはそれ以上の注入を与えてもよい。

30

【0116】

N E T関連疾患または病態の治療は、D 1バリエーション、D 1 L 3バリエーション、またはD 1バリエーションとD 1 L 3バリエーションを含む併用の投与を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のD 1タンパク質の2つ以上のバリエーションを投与する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のD 1 L 3タンパク質の2つ以上のバリエーションを投与する。

40

【0117】

本発明のD 1タンパク質バリエーション及びD 1 L 3タンパク質バリエーションは、予防療法として、例えば、疾患または病態の1つ以上の症状の発症前に投与することができる。

【0118】

本明細書中で使用する場合、「治療」または「治療すること」または「治療する」とは、望ましくない生理学的病態、障害もしくは疾患を遅らせる（軽減する）か、または有益もしくは望ましい臨床結果を得ることを目的とした治療処置を指す。有益または望ましい臨床結果として、症状の緩和；病態、障害または疾患の程度の減弱；病態、障害または疾

50

患の状態の安定化（すなわち、無増悪）；病態、障害または疾患の発症の遅延または進行の遅延；病態、障害または病状の改善；及び検出可能か検出不能かに関わらず、病態、障害または疾患の寛解（部分的または全体的）、または増強もしくは改善が挙げられるが、これらに限定されない。治療には、過剰なレベルの副作用を伴わずに臨床的に有意な応答を誘発することが含まれる。他の実施形態では、「治療」または「治療すること」または「治療する」とは、予防措置を指し、その場合、例えば、疾患の素因がある個人（例えば、ループスなどの疾患の遺伝マーカーを保有している個人）における望ましくない生理学的病態、障害もしくは疾患の発症を遅らせるか、または重篤度を軽減することを目的とする。

【0119】

本発明の方法において、治療は、疾患または病態に関して陽性の治療反応を提供するために使用する。「陽性の治療反応」とは、疾患または病態の改善、及び／または疾患または病態に関連する症状の改善を意味する。例えば、陽性の治療反応とは、疾患における以下の改善の1つ以上を指す：（1）好中球細胞外トラップの減少；（2）血管内血餅の減少；（3）管血餅の減少；（4）滑膜関節におけるNETの蓄積の減少；（5）好中球細胞外トラップの分解の増加；（6）細胞外のタンパク質フリーDNAの分解の増加；（7）細胞外染色体DNAまたはタンパク質結合DNAの分解の増加；（8）自己抗体の存在下での好中球細胞外トラップの分解の増加；（9）組織／臓器の炎症の減少；（10）組織／臓器の損傷の減少；（11）組織／臓器の萎縮の減少；（12）患者の生存率の増加；及び（13）疾患または病態に関連する1つ以上の症状の軽減。

【0120】

所与の疾患または病態における陽性の治療反応は、その疾患または病態に特有の標準化された応答基準によって判定することができる。磁気共鳴画像（MRI）検査、超音波検査、組織学、及び循環中のNETのカウントなどのスクリーニング技術を使用して、血管閉塞の変化及びNETの存在について臨床反応を評価することができる。これらの陽性の治療反応に加えて、治療を受けている対象は、疾患に関連する症状の改善という有益な効果を経験する場合がある。

【0121】

投与計画は、最適な所望の応答（例えば、治療反応）を提供するように調整される。例えば、治療状況の緊急性によって示されるように、単一のボラスを投与してもよく、数回に分けた用量を経時的に投与してもよく、用量を比例的に増減してもよい。非経口組成物は、投与の容易さ及び用量の均一性のために単位剤形で製剤化してもよい。本明細書中で使用する単位剤形は、治療する対象に対する単位用量として適した物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要な医薬担体を伴って所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性化化合物を含む。

【0122】

様々な実施形態において、本発明は、遺伝子治療に用途を見出し得る、本明細書に記載の野生型またはD1L3もしくはD1バリエーションをコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。遺伝子治療は、D1L3及び／またはD1の遺伝的欠損（例えば、有害な変異）などの慢性疾患に有用であり得る。様々な実施形態において、発現ベクターはDNAまたはRNAを含む。様々な実施形態において、発現ベクターは哺乳類発現ベクターである。

【0123】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、宿主細胞（例えば、原核生物、真核生物、または哺乳類細胞）内で機能する発現制御領域、またはその相補領域に作動可能に連結したタンパク質バリエーションをコードする核酸を含む。発現制御領域は、遮断薬及び／または刺激薬をコードする核酸の発現を駆動することができ、その結果、発現ベクターで形質転換したヒト細胞内で遮断薬及び／または刺激薬が産生される。

【0124】

発現制御領域は、作動可能に連結した核酸の発現に影響を及ぼすプロモーター及びエンハンサーなどの調節性ポリヌクレオチド（本明細書中ではエレメントと呼ばれることもあ

10

20

30

40

50

る)である。本発明の発現ベクターの発現制御領域は、ヒト細胞内で作動可能に連結したコード核酸を発現することができる。一実施形態では、発現制御領域は、作動可能に連結した核酸に調節可能な発現を付与する。シグナル(刺激と呼ばれることもある)は、そのような発現制御領域に作動可能に連結した核酸の発現を増加または減少させることができる。シグナルに応答して発現を増加させるそのような発現制御領域は、多くの場合、誘導性と呼ばれる。シグナルに応答して発現を減少させるそのような発現制御領域は、多くの場合、抑制性と呼ばれる。通常、そのようなエレメントによってもたらされる増加または減少の量は、存在するシグナルの量に比例する;シグナル量が多いほど、発現の増加または減少は大きくなる。

【0125】

ヒト細胞内で機能する発現系は当技術分野で周知であり、ウイルス系が含まれる。一般的に、ヒト細胞内で機能するプロモーターは、哺乳類RNAポリメラーゼに結合し、下流(3')のコード配列のmRNAへの転写を開始させることができる任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端の近位に位置する転写開始領域、及び通常、転写開始部位から25~30塩基対上流に位置するTATAボックスを有する。TATAボックスは、RNAポリメラーゼIIに、正しい位置でRNA合成を開始するようにさせると考えられている。プロモーターはまた、通常、TATAボックスの上流100~200塩基対内に通常位置する上流プロモーターエレメント(エンハンサーエレメント)を含む。上流のプロモーターエレメントは、転写が開始される速度を決定し、いずれの方向にも作用することができる。プロモーターとして特に有用なのは哺乳類ウイルス遺伝子由来プロモーターであるが、これはウイルス遺伝子が、多くの場合に高度に発現し、広い宿主範囲を有するためである。例として、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、及びCMVプロモーターが挙げられる。

【0126】

適切な場合、例えば組み込み配列などの遺伝子送達剤も使用することができる。多数の組み込み配列が当技術分野で公知である(例えば、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, 2003参照)。これらには、リコンビナーゼ及びトランスポザーゼが含まれる。例として、Cre (Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981)、lambda (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 (Groth et al., J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004)、sleeping beauty、マリナーファミリーのトランスポザーゼ (Plasterk et al., 上記)、及びAAV、レトロウイルスなどのウイルスを組み込むための構成要素、ならびにレトロウイルスまたはレンチウイルスのLTR配列及びAAVのLTR配列などのウイルス組み込みを提供する構成要素を有する抗ウイルス (Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)が挙げられる。さらに、CRISPR/CAS9、ジンクフィンガー、TALEN、メガヌクレアーゼ遺伝子編集技術を含む、直接及び標的化遺伝子組み込み戦略を使用して、キメラ融合タンパク質をコードする核酸配列を挿入してもよい。

【0127】

引用する全参考文献を、参照により明示的にその全体を本明細書に援用する。

【実施例】

【0128】

実施例1：宿主DNaseは、好中球細胞外トラップによる血管閉塞を予防する

血小板及びフィブリンの血餅は、止血及び血栓症の血管を閉塞する。本明細書において、活性化好中球によって放出される抗菌DNA繊維である好中球細胞外トラップ（NET）に基づく血管閉塞の非標準的なメカニズムを報告する。2つのDNase、DNase 1及びDNase 1様3が、マウスの炎症のエピソード中に、循環中でNETを分解することを示す。両方のDNaseが存在しない場合、血管内NETは血餅を形成し、これは血管を閉塞させ、臓器損傷を引き起こす。重度の細菌感染症の患者における血管閉塞は、*ex vivo*でのNET分解の欠損及び血管内NET血餅の形成に関連している。DNase 1及びDNase 1様3は独立して発現し、したがって炎症におけるNETの有害な影響に対する二重の宿主保護を提供する。

10

【0129】

炎症は、侵入する微生物を制御し、損傷した組織を治癒するために不可欠な宿主応答である（1）。制御されない持続的な炎症は、過剰な炎症性障害で組織損傷を引き起こす。好中球は、急性炎症における主要な白血球である。感染中に、好中球は細胞外トラップ（NET）、毒性ヒストンで装飾されたDNAフィラメントの格子ならびに細菌を固定化及び中和する酵素を生成する（2）。宿主保護におけるNETの関連性は、細胞外DNaseがいくつかの病原性細菌において病原性因子として機能するという事実によって説明される（3、4）。しかしながら、不適切に放出されるNETは、それらの細胞毒性、炎症誘発性、及び血栓形成促進活性により、宿主細胞に害を及ぼし得る（5～7）。実際、NETは炎症性または虚血性の臓器損傷に頻繁に関連付けられており、DNaseの治療的注入は様々な動物モデルの宿主損傷を制限する（8、9）。

20

【0130】

炎症のエピソード中の組織損傷を制限するために、宿主が*in vivo*でどのようにNETを分解するかはよくわかっていない。以前の研究では、血清中のDNase 1が*in vitro*でNETのDNAバックボーンを消化することが示されている（10）。ザイモグラフィーによって野生型マウス由来の血清を分析し、2つの酵素的に活性なDNase、DNase 1及びDNase 1様3〔（DNase 1_{l3}）（図1A）を検出した。両方の酵素はDNase 1タンパク質ファミリーのメンバーであるが、その起源と基質親和性が異なる。DNase 1は非造血組織で発現し、タンパク質フリーDNAを優先的に切断する（11、12）。DNase_yとしても知られるDNase 1_{l3}は、免疫細胞によって分泌され、ヌクレオソームなどのDNA-タンパク質複合体を標的とする（11、13）。DNase 1とDNase 1_{l3}の複合欠損により血清中のDNA分解活性を欠くマウスを作成した（図1A）。*in vitro*で生成されたNETは、DNase 1/DNase 1_{l3}—血清への曝露後にインタクトなままであったが、一方、野生型、DNase 1—、及びDNase 1_{l3}—マウス由来の血清はNETを分解した（図1B及び図1C）。肝細胞特異的発現プラスミドをハイドロダイナミックな遺伝子送達と組み合わせることで、DNase 1/DNase 1_{l3}—マウスの肝臓においてDNase 1またはDNase 1_{l3}のcDNAを安定的に発現させた。両方の酵素が分泌タンパク質シグナル配列を含むことを考えると（11）、このアプローチは循環中のDNase 1またはDNase 1_{l3}の活性を回復させ（図1D）、DNase 1/DNase 1_{l3}—マウス由来の血清がNETを分解する能力を回復させた（図1E及び図1F）。まとめると、これらのデータは、独立して発現する2つの宿主酵素DNase 1及びDNase 1_{l3}が*in vitro*でNETを分解することを示す。

30

40

【0131】

*in vivo*でのNET分解に対するDNase 1及びDNase 1_{l3}の必要性を試験するために、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）により、野生型、DNase 1—、DNase 1_{l3}—及びDNase 1/DNase 1_{l3}—マウスを慢性的に刺激することを目的とした。G-CSFは、急性炎症の特徴である好中球増加を引き起こし、好中球の亜集団を刺激して、*ex vivo*でNETを自発的に放出する（1

50

4)。G-CSFをコードするCSF3のcDNAを肝細胞特異的発現プラスミドにクローニングした。CSF3-プラスミドを野生型マウスにハイドロダイナミックインジェクションすると、血漿中のG-CSFレベルが慢性的に上昇した(図5A)。その結果、好中球の血球数は着実に増加し、血液塗抹において自発的に形成されたNETが検出された(図2A及び図2B)。さらに、重要臓器及び脾腫における常在性好中球の数の増加が観察された(図5B及び図5C)。重要なことに、CSF3を注射した野生型マウスは正常に成長し、臓器損傷を発症せず、苦痛または異常行動の肉眼的徴候を示さなかった(図5D及び図5E)。まとめると、これらのデータは、NET形成を併発する慢性好中球増加症が野生型マウスにおいて十分に忍容されることを示唆している。

【0132】

次に、本発明者らは、DNase1^{-/-}、DNase1^{l3}^{-/-}、及びDNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスの肝臓においてCSF3を安定的に発現させた。DNase1またはDNase1^{l3}の単一の欠損を有するマウスは苦痛の徴候を示さなかった(未記載)が、複合欠損を有するすべてのマウスはCSF3注射後6日以内に死亡した(図2C)。CSF3を欠く対照プラスミドを投与したDNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスは、異常を示すことなく生存した(図2C、未記載)。DNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスにおいてDNase1またはDNase1^{l3}をCSF3と共発現させて、好中球及びNETを誘導し、同時に循環中のDNase1またはDNase1^{l3}を復元させた。いずれかのDNaseの発現は、DNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスが苦痛の徴候を示すことなく生存するのに十分であった(図2D)。DNase1及びDNase1^{l3}を欠く対照プラスミドとCSF3を共発現するDNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスは、遺伝子送達後5日以内に死亡した(図2D)。これらのマウスの致死に対し、急速に進行する低体温症が先行していたが、これは、転帰前の8時間以内の末梢体温の強い低下として示された(図2E)。低体温は、赤みを帯びた血漿及び尿によって示される溶血性貧血及び血中ヘモグロビンの減少を伴っていた(図2F及び図2G)。血液塗抹中の豊富な破碎赤血球は、溶血性貧血が赤血球の断片化によって引き起こされたことを示した(図2H)。さらに、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、肝臓トランスアミナーゼ、ならびに腎臓損傷マーカーの血中尿素窒素及びクレアチニンの血漿レベルの上昇が検出され、複数の臓器損傷が示された(図2I、図6A、及び図6B)。DNase1またはDNase1^{l3}とCSF3の共発現は、体温及び赤血球及び臓器の完全性を維持した(図2E~図2I; 図6A及び図6B)。結論として、これらのデータは、DNase1またはDNase1^{l3}のいずれかが慢性好中球増加症時の宿主損傷を予防するために必要であることを示している。

【0133】

慢性好中球増加症のDNase1/DNase1^{l3}^{-/-}マウスの組織学的分析により、赤血球が封入された血管内ヘマトキシリン陽性血餅が示されたが(図3A及びB; 図6C及び図6D)、これは、肺、肝臓、及び腎臓の血管を完全または部分的に閉塞する。循環中のDNase1またはDNase1^{l3}の発現は、これらの血管閉塞を予防した。ヘマトキシリン陽性血餅は、個々の白血球核の濃い紫色の染色で散発的に点在する豊富な薄紫色の染色パターンを示し、脱凝縮したDNAが主要な血餅成分であることが示唆された(図3A)。核の崩壊と密に詰まったクロマチンのアンフォールディングがNET形成の特徴であることから(15)、NETマーカーのヘマトキシリン陽性血餅を染色した。蛍光二本鎖DNAインターカラー色素及びクロマチンに対する抗体による強固な染色が観察された(図7A)。脱凝縮したクロマチンと、好中球顆粒由来酵素であるミエロペルオキシダーゼ、抗菌性カテリシジンペプチド、及びNET代替マーカーであるシトルリン化ヒストンとの共局在化により、血餅がNETからなることが確認された(図3C、図7B及び図7C)。標準的な血栓の成分を同定するために、フィブリン、ならびに血小板の分泌小胞及び血管内皮に格納されているタンパク質であるフォンウィルブランド因子(vWF)のNET血餅を染色した。NET血餅は、vWF及びフィブリン含量が非常に不均一であった(図3D及び図3E)。NET血餅の断面は平均して46%がvWFで覆わ

10

20

30

40

50

れていたが、NET血餅の9%はvWFを染色しなかった(図3E及び図3F)。フィブリンはほとんど存在せず、閉塞血管の23%未満で検出されただけであった(図3E)。これらのデータは、NETが*in vitro*で血小板と赤血球を固定化するためのフィブリン非依存的な足場として機能するという発見と一致する(6)。いくつかの血餅にvWFとフィブリンが存在しないことは、NETが血管閉塞にとって十分であり得ることを示唆している。この考えを裏付けるために、純粋な好中球から*in vitro*でNET血餅を生成することを目指した。細胞をせん断力にさらして血流を模倣しながら、血液から好中球を分離し、NET形成を誘発した。このセットアップでは、肉眼で見ることができるDNase感受性の血餅(図8A)が観察されたが、これはマウスの血管内のNET血餅の外観(図8B)に似ていた。CSF3を発現するDNase1/DNase1 β 3-/-マウスにおいて、血小板を循環から枯渇させ、トロンبینを薬理的に阻害してフィブリン形成を遮断した。DNase1-またはDNase1 β 3-/-発現とは異なり、抗血栓治療はどちらもこれらの動物の死亡を予防することができなかった(図3H)。まとめると、データは、DNase1/DNase1 β 3-/-マウスの慢性好中球増加症時に、NET血餅が血管を閉塞するのに十分であることを示唆している。

【0134】

DNase1/DNase1 β 3-/-マウスにおけるNET血餅の形成は、血管閉塞による破砕赤血球、溶血性貧血、及び臓器不全を含む、患者における感染誘発性血栓性微小血管症(TMA)及び播種性血管内凝固の特徴と関連している。志賀毒素産生性*Escherichia coli* [STEC-HUS, (16)]の感染による溶血性尿毒症症候群のTMA患者由来の血漿を分析した。これらの患者における高頻度の合併症は、敗血症と敗血症性ショックであった(17)。*in vitro*で生成されたNETは、急性疾患状態の患者から採取した血漿への曝露後もインタクトなままであったが、一方、寛解状態の患者由来の血漿はNETを分解した(図9A及び図9B)。このデータは、NET分解における一時的で後天的な欠損を示しているため、以前の報告を拡張するものとなる(18, 19)。注目すべきことに、STEC-HUS患者は、NET分解を潜在的に回復させるDNaseの供給源である健康なドナー由来の血漿の注入を含むレジメンで効果的に治療された(17)。

【0135】

NETの大きな凝集体は、患者の滑液及び脾管で形成されると報告されている(21, 22)が、他の組織ではまだ記載されていない。したがって、重度の炎症性疾患の患者におけるNETの血管内凝集体を特定することを目的とした。急性呼吸促迫症候群及び/または敗血症の患者から剖検で採取した肺組織をスクリーニングした(図10)。2名の敗血症患者の血管においてヘマトキシリン陽性血餅を検出した(図11A及び図11C)。両方の場合において、血餅はクロマチン及びMPOからなっていたが(図11B及び図11D)、このことはNETがヒト敗血症において血管内血餅を形成することができることを示している。

【0136】

敗血症は、マウスにおける血管内NET形成の強力かつ急速なトリガーである(7)。したがって、NET分解の欠損が疾患を悪化させ得るという仮説を立てた。実際、DNase1とDNase1 β 3の複合欠損を有するマウスは、低用量リポ多糖及び熱殺菌*E. coli*に高感受性であったが、野生型マウスではそうではなかったことが観察された(図4A)。好中球DNase1/DNase1 β 3-/-マウスと同様に、敗血症DNase1/DNase1 β 3-/-マウスの血液分析は、溶血性貧血及び血尿(図4B及び図4C)とともに、血液塗抹における血漿LDH及び破砕赤血球のレベルの増加(図4D及び図4E)を示した。さらに、肺内において豊富な部分的または完全に閉塞した血管を検出した(図4F及び図4G)。部分的に閉塞した血管の詳細な分析により、血管内腔内のNET血餅が明らかになった(図4H)。完全に閉塞した血管内で、NET血餅は、封入された赤血球及び白血球で鬱血していた(図4I; 図12A及び図12B)。重要なことに、DNase1/DNase1 β 3-/-マウスにおけるDNase1またはDNase1 β 3の欠損は、敗血症の死亡率を低下させた(図12C)。

10

20

30

40

50

s e 1 l 3 の肝発現は、血管閉塞を予防し、野生型の表現型を回復させた。まとめると、これらのデータは、循環 D N a s e 1 または D N a s e 1 l 3 が敗血症における N E T 血餅の形成及び宿主損傷を予防することを示している。

【0137】

まとめると、血小板及びフィブリンは止血性血餅及び病理学的血栓を形成するが（23）、本発明者らのデータは、炎症状態における血管閉塞の非標準的なメカニズムとして N E T 血餅を導入する。フィブリン鎖と同様に、N E T は超大型で安定した分子である（6）。慢性好中球増加症または敗血症などに認められるような高濃度では、血管内 N E T が血餅を形成する場合があります、これは血管を閉塞するのに十分な大きさであるため、赤血球及び臓器を損傷する。炎症中に血液と組織の完全性を維持するために、宿主は、血管内 N E T に対する二重保護システムとして D N a s e 1 と D N a s e 1 l 3 を独立して発現する。しかしながら、これらの宿主因子の後天的及び遺伝的欠損は、N E T 分解を遅らせ、したがって疾患を促進し得る。後天的な欠損には、損傷した組織から外在化する単量体アクチンによる D N a s e 1 阻害、及び血清プロテアーゼによる D N a s e 1 l 3 の不活性化が含まれ得る（11）。D N a s e 1 及び D N a s e 1 l 3 の変異は患者で同定されており、全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（S L E）に関連している（24, 25）。興味深いことに、D N a s e 1 及び D N a s e 1 l 3 欠損マウスは、加齢とともに自発的に S L E 様疾患を発症する（13, 26）。N E T は著名な自己抗原からなり、S L E 患者由来の好中球は N E T を放出する能力が増加している（27）。クリアランス能力の低下は、N E T の半減期を増加させ、したがって自己免疫疾患を促進し得る（10, 27）。結論として、宿主 D N a s e の欠損は、過剰な炎症性疾患における N E T の有害な影響をもたらし得る。

【0138】

結果として、D N a s e 1 及び D N a s e 1 l 3 を介した N E T 分解は、炎症状態を患う患者に魅力的な治療機会を提供する。D N a s e 1 と D N a s e 1 l 3 が同じかまたは別個のメカニズムによって N E T を分解するかどうかを試験するために、固定液を使用して N E T のタンパク質を架橋した。固定化した N E T は D N a s e 1 l 3 — / — 血清により効率的に分解されたが、D N a s e 1 — / — 血清による分解には耐性があった（図13A及び図13B）。これらの結果に則して、組換え D N a s e 1 または D N a s e 1 l 3 への N E T の曝露により、両方の D N a s e がナイーブ N E T を分解し（図13C及び図13D）、一方、固定化 N E T は D N a s e 1 l 3 活性に耐性である（図13E及び図13F）ことが示された。まとめると、これらの *i n v i t r o* データは、D N a s e 1 と D N a s e 1 l 3 が異なるメカニズムを介して N E T を分解することを示唆している。

【0139】

最後に、循環における D N a s e 1 及び D N a s e 1 l 3 の活性を、マウスとヒトとで比較した。D N a s e 1 及び D N a s e 1 l 3 活性を識別するために、正常な健康なドナー（N H D）由来の血漿中の D N a s e 1 活性を遮断するヒト D N a s e 1（ α -h D N a s e 1）に対する抗体を生成した（図14A）。ヘパリンは D N a s e 1 l 3 の公知の阻害剤であり、D N a s e 1 l 3 による DNA 分解活性を遮断するために使用した（図14B）。マウス血漿は、ヒト血漿よりもおよそ10倍高い総 D N a s e 活性（図14C）、D N a s e 1 活性（図14D）、及び D N a s e 1 l 3 活性（図14E）を示した。さらに、マウス血漿中の D N a s e 1 l 3 は N E T を効率的に分解したが、ヒト血漿中の D N a s e 1 l 3 はそうではなかった（図14F及び図14G）。データは、ヒトの循環中における D N a s e 1 l 3 の濃度が N E T を分解するのに十分でないことを示唆している。したがって、患者の D N a s e 1 l 3 を介した N E T 分解を可能にすることは、炎症性疾患の新規かつ有望な治療戦略である。

【0140】

材料及び方法

患者の血漿

ドイツでの2011年の S T E C - H U S アウトブレイク中に、患者からクエン酸血漿

サンプルを採取した（16）。本研究に含める基準は、STEC／腸管出血性E.coliもしくは血性下痢の陽性同定、血小板数 $\leq 150 \times 10^9 / L$ もしくは1週間で $\geq 25\%$ の減少、溶血のエビデンス（正常限界を上回るLDH、正常限界を下回るハプトグロビン、または破碎赤血球の存在）及び急性腎損傷ステージ ≥ 1 である。

【0141】

ヒト組織

ヒト組織を室温で一晩、5%リン酸緩衝ホルマリンで固定化した。すべての組織は、剖検で採取し、もともと診断目的で当社に提出されたものであり、国家倫理原則に従って研究した。患者の死因を図10に示す。

【0142】

マウス

すべてのマウスは、C57BL/6の遺伝的バックグラウンドを有していた。以前に記載されたDNase1 $^{-/-}$ 及びDNase1様3 $^{-/-}$ マウス（26, 28）を交雑させてDNase1/DNase1 $\Delta 3^{-/-}$ マウスを生成した。DNase1 $^{-/-}$ マウスのこの系統は、ミトコンドリアシャペロンをコードするDNase1重複遺伝子Trap1/Hsp75にオフターゲット変異を含むことが最近報告された（29）。したがって、対照実験のためにDNase1/DNase1 $\Delta 3^{-/-}$ マウスを生成するための代替DNase1 $^{-/-}$ 系統（30）を含めた（図15A～図15C）。

【0143】

変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動ザイモグラフィー（DPZ）によるDNase1の検出

以前に記載したように、修正を加えてDPZを実行した（19）。簡潔に述べると、DNAを含まない4%（v/v）スタッキングゲルと、 $200 \mu g / ml$ のサケ精巢DNAを含む10%（v/v）分離ゲル（Sigma-Aldrich、ドイツ）を用いてドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲルを調製した。DNase1を検出するために、 $0.5 \mu l$ のマウス血清を $14.5 \mu l$ の水と $5 \mu l$ のSDSゲル充填緩衝液（BioRad、ドイツ）と混合した。混合物を5分間煮沸し、ゲルにロードした。電気泳動は、トリス／グリシン電気泳動緩衝液（ $25 mM$ トリス、 $192 mM$ グリシン、 0.1% （w/v）SDS、 $pH 8.7$ ）を使用して $120 V$ で実施した。電気泳動後、 5% （w/v）粉乳、 $10 mM$ Tris/HCl $pH 7.8$ 、 $3 mM$ $CaCl_2$ 、 $3 mM$ $MgCl_2$ 、 $100 U / mL$ ペニシリン、及び $100 \mu g / mL$ ストレプトマイシンを含むリフォールディング緩衝液中でゲルを $37^\circ C$ で一晩インキュベートして、タンパク質をリフォールディングした。ゲルを、粉乳を含まないリフォールディング緩衝液に移し、 $37^\circ C$ でさらに24時間インキュベートした。DNAを $1 \times SYBR Safe$ （Thermo Scientific、ドイツ）で蛍光標識し、蛍光スキャナー（Molecular Imager FX、BioRad、ドイツ）を使用してゲルの蛍光画像を記録した。

【0144】

DPZによるDNase1 $\Delta 3$ の検出

DNase1 $\Delta 3$ の検出のために、 $2 \mu l$ の血清を $12 \mu l$ の水、 $5 \mu l$ のSDSゲルローディングバッファー、及び $1 \mu l$ の β メルカプトエタノール（BME、Sigma-Aldrich）と混合した。BMEはDNase1のジスルフィド架橋を減少させ、その不活性化を引き起こす（11）。混合物を5分間煮沸し、ゲルにローディングした。DNase1について記載したように電気泳動を実施した。ゲルを $10 mM$ Tris/HCl $pH 7.8$ で $50^\circ C$ 、30分間、2回洗浄することにより、SDSを除去した。 $10 mM$ Tris/HCl $pH 7.8$ 、 $1 mM$ BME、 $100 U / mL$ ペニシリン及び $100 \mu g / mL$ ストレプトマイシンを含むリフォールディングバッファー中で、タンパク質を $37^\circ C$ 、48時間インキュベートすることによりリフォールディングさせた。次いで、ゲルを $3 mM$ $CaCl_2$ 及び $3 mM$ $MnCl_2$ を添加したリフォールディングバッファー中、 $37^\circ C$ でさらに48時間インキュベートした。DNase1 $\Delta 3$ によるタンパ

10

20

30

40

50

ク質フリーDNAの効率的な分解を可能にするには、 Mn^{2+} の添加が必要である(11)。
DNase 1について記載したように、DNAを標識し、画像化した。

【0145】

単一放射状酵素拡散(SRED)アッセイによる総DNase活性の検出

総DNase活性を測定するために、 Mn^{2+} を含む緩衝液(20mM Tris-HCl pH7.8、10mM $MnCl_2$ 、2mM $CaCl_2$ 、及び2×SYBR Safe)にサケ精巢由来の55 $\mu g/ml$ DNAを溶解させた。DNA溶液を50°Cで10分間加熱し、等量の2% ultra-pureアガロース(Thermo Scientific)と混合した。混合物をプラスチックトレイに注ぎ、固化するまで室温で保存した。2 μl のマウス血清を直径1.0mmのウェルにロードした。ゲルを湿潤チャンバー内で37°C、4時間インキュベートした。ゲルのDNA蛍光を蛍光スキャナーで記録した。

【0146】

in vitro NET分解アッセイ

NET分解を、以前に記載されたように分析した(19)。無血清DMEM中の精製ヒト好中球を、0.001%ポリリジン(Sigma)でコーティングした滅菌96ウェルプレート(Falcon, BD Technologies, ドイツ)に、ウェルあたり 5×10^4 細胞の濃度で播種した。NET形成を誘発するために、好中球を、100nMホルボール12-ミリスチン酸13-アセテート(PMA; Sigma-Aldrich)で、5%CO₂及び加湿下、37°C、4時間活性化した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、96ウェルプレートを4°Cで一晩保存した。NETをPBSで洗浄し、0.5%Triton X-100を含むPBSで5分間処置し、再度PBSで洗浄した。2価陽イオンを含むHBSS(HBSS+; Thermo Scientific)中の10 μM PPACK(Santa Cruz, Heidelberg, ドイツ)を添加した10%マウス血清または10%クエン酸ヒト血漿の存在下でNETをインキュベートした。5%CO₂及び加湿下、37°Cで3時間にわたってNETを分解可能とした。上清を廃棄し、PBS中に2%PFAを加えて室温で1時間、NET分解を停止させた。PFAを廃棄し、PBS中に2 μM の蛍光DNA色素Sytox Green(Thermo Scientific)を加えて、非分解NETを蛍光標識した。蛍光染色したNETの画像は、倒立蛍光顕微鏡(Axiovert 200M, Zeiss, ドイツ)で取得した。プレートリーダー(励起: 485nm; 放射: 535nm)で蛍光強度を記録するか、Image Jソフトウェア(NIH, USA)を使用して顕微鏡写真でNETの占有面積を測定することにより、非分解NETを定量化した。

【0147】

in vivo発現ベクターの調製

pLIVEプラスミド(Mirus Bio, USA)を使用して、マウスにおいてタンパク質を発現させた。このベクターは、長期にわたって肝細胞特異的なタンパク質を発現させることができる。マウスDNase 1、DNase 1 β 3、及びCSF3を用いてpLIVEプラスミドを生成した。マウスDNase 1については、cDNA(Genbank登録番号NM010061)のPCRを、Sal I及びXho I制限酵素部位を含むプライマーペアDNase 1-F 5'-GTCGACATGCGGTACACAGG(配列番号27)及びDNase 1-R 5'-CTCGAGTCAGATTTTCTGAGTGTC A(配列番号28)を用いて実施した。DNase 1 β 3については、cDNA(Genbank登録番号AF047355)のPCRを、BamH I及びSac I制限酵素部位を含むプライマーペアDNase 1 β 3-F 5'-GAAGTCCCAGGAATTC A AAGATGT(配列番号29)及びDNase 1 β 3-R 5'-GCGTGATACCCGGGAGCGATTG(配列番号30)を用いて行った。両方のcDNAを、適切な酵素で事前に消化し、T4リガーゼ(New England Biolabs, ドイツ)を使用して、pLIVEベクターのマルチクローニングサイト(MCS)にクローニングした。DNase 1 β 3を含むpLIVEベクターを、コンセンサスコザック配列と一致させ、タンパク質発現を最適化するために、mut DNase 1 β 3-F 5'

－AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA（配列番号31）とそれに相補的なmutDNase113-R 5'－TGCAGGGACATGGTGGCCGGGAGTCGACT（配列番号32）のプライマーペアを用いて部位特異的変異誘発に供した。CSF3のcDNAを含むpLIVEベクターの生成は外部委託した（Eurofins Genomics, ドイツ）。CSF3（Genbank登録番号BC120761）のcDNAを、制限酵素部位SalIとXhoIの間のMCSに挿入した。生成されたすべてのベクターの配列は、二本鎖DNA配列決定によって確認した。対照として、追加的なインサートを有さない親のpLIVEプラスミドを使用した。PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kitを使用してすべてのプラスミドを精製し、High Capacity Endotoxin Removal Spin Column（いずれもThermo Scientific）を使用して、エンドトキシンの潜在的な混入物を除去した。

10

【0148】

マウスDNase1及びDNase113のin vitro発現

他の場所に記載するDNase1またはDNase113のcDNAを含むプラスミドを、10% KnockOut血清代替品（Thermo Scientific）を添加したDMEM培地（Thermo Scientific）の存在下、無血清条件でLipofectamine 3000（Thermo Scientific）を用いて、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞にトランスフェクトした。72時間後、上清を回収し、500×gで10分間遠心分離し、滅菌濾過し、3Kカラム（Amicon Ultra, Millipore, Darmstadt, ドイツ）を用いた超遠心分離により濃縮した。

20

【0149】

in vivo遺伝子発現

DNase1、DNase113、CSF3を含むpLIVEプラスミド、または空の対照プラスミドを、ハイドロダイナミックな尾静脈注射によりマウスに投与した。簡潔に述べると、50μgのプラスミドを、マウスの体重の10%に相当する量の0.9%生理食塩水で希釈した。マウスをイソフルランで麻酔した後、尾静脈を介してプラスミド溶液を5～8秒かけて静脈内注射した。稀な場合では、最初の24時間以内にマウスが注射から完全に回復せず、これらの動物は研究から除外した。共発現研究のために、50μgのCSF3プラスミドを50μgの空の対照プラスミド、またはDNase1及びDNase113を含むプラスミドと混合した。両方のプラスミドを含む溶液は、ハイドロダイナミックな尾静脈注射により投与した。

30

【0150】

慢性好中球増加症

4週齢または8～12週齢の雌マウスに、CSF3を含むpLIVEプラスミド50μgを注射して、G-CSFの過剰発現及び好中球増加症を誘発した。マウスを、注射後最初の1週間は8時間ごとにモニタリングし、その後は毎日モニタリングした。肛門周囲の温度を非接触赤外線温度計（Etekcity, ドイツ）で測定した。生存研究では、動物が苦痛の徴候を示した場合（自発運動がない、目を閉じる、時々喘ぐ）、マウスを安楽死させ、「非生存」と記録した。すべての場合において、これらの苦痛の徴候は、プラスミド注射前の体温に比べて $\geq 4^{\circ}\text{C}$ の体温の低下と定義される急速に進行する重度の低体温、及び血尿を伴っていた。非低体温マウスは苦痛の徴候を示さず、実験終了時に安楽死させた。臓器、血液、及び尿の採取物について、3つのD1/D113-マウスの4群を分析した。各群のマウスに、CSF3と空の血漿、DNase1、またはDNase113の混合物を注射した。マウスの各群は、群の最初の動物が苦痛、重度の低体温、及び血尿の徴候を示した場合に、生体サンプル採取のために安楽死させた。この時点は「転帰」と定義され、注射後3～6日以内に発生した。

40

【0151】

血小板枯渇

マウスに2μg/gの血小板除去抗体またはアイソタイプ対照抗体（いずれもEmfr

50

e t, ドイツ) を腹腔内注射した。この処置は、血小板の $>95\%$ を循環から枯渇させる。処置はCSF3の注射の24時間後に開始し、実験が完了するまで48時間ごとに繰り返した。

【0152】

トロンビン阻害

粉末ダビガトランエテキシレート (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, ドイツ) を 40mg/g の用量で通常の粉末 (Altromin, ドイツ) と混合した。粉末を蒸留水と混合し、室温で乾燥させることによりペレットを調製した。ダビガトランの給餌は、CSF3の注射の24時間後に開始した。ダビガトラン食餌を1日間与えたWTマウスは、ダビガトランを含まない通常の食餌を与えたマウスに比べて、活性化部分トロンボプラスチン時間の 6.48 ± 1.19 倍 (平均 $\pm$ SD、 $N=4$) の増加を示した (スチューデントt検定; $P<0.001$)。

【0153】

敗血症のための細菌の調製

Escherichia coli (XEN14, Perkin Elmer) を、 $50\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含むLB培地で一晚培養した。細菌を、 $4000\times g$ で10分間遠心分離することによりペレット化し、PBSで洗浄し、再懸濁した。 1.5×10^9 細菌/mlのアリコートをして 70°C で15分間インキュベートして細菌を熱殺菌した。アリコートは、さらなる使用までの間、 -20°C で保存した。

【0154】

敗血症

8~15週齢の雄マウスに、 0.9% 生理食塩水中の*Salmonella enterica*血清型 typhimurium | (Sigma-Aldrich) 由来の $1\mu\text{g/g}$ のLPSを毎日3回腹腔内注射した。3回目のLPS注射に加えて、マウスには 1.5×10^7 熱殺菌*E. coli*/gの静脈注射を行った。表示されている生存時間は、*E. coli*の注射後の時間を示している。安楽死の時点で血液と臓器を採取した。図4A~図4Iに示す完全な分析を行うには不十分な生体サンプルが2匹の動物から得られた ($1 \times D1/D1L3 - / - + \text{Ctrl}$ 、 $1 \times D1/D1L3 - / - + D1L3$)。動物が重度の苦痛の徴候 (接触に対する無反応性) を示した場合、マウスを安楽死させ、「非生存」と記録した。すべての非生存マウスは血尿及び四肢蒼白を示した。熱殺菌*E. coli*の静脈内注射の24時間後、すべての生存マウスを安楽死させ、「生存」と記録した。

【0155】

マウスの血液、血漿、及び組織の採取

顎下穿刺または眼窩後洞によって血液を採取した。血液を $200\mu\text{l}$ の血清チューブ (Monovette; Sarstedt, ドイツ) 及び $200\mu\text{l}$ のEDTAチューブ (GK150, KABE Labortechnik, ドイツ) に回収した。 $3000\times g$ で15分間遠心分離した後、血液の上清を採取して血漿を得た。血清は、血液を室温で1時間凝固させ、続いて $3000\times g$ で15分間遠心分離することにより得た。血清及び血漿サンプルは、さらなる使用まで -20°C で一定量に分けて保存した。臓器分析のために、PBSの心臓内注入によりマウスを灌流した。臓器を採取し、 4°C 、 4% PFAで24時間固定化した。固定化臓器をパラフィンに包埋した。

【0156】

血液及び血漿の分析

血漿中のLDH、AST、ALT、クレアチニン、及びBUNを、標準化キット (Biotron Diagnostics, CA, USA) を使用し、製造元の説明書に従って定量した。マウスG-CSFはQuantikine ELISA Kit (R&D, 英国) で定量した。EDTA血液中のヘモグロビンは、自動血球計数器 (Idexx ProCytex Dx Hematology Analyzer, Netherlands) によって定量した。好中球をFACSで定量するために、 $0.2\mu\text{g}$ のフィコエリトリン標識抗マウスCD11b (M1/70, Biolegend, ドイツ) 及び $0.5\mu\text{g}$ の

Alexa Fluor 488抗マウスLy6G (1AB, Biolegend, ドイツ) の存在下で、全血を氷上で15分間インキュベートした。次いで、血液を0.5mlのPBSで希釈し、FACSCalibur (BD Bioscience, USA) で分析した。EDTA抗凝固処置した血液の血液塗抹を、ポリリジンでコーティングしたスライド (Hecht Assistant, ドイツ) 上で調製した。風乾後、ドライアイス上で、1 μ M Sytox Greenを添加したメタノール中、1分間インキュベートするか、または市販のキット (In Vitro Diagnostikum, ドイツ) を使用してギムザで染色した。

【0157】

免疫蛍光染色

パラフィン包埋切片を脱蠟し、再水和し、クエン酸緩衝液 (10mMクエン酸ナトリウム、0.1% Tween、pH6) 中で100℃、25分間抗原賦活化に供した。その後、切片を2.5%正常ヤギ血清 (Vector, 英国) で30分間ブロッキングした後、マウスオンマウスブロッキングキット (Vector) を用いて1時間インキュベートした。次いで、切片を、MPO (A0398, Agilent, ドイツ)、CRAMP (PA-CRLP-100, Innovagen, スウェーデン)、シトルリン化ヒストン3 (ab5103, Abcam, 英国) フィブリン [クローン59D8]、またはヒストンH2A、H2B、及びDNAの複合体に対する2 μ g/mlの一次抗体の存在下で4℃、一晚インキュベートし、クロマチンを検出した (2)。切片を、Alexa Fluor 488またはAlexa Fluor 555 (すべてThermo Scientific) とコンジュゲートした抗ウサギ及び抗マウスIgG抗体の存在下で1時間インキュベートした。洗浄後、DNAを1 μ g/ml DAPIで2分間標識した。Sudan Black (70%エタノール中0.1%) 存在下での25分間のインキュベーションにより自己蛍光をクエンチし、Fluoromount G (Southern Biotech, USA) で切片をマウントした。蛍光標識切片の画像は、倒立蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M, Zeiss, ドイツ) または共焦点顕微鏡 (TCS SP5, Leica, ドイツ) で取得した。NET血餅の画像は、ソフトウェア (ImageJ) を使用して定量した。NET血餅のvWFまたはフィブリン染色領域が3%未満である場合、陰性とみなした。

【0158】

免疫組織化学

抗原賦活化後、脱パラフィン切片を2.5%正常ウマ血清 (Vector) で30分間ブロッキングした。切片を2 μ g/mlの好中球エラスターゼに対する一次抗体 (ab68672, Abcam) の存在下で4℃、一晚インキュベートした。洗浄後、抗ウサギIgG-APキット (ImmPRESS, Vector) を使用して、製造元の説明書に従って切片を染色した。切片をヘマラム (Merck, ドイツ) で対比染色し、Neo-Mount media (Merck) を用いてマウントした。倒立顕微鏡 (Axiovert 200M, Zeiss) で染色切片の画像を取得した。

【0159】

in vitroでのNET血餅の生成

精製したヒト好中球を、2%BSAを添加したDMEM中、 3×10^7 細胞/mlで組織培養プレートに播種した。加湿及び回転条件 (300rpm) 下、37℃、5%CO₂で4時間、細胞を0.1 μ M PMAで活性化した。未刺激好中球、及び10U/ml組換えヒトDNase1 (ドルナーゼ α , Roche, Germany) の存在下、PMAで活性化した好中球を対照として用いた。NET血餅を2%PFAで4℃、一晚固定化した。固定化したNET血餅をパラフィンに包埋し、上記のようにNETについて切片を染色した。

【0160】

統計的評価

データは平均±標準偏差として示す。統計解析は、Prism Software (G

10

20

30

40

50

raph Pad, USA) を使用して実施し、スチューデント t 検定、一元配置分散分析及び二元配置分散分析、それに続くボンフェローニの多重比較検定、及び対数順位検定を含んでいた。結果は $P < 0.05$ で有意とみなした。

【0161】

映像

慢性好中球増加症は、野生型マウスにおいて忍容される。生成した映像は、CSF3 発現プラスミド (CSF3) または CSF3 を欠く対照プラスミド (Ctrl) の注射から 1 週間後の野生型マウスを示す。いずれの動物も正常な行動を示し、苦痛の徴候はない。

【0162】

慢性好中球増加症は、DNase1 及び DNase1l3 を欠損するマウスに苦痛を引き起こす。この映像は、CSF3 と、対照プラスミド (CSF3/Ctrl)、DNase1 (CSF3/D1)、または DNase1l3 (CSF3/D1l3) とを同時発現する DNase1/DNase1l3-/- マウスを示す。循環 DNase、DNase1 または DNase1l3 を発現するマウスは、正常な行動を示す。循環 DNase (CSF3/Ctrl) を欠くマウスは、苦痛の徴候を示す (自発的な動きがない、目を閉じている、時々喘ぐ)。

参考文献

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.
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).
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).
4. V. Thammavongsa, D. M. Missiakas, O. Schneewind, Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. 342, 863-866 (2013).
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).
6. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl. Ac

10

20

30

40

50

- ad. Sci. U. S. A. 107, 15880–15885 (2010).
7. A. Warnatsch, M. Ioannou, Q. Wang, V. Papayannopoulos, Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349, 316–320 (2015).
8. B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34–45 (2013).
9. S. K. Jorch, P. Kubes, An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 23, 279–287 (2017).
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).
11. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhah, 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).
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).
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).
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).
15. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell

10

20

30

40

50

death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241 (2007).

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).

10

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).

20

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).

30

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).

20. M. Leppkes, C. Maueroeder, 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).

40

21. C. Schauer, C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhofer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, R. Holmdah

50

l, 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).

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.

23. M. Al-Mayouf, A. Sunker, R. Abdwani, S. A. Arawi, 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).

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).

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).

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

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).

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).

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).

10

20

【0163】

実施例2：治療のためのDNase1L3及びバリエーションの開発及び使用

序論

制御されない炎症は、過剰な病態を引き起こす(1)。好中球細胞外トラップ(NET)は、毒性タンパク質で装飾されたDNAフィラメントである(2)。NETは微生物感染から保護するが、過剰なNET形成は炎症性疾患及び自己免疫疾患を引き起こし、悪化させる(3)。血液に見出されるDNA分解酵素であるDNase1(D1)は、NETを*in vitro*及び*in vivo*で無害化するために広く使用されている。実際、嚢胞性線維症(CF)のFDA承認薬(ドルナーゼα)である組換えヒトD1の注入により、様々な疾患モデルにおいてNETの病理学的影響が予防されるが(3)、これは予防療法のためのD1の使用を支持するものである。

30

【0164】

DNase1様3は、NET関連疾患の新規薬物候補である

実施例1では、D1に加えて、DNase1様3(D1L3)もNETを分解することが明らかとなった。両方の酵素は、炎症反応中に血液と組織の恒常性を維持する。簡潔に述べると、本発明者らは、炎症状態の特徴である好中球増加症時に、無菌状態及び感染状態下で血管内にNETが生成されることを示した。D1及びD1L3はNETを切断するため、NETのDNAフィラメントが血管の血餅に凝集するのを予防する。D1及びD1L3が存在しない場合、NET血餅は血流を妨げ、臓器の損傷及び死を引き起こす。NET血餅は、血小板またはフィブリンとは独立して形成されるため、従来の抗血栓療法に耐性がある。したがって、本発明者らは、血管閉塞の新しいメカニズムとしてNET血餅を発見し、また、NETに対する新規予防療法であるD1L3を発見した(実施例1参照)。

40

【0165】

D1及びD1L3は、DNase1様1(D1L1)及びDNase1様2(D1L2)とともにDNase1タンパク質ファミリーに属する(4)。D1及びD1L3は、ヒ

50

ト、霊長類、及びげっ歯類を含む様々な種において発現する。D 1 は主に消化管及び外分泌腺で発現し（５）、一方、造血細胞、すなわちマクロファージ及び樹状細胞はD 1 L 3 を産生する（６、７）。両方のD N a s e をマウス及びヒトの血清中に低濃度で見出したが（実施例１、図１４）、循環中のD 1 及びD 1 L 3 の起源は不明である（７、８）。D 1 は、タンパク質フリーDNA（例えば、細菌DNA、プラスミドDNA）を優先的に切断し、一方、D 1 L 3 は、真核細胞の核において一般的に見出されるDNAとヒストンの複合体であるクロマチンを標的とする（７、９、１０）。D 1 活性は単量体アクチンへの結合に際して阻害され、生理的塩濃度に高感受性である（１１～１３）。さらに、D 1 はN 4 0（シグナルペプチドを含まない成熟酵素のN 1 8 に対応）及びN 1 2 8（N 1 0 6）においてグリコシル化されており、これにより酵素は血清プロテアーゼによる不活性化に対して耐性になる（９）。対照的に、D 1 L 3 は、グリコシル化部位及びアクチン結合部位を欠いており、それぞれ、いくつかのプロテアーゼに対する感受性及びアクチンに対する耐性を生じさせる（９）。

【０１６６】

D 1 は、消化管の体液及び尿中で最初に発見され、食物摂取由来のDNAの消化に関与していた。本開示の過程で、全身投与したD N a s e 1（例えば、腹腔内または静脈内注射による）は循環中の半減期が比較的短く、酵素的に活性な形態で尿に、そして予想外に胆汁に分泌されることが観察された。胆汁液への分泌は、全身性D N a s e 1 療法を介して胆管の細胞外DNA及び／またはNETを標的とする機会を広げる。

【０１６７】

D 1 L 3 は、プログラム細胞死に関して最初に記載された（１４）。D 1 L 3 は、２つの核局在化部位（N L S 1、N L S 2）を特徴とする。N L S 2 は、C末端テール内に組み込まれ、D 1 L 3 に固有で、D 1 には存在しない。両方のN L S は、アポトーシス中に酵素を核に向かわせる（１４）。実際、細胞内D 1 L 3 は、i n v i v oでのアポトーシス細胞及びネクローシス細胞内の核DNAの断片化に必要である（１５）。D 1 L 3 は、細胞外DNA、すなわちトランスフェクションで見出されるような脂質封入DNA、及びアポトーシス小体内のクロマチンを分解するためにそのC末端テールを必要とする（７、１０）。トランスフェクションでは、c DNAとカチオン性脂質が標的細胞の細胞膜を貫通する複合体を形成する。D 1 L 3 はトランスフェクションを妨害し、この機能にはC末端が重要である（１０）。アポトーシス細胞由来のクロマチンで満たされた脂質小胞であるアポトーシス小体は、D 1 L 3 の生理学的基質である（７）。本明細書では、C末端テールにより、D 1 L 3 はアポトーシス小体の脂質膜を貫通し、クロマチン充填物を分解することができる。重要なことに、C末端テールは、D 1 L 3 による脂質フリーの細胞外クロマチンの分解にも必要である（７）。C末端テールは、細胞外空間におけるD 1 L 3 の機能にとって重要であると考えられる。

【０１６８】

h D 1 は動物モデル、主にマウスのNETを効果的に標的とする一方で、それぞれC F（１６）及び肺気腫（１７）の臨床試験において、治療効果を限定的に示すか、または全く示していない。C F（１８）においてNETが形成されることから、これは野生型h D 1 が患者においてNETを標的とするのに最適ではないことを示している。D 1 の治療上の限界を回避するために機能亢進性のバリエーションを生成したが、それらの臨床的製造は困難である（１２）。特に、NET-DNAにはヒストンが含まれており、クロマチンのように構造的に構成されている（２）。したがって、NETに対する最適な治療にはクロマチンの効率的な分解が必要であると推測された。

【０１６９】

肺気腫患者のh D 1 と組織プラスミノゲン活性化因子（t P A、アルテプラゼ）の併用療法が記載されている（１７）。データは我々の仮説と一致しており、なぜならt P AによりD 1 がi n v i t r oでクロマチンを分解することができるからである（１９）。参照により本明細書に援用するU S 9, 6 4 2, 8 2 2 は、NETの治療的標的化のためのt P A及びD 1 との併用療法をさらに開示している（２０）。しかしながら、t P

Aによる治療は一般的に、その線維素溶解活性のために出血リスクの増加と関連している（17）。D1L3は、患者を出血のリスクにさらすことなく、NETを標的とするためのより安全な戦略を提供し得るが、D1L3タンパク質を用いた療法はまだ検討されていない。

【0170】

アミノ酸転移によるDNase1及びDNase1様3バリエーションの改変

本実施例では、細胞外クロマチン（NETを含む）に対する治療用に改変したD1及びD1L3のバリエーションを生成した。バリエーションを設計するために、クロマチンを分解するヒトD1L3の能力は、ヒトD1には存在しない個々のアミノ酸及び／またはアミノ酸配列によってコードされると仮定した。さらに、これらの個々のアミノ酸及び／またはアミノ酸配列をヒトD1L3からD1に転移させると、クロマチン分解活性が増加した機能亢進性D1バリエーションが生成すると推測した。同様に、酵素特性（例えば、グリコシル化）をD1からD1L3に転移させることができる。仮説を試験するために、従来のアミノ酸変異を採用し、新規ビルディングブロック（BB）技術を開発し、DNase1タンパク質ファミリーのDNase1のバリエーションを改変した。

【0171】

D1及びD1L3のバリエーションを産生するために、*in vitro*発現系を使用した[例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞、*Pichia pastoris*]。酵素活性は、高分子量（HMW）-DNAの分解を読み取り値として用いて特徴決定した（図16）。2種類のHMW-DNAを選択した：（a）サケ精巣から単離された二本鎖DNA（dsDNA）。HMW-dsDNAの分解はザイモグラフィにより分析した；（b）HEK293細胞から精製した核のクロマチン。その分解を分析するために、HMW-クロマチンを最初にDNase1バリエーションとともにインキュベートし、続いてDNAの単離及びアガロースゲル電気泳動（AGE）による可視化を行った。クロマチン分解は、低分子量（LMW）-DNAによって検出された。この設定では、野生型ヒトD1（配列番号1）はdsDNAを分解する活性が野生型D1L3（配列番号2）に比べておよそ100倍高く、一方、野生型D1L3は野生型D1に比べておよそ100倍効率的にクロマチンを分解する（図16）。クロマチンの分解ではD1とD1L3の相乗効果が認められたが、dsDNAでは認められなかった。D1とD1L3を10：1または1：1の比率で混合すると、各D1またはD1L3単独に比べてクロマチン分解の増加が観察された（図16）。したがって、クロマチン及び／またはdsDNA分解活性の増加を示すD1及び／またはD1L3バリエーションをスクリーニングした。

【0172】

D1タンパク質ファミリーのメンバーのための*in vivo*発現系を使用して、血管内NETを分解するために、選択されたD1及びD1L3バリエーションをさらに試験した。参照によりその全体を本明細書に援用するPCT/EP2018/051444参照されたい。この系は、2つの成分、（a）D1、D1L3、及びそのバリエーションのcDNAを用いて肝細胞の安定した*in vivo*トランスフェクションをレシピエントマウスにおいて可能にする発現プラスミド、ならびに（b）血清中のDNase1活性の欠如を特徴とするDnase1^{-/-}/Dnase1L3^{-/-}欠損マウス、に基づく。簡潔に述べると、DNase1候補のcDNAを肝発現ベクターにクローニングする。次に、ベクターを、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）をコードするマウスCsrf3のcDNAとともに、Dnase1^{-/-}/Dnase1L3^{-/-}欠損マウスで共発現させる。Csrf3の発現は、血管内のNET形成を伴う好中球増加症を誘発し、これが血管内の未消化のNETの凝集及びDnase1^{-/-}/Dnase1L3^{-/-}マウスの死を引き起こす。薬物候補を同定するために、NETを効率的に分解し、このモデルにおける罹患率及び死亡率を予防するD1、D1L3、及びそのバリエーションをスクリーニングした。

【0173】

結果

従来のアミノ酸置換によるDNase1バリエーションの改変

本発明者らの中心的な仮説は、クロマチンを分解するヒトD1L3の能力は、D1に存在しないアミノ酸によって媒介されるというものである。配列アライメントにより、ヒトD1及びヒトD1L3のアミノ酸の44%が同一であることが示された(図17)。可変アミノ酸(56%の非共有アミノ酸)のみを変異させて、D1及びD1L3バリエーションを生成した。

【0174】

D1L3は、9.35の等電点を有するカチオン性タンパク質であり、一方、D1及び他のメンバーは、より塩基性のタンパク質である。したがって、D1L3のカチオン性により、酵素がクロマチンを分解できると推測した。配列アライメントにより、可変アミノ酸中の37個のアルギニンまたはリジン残基を同定したが、これらはD1には存在しない(図17)。これらのアミノ酸残基は、配列番号2に関して、アミノ酸位置29(シグナルペプチドを含む位置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)に位置する。

【0175】

D1L3におけるこれらの追加のアルギニンまたはリジン残基の26個は、D1(配列番号1)における以下のアミノ酸位置に対応する: 31(シグナルペプチドを含む9位)、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)、及び280(260)。さらに、D1L3は、3か所のアルギニンまたはリジン残基挿入部位: R80、K226、及び3つのアルギニン及び6つのリジン残基を特徴とするC末端テール(配列番号2のアミノ酸282位の後)を特徴とする。

【0176】

以下の変異を野生型D1に導入することにより、D1L3のコア体の一部であるアルギニン及びリジン残基をD1に転移させることを目的とし(図18): 配列番号1に関して、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、及びK280M、そのようにしてD1の28のバリエーションを生成した。

【0177】

本実施例では、28個のアミノ酸置換のうち23個を含むD1バリエーションを生成することができた。HEK293細胞内でこれらのD1バリエーションのcDNAを発現させ、培養上清中のdsDNA及びクロマチン分解活性を分析した。以下のアミノ酸改変がクロマチン分解活性を部分的に増加させることが観察されたが、dsDNA分解には大きな差異が観察されなかった(図19): Q31R、Q49K、N76K、Q79R、P92R、D109K、A164K、Q177K、P200K、S201K、S204R、T213R。興味深いことに、ヒトD1のアミノ酸のそれぞれ79%及び78%を共有するマウス及びラットD1(配列番号4)は、Q31R、Q49K、及びQ79Kを含む分析されたアミノ酸置換のいくつかを特徴とする(図20)。マウスD1及びヒトD1を発現するHE

K293細胞由来の上清の分析により、マウスD1は、ヒトD1に比べてクロマチン分解活性が増加していることが示された(図21)。Dnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスに、Cs f3と、マウスD1(mDnase1、配列番号3)、ヒトD1(hDnase1、配列番号1)、または空の対照プラスミド(Ctrl)の混合物を注射した。対照プラスミドを与えたマウスは7日以内に死亡したが、マウスD1の発現により少なくとも28日間完全な保護がもたらされた(図21)。予想に反して、ヒトD1を発現させても死からの部分的な保護を示すに止まり、動物の半数以上が14日以内に死亡し(図21)、ヒトD1がマウスD1に比べて血管内NETの分解効率が低いことが示された。ヒトD1のQ31R、Q49K、Q79R、及びW209Rを変異させて、マウス様D1バリエーション(配列番号5)を作成した。合計6つの変異(Q31R、Q49K、Q79R、Q177K、W209R、G262K)を作成してラット様D1バリエーション(配列番号6)を生成した。両方のげっ歯類様D1バリエーションを肝細胞発現ベクターにクローニングし、Cs f3とともにDnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}マウスに送達した。D1のマウス及びラット様バリエーションを用いた遺伝子治療により、NETを介した血管閉塞及び死に対する完全な保護が提供されることが観察された(図22)。重要なことに、げっ歯類様ヒトD1バリエーションの*in vitro*発現は、クロマチン分解活性の増加を示した(図22)。まとめると、データは、(a)ヒトD1が*in vivo*でNETを分解する能力は限定的であり；(b)複数のカチオン性アミノ酸をヒトD1L3からヒトD1に転移させると、機能亢進性バリエーションが生成されることを示している。

【0178】

D1の機能亢進性バリエーション(6、12、13、21~29)を生成するためのいくつかの試みがなされてきた。野生型ヒトD1のアミノ酸282残基中82残基を変化させる184の変異が見出された(図23)。野生型のヒトD1及びヒトD1L3のアミノ酸配列のアライメントにより、野生型ヒトD1L3にすでに存在するヒトD1の3つの機能獲得型変異：Q31R(シグナルペプチドが存在しないD1のQ9Rに対応)、T227K(T205K)、及びA136F(A114F)が明らかになった(図23)。変異Q31R及びT227Kは、hD1のDNA結合特性を変化させ、機能亢進性を引き起こし、一方、A136Fは、単量体アクチンによる阻害に対する耐性を付与する(21~24、26、29)。

【0179】

Q31R/T227K/A136F(配列番号7)の組み合わせを有する新規D1バリエーションを設計し、その酵素活性を、野生型D1(配列番号1)、ならびにQ31R、T227K、A136Fに単一の変異、またはQ31RとT227Kに複合変異を有するD1バリエーション(配列番号8)と比較した。トランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清中でのdsDNA及びクロマチン分解活性を特徴決定した。Q31R及びT227Kの単一または複合変異を有するD1バリエーションでは、dsDNA分解活性に大きな差異は観察されなかった(図24)。興味深いことに、A136F変異体及びQ31R/T227K/A136F複合変異において、クロマチンがそれぞれ部分的及び完全に分解された(図24)。次に、D1のQ31R/T227K/A136Fバリエーションが、好中球のDnase1^{-/-}Dnase1L3^{-/-}におけるNETを介した致死的な血管閉塞を予防できるかどうかを試験した。Dnaseを含まない対照プラスミドを投与したマウスはすべて死亡したが、D1バリエーション(配列番号7)を発現するすべてのマウスは、苦痛の徴候を示すことなく実験の終了まで生存した(図24)。精製タンパク質を使用して、三重のアミノ酸置換が、dsDNA分解活性の検出可能な差異を伴わずに野生型D1に比べてクロマチン分解活性をおよそ10~20倍増加させることが観察された(図25)。核由来のクロマチン及びNETはアクチンを含有している(30、31)。データからは、D1バリエーションによるクロマチン分解には、野生型D1L3に存在する2つの特徴であるカチオン性アミノ酸置換と、アクチン耐性を付与する変異が必要であることが示唆される。この考えをさらに裏付けるために、変異A164K及びA136F(配列番号9)の組み合わせを特徴とするD1バリエーションを生成した。実際、両方の変異を有するD1バリエーション

においてクロマチン分解活性の強い増加が観察され（図26）、これは仮説を支持するものであった。

【0180】

DNa se 1 タンパク質ファミリーメンバーのビルディングブロック改変の開発

D1L3は、追加のアミノ酸を含む3つの部位を特徴とする：Q282（NH₂-SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS-COOH）の後に始まるC末端テール（配列番号33）、ならびにS79/R80及びK226の酵素内の2つの部位（図17）。D1L3のC末端の23アミノ酸は、D1のC末端に結合している（10、28）。DNa se 1の226位にアルギニン残基を挿入すると（A226__T227insK）、dsDNAを分解する酵素活性が低下したD1バリエーションが生成されたが、置換T227Kではそのような効果は観察されなかった（図27）。したがって、K/R残基を挿入すると、D1機能が低下するリスクが伴う。荷電アミノ酸の挿入は、局所タンパク質構造に影響を与え得る。D1が1つのアミノ酸鎖を含む球状酵素であると考えられると〔図28、（27）〕、そのような局所的な変化が酵素全体を不活性にし得ると考えられる。実際、D1アミノ酸配列全体にわたる多くの非保存的変異が酵素を不活性化する（12、25、26）。単一のアルギニン及びリジン残基だけでなく、隣接するアミノ酸配列を移植することによる局所タンパク質構造の転移により、不活性化のリスクが低下すると仮定した。挿入のアンカーとして使用することができるA226__T227insK付近の保存アミノ酸をD1及びD1L3内で検索した。本発明者らは、N末端及びC末端アンカーとして、D1のD223/T224/T225モチーフ及び保存されたT229をそれぞれ同定した（図27）。D1（ATP）内の3つのアミノ酸を、D1L3（V[K]KS）から、K226を含む4つのアミノ酸に*in silico*で置き換えた。HEK239細胞において新規D1バリエーション（A226__P228delinsVKKS）のcDNAを発現させることにより、野生型D1と比較した場合に同様のdsDNA分解活性を有する機能的に活性な酵素が明らかとなった（図27）。データは、保存されたアミノ酸間の可変アミノ酸がD1とD1L3の間で交換可能であることを示唆している。

【0181】

本発明者らは、酵素特性をD1タンパク質ファミリーの1つのメンバーから別のメンバーに転移させるためのビルディングブロック技術を概念化した。以下の基本的な手順は、本技術の特徴である（図29）：

- （1）ドナー及びレシピエントDNa seのタンパク質間アライメントを提供し、
- （2）転移用の可変アミノ酸またはアミノ酸配列（ビルディングブロック）を同定し、
- （3）それぞれビルディングブロック（アンカー）の上流と下流に位置するドナー及びレシピエントDNa seの保存アミノ酸を同定し、
- （4）レシピエントDNa seのCアンカーとNアンカーの間のビルディングブロックをコードするcDNAを、ドナーDNa seのアンカー間のcDNAと置き換え、
- （5）キメラDNa seのcDNAを合成し、その後、好ましくはドナー及びレシピエントDNa seの両方を欠くレシピエント生物（例えば、CHO細胞またはDNa se1-/-DNa se1L3-/-マウス）内で*in vitro*/*in vivo*発現させる。

【0182】

ビルディングブロック技術によるDNa se 1 バリエーションの改変

ヒト、マウス、ラット、及びチンパンジー由来のD1及びD1L3の複数種のアライメント（図30）は、これらの種の間でN及びC末端アンカーが保存されていることを示した。これらのアンカーアミノ酸またはアミノ酸配列は、可変アミノ酸及びアミノ酸配列の62個のビルディングブロックに隣接しており、これらには、上記の実験のD1（ATP）及びD1L3（VKKS）のアミノ酸配列がビルディングブロック#49として含まれる（図31）。

【0183】

これらのビルディングブロックをD1L3からD1に転移させると、以下の変異を有するD1バリエーションが生成される（図31）：1M__S22delinsMSRELA PL

LLLLLSIHSALA、L23__A27del insMRI CS、I30__T32del insVRS、E35__T36del insES、M38__I47del insQEDKNAMDVI、Q49__S52del insKVIK、Y54C、I56__Q60del insIILVM、V62__R63del insIK、S65__K72del insSNNRICPI、L74__N76del insMEK、Q79__T84del insRNSRRGIT、H86N、V88__V89del insVI、E91__P92del insSR、N96__S97del insNT、R101Q、L103A、V105L、R107__Q110del insKEKL、A113__S116del insVKRS、Y118H、D120H、G122__N128del insYQD GDA、T130S、N132S、A136__I137del insFV、R139W、F141__F144del insQSPH、E146__E149del insAVKD、A151V、V153I、A157__A158del insTT、G160__A162del insETS、A164K、A168E、Y170__D171del insVE、L174T、Q177__K179del insKHR、G181__L182del insKA、D184__L187del insNFIF、R199__Q202del insPKKA、S204__S205del insKN、W209R、S211D、T213R、Q215V、P219G、S221__A222del insQE、A226__P228del insVKKS、H230N、V238__A239del insLR、M241__A246del insQEIVSS、D250K、A252__P254del insNSV、N256D、A259__A260del insKA、G262K、S264__L267del insTEEE、Q269__I271del insLDV、Y275F、V279__M280del insFK、及びK282del insQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS。

【0184】

ビルディングブロックをD1からD1L3に転移させる場合、以下のD1L3バリエーションが生成される（図31）：M1__A20del insMRGMKLLGALLALAA LLQGAVS、M21__S25del insLKIAA、V28__S30del insIQT、E33__S34del insET、Q36__I45del insMSNATLV SYI、K47__K50del insQILS、C52Y、I54__M58del insIALVQ、I60__K61del insVR、S63__I70del insSHLTA VGK、M72__K74del insLDN、R77__T84del insQDAPDT、N86H、V88__I89del insVV、S91__R92del insEP、N96__T97del insNS、Q101R、A103L、L105V、K107__L110del insRPDQ、V113__S116del insAVDS、H118Y、H120D、Y122__A127del insGCEPCGN、V129T、S131N、135F__136Vdel insAI、W138R、Q140__H143del insFS RF、A145__D148del insAVKD、V150A、I152A、T156__T157del insAA、E159__S161del insGDA、K163A、E167A、V169__E170del insYD、T173L、K176__R178del insQEK、K180__A181del insGL、N183__F186del insDVML、P198__A201del insRPSQ、K203__N204del insSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220__E221del insSA、V225__S228del insATP、N230H、L238__R239del insVA、Q241__S246del insMLLRGA、K250D、N252__V254del insALP、D256N、K259__A260del insAA、K262G、T264__E267del insSDQL、L269__V271del insQAI、F275Y、F279__K280del insVM、及びQ282__S305del insK。

【0185】

次に、D1L3活性を有するD1バリエーションを改変するための連続的なアプローチを概念化し、このアプローチは、複数の隣接するビルディングブロック（クラスター）の転移

10

20

30

40

50

で始まり、個々のビルディングブロックの転移が続き、個々のアミノ酸、または複数のビルディングブロックの組み合わせを新規キメラ酵素に転移させることで終了する（図32）。このアプローチは、最初のスクリーニングでD1-D1L3キメラの数を減少させる。
【0186】

本方法を試験するために、個々のビルディングブロックまたはD1L3由来のビルディングブロッククラスターのクラスターのいずれかを含む合計19個のD1バリエーションを設計した（図31）。これらのD1バリエーションは、以下のアミノ酸変異を特徴とする：1M__S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSAALA、L23__A27delinsMRI CS/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__N128delinsYQDGD A/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__A246delinsQEI VSS/D250K/A252__P254delinsNSV、N256D/A259__A260delinsKA/G262K/S264__L267delinsTEEE/Q269__I271delinsLDV、及びY275F/V279__M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS。

【0187】

次に、cDNAを発現ベクターにクローニングし、発現ベクターをHEK293細胞にトランスフェクトした。細胞上清の分析により、すべてのサンプルによるdsDNA分解が示された（図33）。さらに、D1L3からD1への、ビルディングブロック（BB）11（配列番号10参照）、BB12~14（配列番号11参照）、BB26（配列番号12参照）、BB41~48（配列番号13参照）、及びBB49（配列番号14参照）の転移により、クロマチン分解活性が増加した酵素が得られた。これらのすべてのキメラ酵素は、野生型D1に比べてdsDNA基質を分解するのと同じかそれ以上の活性を示した。D1L3由来のビルディングブロック11（配列番号2のRNSRRGI）及び49（配列番号2のVKKS）は、それぞれR80/R81及びK227を含み、これらはD1には存在しない。D1L3-BBクラスター41~48（配列番号2のPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE）は、そのD1における対応配列（RPSQWSSI RLWTSP T FQWLIPDSAの配列番号1）と比較して5つの追加のアルギニン及びリジン残基を特徴とする。これらの追加のカチオン性アミノ酸が機能亢進性を担っている可能性がある。D1ビルディングブロック12~14及び26は、配列番号1のアミノ酸配列H86~R95及びA136~V138を含み、これは、D1阻害剤であるアクチンの結合に必要なアミノ酸残基を含む。したがって、これらのアミノ酸配列を、アクチンと相互作用しないD1L3由来のそれぞれのビルディングブロックで置き換えると、D1のアクチン耐性バリエーションを生成する可能性がある。BB11、14、26、41~19を組み合わせると1つの新規D1バリエーション（配列番号15）にした。これらの機能獲得

BBの組み合わせにより、D1バリエーションのクロマチン分解が野生型D1L3のレベルまで増加することが観察された(図33)。したがって、BB技術は、機能亢進性D1バリエーションを生成するためのロバストな方法を提供する。

【0188】

ビルディングブロック技術によるDNase1様3バリエーションの改変

D1L3のBBクラスター60~62は、そのC末端テール由来のアミノ酸を含む(図33)。テールはL281の後に始まり(図34)、二分のNLSを含むアミノ酸配列QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS(配列番号33)を有する。D1L3は、トランスフェクション試薬及びアポトーシス小体を含む脂質小胞内のDNAを分解するためにC末端テールを必要とする(7、10、28)。さらに、D1L3による脂質フリー及び細胞フリーのクロマチンの分解にはC末端が必要である(7)。両方の調査結果は、Q282の後のアミノ酸が欠失したD1L3バリエーションに基づいているため、これらの基質の分解では不活性である。Wilbertらは、D1L3のC末端延長部をD1のC末端に結合させ、脂質小胞内でのDNA分解能力をD1に転移させた(10、28)。本明細書において、BB技術を使用して、C末端をD1L3からD1へ、またはその逆に転移させた。Nアンカーとして、D1の末端βシートの前に位置する保存されたS272/D273/H274モチーフ(図28)を使用し、D1とD1L3の間で末端の3つのビルディングブロックを交換した(図34)。このアプローチにより、変異Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS(配列番号16)によるD1L3のC末端延長部を特徴とするD1バリエーション、及び変異F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK(配列番号17)による短縮型DIL3バリエーションを生成した。HEK293細胞内でバリエーション及び野生型酵素の両方を発現させ、上清中のDNase活性を特徴決定した。予想に反して、D1L3のC末端を有するD1バリエーションはクロマチンを分解せず、一方、野生型酵素のC末端を欠くD1L3バリエーションは依然としてクロマチンを切断することができることが観察された(図34)。実際、このD1L3バリエーションではクロマチン分解活性の増加が観察された。この発見を裏付けるために、D1L3の短縮型バリエーションが*in vivo*で存在するかどうかを試験し、その発現によって好中球Dnase1^{-/-}/Dnase1L3^{-/-}マウスのNETを介した致死性から保護されることを観察した(図34)。結論として、C末端の欠失は、D1L3の機能を阻害せず、むしろ増加させ、脂質フリー及び細胞フリーのクロマチンを分解する。

【0189】

血清プロテアーゼ、特にプラスミンはD1L3を分解するが、D1は分解しない(9)。プロテアーゼ活性に対するD1L3の感受性は、診療での使用を制限するであろう。グリコシル化タンパク質は、プロテアーゼに対する保護の増加を示す(32)。ソフトウェア解析を用いて、ヒト及びマウスD1L3のグリコシル化に関する公知のコンセンサス配列を同定することができなかった。*in silico*と*in vitro*の両方で観察されたように、ヒトD1のソフトウェア解析により2つのグリコシル化部位が明らかになった(9)。D1L3のグリコシル化バリエーションは、血清プロテアーゼに対する耐性が向上しているため、循環中の半減期を延長し得ると仮定した。グリコシル化部位には、N-X-T/Sの最小限のコンセンサス配列が必要である。D1は、2つの公知のNグリコシル化部位、N40(シグナルペプチドを含まない場合、N18)及びN128[(シグナルペプチドを含まない場合、N106、(9))]を含む。D1グリコシル化部位N40-X-T42及びN128-X-T130のアミノ酸は、D1L3のD38-X-N40及びA127-X-V129に対応する。したがって、D1L3のグリコシル化バージョンは、アミノ酸変異D38N、N40T、A127N、及びV129Tを特徴とする必要がある(配列番号18参照)。これらのアミノ酸置換を挿入するために、従来の点変異を使用する代わりにBB技術を使用して、BB4(配列番号1のMSNATLVSY)内にあるD1グリコシル化部位N40-X-T42及びBBクラスター23~25(配列番号1のGCEPCGNDTFN)内にあるN128-X-T130をD1からD1L3へ転移

させた（図35）。このようにして、それぞれ、変異Q36_I45delinsMSNATLVSYI（配列番号19）及びY122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N（配列番号20）を特徴とする2つの新規D1L3バリエーションを生成した。これらのD1L3バリエーション及びWT酵素をHEK293細胞内で発現させた。次に、WT酵素のC末端テールのエピトープを標的とするポリクローナル抗体を使用して、ウェスタンブロットにより上清を分析し、WT酵素及びD1L3バリエーションを検出した。予想通り、D1L3バリエーションは、WT酵素と比較した場合、おそらくグリコシル化により、より高い分子量のバンドを示した（図35）。N40またはN128においてグリコシル化されたD1L3バリエーションは、クロマチン分解活性を保持していた（図35）。結論として、データは、BB技術を使用してD1からD1L3へグリコシル化部位を転移させることができ、これにより、プロテアーゼ耐性が増加し、患者の半減期が延長されたD1L3バリエーションを生成し得ることを示唆している。

【0190】

DNase1様3及びそのバリエーションによる治療

最後に、D1L3の治療効果を*in vivo*で試験した。NETの血管血餅の組織学的分析は、クロマチンの密な凝集体を示し（図36A）、このことはD1のヒストンフリーの切断部位が*in vivo*では稀であることを示す。したがって、野生型D1L3を用いた急性療法は、野生型D1に比べて血管内NETの分解に効果的であると仮定した。仮説を検証するために、DNase1^{-/-}DNase1L3^{-/-}欠損マウスでCsrf3を発現させて、NETの血管血餅を誘発した。重要な点として、転帰に先行して、NETによる血管閉塞を有するマウスは血尿及び低体温を発症するため、これにより非侵襲的に検出することができる。したがって、動物モデルにより、NETを形成したマウスを同定し、したがって選択して、NETに対する急性療法の薬物候補を試験することができる（図36B）。本明細書において、NETに対する急性療法用の、精製した野生型ヒトD1（ドルナーゼα；配列番号1）、野生型ヒトD1L3（配列番号2）、及び機能亢進性D1L3バリエーション[D1L3^V；（配列番号17）]を試験した。Csrf3をDNase1^{-/-}DNase1L3^{-/-}欠損マウスに注射した。72時間後、最初の個々の動物が低体温症及び血尿を発症し始めた。4℃以上の体温の低下と赤色尿の存在を選択基準として使用した。これらの表現型を発症したマウスを、異なる治療群に無作為化した。動物に、1mg/kgのD1、D1L3、またはビヒクルを尾静脈から単回用量で静脈内注射した。30分後、動物を安楽死させて、生体サンプル（血液及び臓器）を採取した。肺の脈管構造におけるNET血餅の定量化により、ビヒクルまたはD1療法を受けているマウスにおいてNETが血管を閉塞したことが示された（図36D）。重要な点として、D1L3及びD1L3^Vを注射したマウスは、NET血餅を全くまたはほとんど示さなかった（図36D）。患者においては、循環DNAはモノヌクレオソームにおけるDNAのサイズ[180塩基対、（33）]を有しており、このことはそれがクロマチンの高分子量DNAの分解産物であることを示している。循環DNAは、血管内NET形成の代替マーカーとして一般的に使用されるが、損傷組織及び壊死組織にも由来し得る（34）。蛍光DNAプローブを使用して血清中のDNAを定量した。D1L3及びD1L3^Vの注射により、循環DNAレベルの強い増加が引き起こされたが、D1またはビヒクルでは引き起こされなかったことが観察された（図36E）。循環DNAの単離及び可視化により、多量体の180塩基対断片が示され、D1L3療法を受けたマウスの血清中のモノ及びオリゴヌクレオソームの存在が示された（図36F）。D1L3^Vを投与したマウスは、モノヌクレオソーム及びジヌクレオソームのみを示した。データからは、*in vivo*でのD1L3^Vの機能亢進性が確認される。D1療法を受けたマウスの血清由来のDNA単離物は、様々なサイズのかすかなDNAスメアを示したが、ビヒクルを注射したマウスの血清からはDNAを単離することができなかった（図36F）。したがって、D1L3は、予防のためだけでなく、NETに関連する疾患の急性治療にも使用し得る。

【0191】

虚血再灌流損傷のモデルにおけるD1L3^Vの治療用途をさらに調査した（図37A）

。簡潔に述べると、雄の野生型ラットの1つの睪丸を、以前に本発明者らが記載したように精巣捻転に供した(35)。この手順により、虚血性組織損傷が引き起こされる。睪丸の無作為化及び減捻の後、ラットにビヒクルドルナーゼα(D1、1mg/kg)、または精製DNase1L3バリエーション(配列番号17、D1L3^V、1mg/kg)を毎日3回注射した。7日後、虚血性の精巣及び未処置の精巣を回収した。D1L3^Vによる治療は、精巣萎縮を有意に減少させたが、生理食塩水またはD1では減少しなかった(図37B)。さらに、D1L3^Vによる治療は、組織損傷を実質的に減少させ、動物の大部分は損傷の徴候を示さなかったが、生理食塩水またはD1ではそうではなかった(図37C)。まとめると、データからは、D1L3が虚血再灌流損傷に対する強力な治療法として同定される。

【0192】

DNase1バリエーション、DNase1様3及びバリエーションの薬物開発

すべてのタンパク質治療薬のほぼ70%がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)を使用して製造されている(36)。実際、野生型DNase1(ドルナーゼα)はCHO細胞において産生される。大きな利点にもかかわらず、CHOでの細胞株開発と大規模生産には、かなりの程度の変動性と、細胞増殖特性を予測またはモデル化するための信頼できる方法がないことから、依然として大きな課題が残されている(36)。重要な点として、CHO細胞はD1の機能亢進性バリエーションを安定して産生することができなかったため、それらの臨床製造は妨げられていた(12)。D1L3の製造特性は不明である。したがって、野生型D1(配列番号1)、機能亢進性D1バリエーション(配列番号7)、野生型D1L3(配列番号2)、及び機能亢進性D1L3バリエーション(配列番号17)を産生する安定したCHO細胞株を開発した。細胞株をバイオリアクター内で培養したところ、野生型D1及びD1バリエーションで安定したタンパク質発現が観察され、後者は、発現レベルが大幅に増加していたが(図38)、このことはCHOにおいて機能亢進性D1バリエーションを産生する実行可能性を示している。予想に反して、野生型D1L3及びD1L3バリエーションは、わずかなタンパク質レベルが観察されたに止まり(図38)、D1L3及びそのバリエーションの臨床製造の主要な課題が指し示された。

【0193】

大規模バイオリアクターにおける細胞密度が高いため、細胞は資源を奪い合い、細胞ストレスを受けてアポトーシスと呼ばれる細胞死の増加がもたらされるが、これは、哺乳類を含む多細胞生物が使用する細胞死プログラムである(37)。D1L3は、アポトーシス小体のDNAを標的とする(7)。低レベルのD1L3は、これらのアポトーシス小体による酵素の除去によるものと推測した。これらの制限を克服するために、確立され、FDA承認済みで、一般的に安全であると認識されている(GRAS)生物であり、タンパク質分泌能力を有する微生物発現系*Pichia pastoris*を用いて、D1、D1L3及びそれらのバリエーションの産生を試験した(38、39)。このアプローチの重要な制限は、*P. pastoris*によって産生されるタンパク質が多くの場合に過剰にグリコシル化され、免疫原性の増強をもたらすことである(40)。D1L3とそのバリエーションの組成物は、グリコシル化されておらず、*P. pastoris*での発現に最適である。D1及びそのバリエーションのグリコシル化部位をそれぞれN40S及びN128Sで変異させ、脱グリコシル化タンパク質(配列番号21、23)を生成した。*P. pastoris*のタンパク質発現は、通常、目的のタンパク質を様々な起源の分泌性シグナルペプチドに結合することによって達成される。この工程を省略して免疫原性キメラタンパク質の生成を回避した。D1及び／またはD1L3の天然シグナルペプチドは*P. pastoris*によって認識されると推測した。コドン最適化を行った後、*P. pastoris*においてcDNA(配列番号22、24～26)を発現させた。D1及びD1バリエーションの発現を達成した(未記載)。重要な点として、本アプローチはさらに、D1L3及びD1L3バリエーションの発現を可能にし、後者は発現レベルの増加を示した(図38)。タンパク質を精製し、D1L3の活性が増加していることを確認した(図38)。結論として、データは、*P. pastoris*などの非哺乳類発現系を使用して、D1L3及び

10

20

30

40

50

そのバリエーションを臨床製造することができることを示唆している。

【0194】

考察

2つのDNA分解酵素は、実験モデル及び患者において治療的に広く使用されている。Streptococcus種から分泌されるDNaseであるストレプトドルナーゼは、皮膚の同種移植片、膀胱血餅、創傷壊死組織切除、髄膜炎の疾患モデルにおいて試験されている。DNase1（脾臓DNase1を含む）は、がん、嚢胞性線維症、ループス、血栓症、脳卒中、敗血症、肺損傷、アテローム性動脈硬化症、ウイルス感染症、鎌状赤血球症、心筋梗塞、耳感染症、創傷治癒、肝損傷、心内膜炎、肝臓感染症、脾炎、原発性移植片機能不全、四肢虚血再灌流障害、腎臓損傷、血液凝固、喘息、ミョウバン誘発炎症、肝腎損傷の実験モデルにおいて治療的に使用されている。ストレプトドルナーゼはまた、胸水滲出、血胸、胆管内血餅、肺炎後貧血、潰瘍、耳鼻咽喉病態、口腔感染症、軽傷、副鼻腔炎、術後鼻形成術、不妊症、膀胱カテーテル、創傷洗浄、皮膚反応検査を有する患者の治療にも使用されている。重要な点として、DNase1は、肺炎球菌髄膜炎、痛風、下肢潰瘍、嚢胞性線維症、カルテゲナー症候群、喘息、肺葉無気肺、慢性気管支炎、気管支拡張症、ループス、原発性線毛機能不全、細気管支炎、膿胸、胸膜感染症、がん、ドライアイ疾患、下気道感染症、慢性血腫、アルツハイマー病、及び閉塞性肺疾患を有する患者において治療的に試験されている。本実施例では、D1L3、そのバリエーション、及びD1バリエーションをDNase療法の新規候補として同定した（図39）。

【0195】

方法

クロマチン分解活性の検出

クロマチン分解活性を測定するために、サンプルを、HEK293（反応あたり1,500,000〜3,000,000個）から単離した核、20mM Tris-HCl pH7.4、2mM MgCl₂、2mM CaCl₂、50mM NaCl及びプロテアーゼ阻害剤と混合した。サンプルを37℃で1時間インキュベートした後、サンプルを65℃まで10分間加熱した。QIAamp DNA Blood Mini Kit（Qiagen）を使用して、製造元のプロトコルに従ってDNAの単離を行った。次いで、溶出液をアガロースゲルにロードし、ゲル電気泳動によりDNA断片を分離した。ゲルのDNA蛍光を蛍光スキャナーで記録した。

【0196】

さらなる方法は、実施例1に記載されている。

参考文献

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, in Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 2.
2. V. Brinkmann et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science (New York, N.Y.) 303, 1532-1535 (2004).
3. T. A. Fuchs, A. Hakkim, C. F. Urban, in Inflammation: Fundamental Mechanisms, K. Ley, Ed. (World Scientific, 2018), chap. 6.
4. D. Shiokawa, S. Tanuma, Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. Biochemistry 40, 143-152 (2001).
5. M. Napierei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from

- the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J* 380, 929–937 (2004).
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).
7. V. Sisirak et al., Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* 166, 88–101 (2016).
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).
9. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezzrhab, 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).
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).
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).
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).
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).
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).
15. R. Mizuta et al., DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* 8, e80223 (2013).
16. H. J. Fuchs et al., Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbatio

10

20

30

40

50

ns of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 331, 637–642 (1994).

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).

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

10

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

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

20

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

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

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

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).

30

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).

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).

40

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).

50

28. M. C. Schneider, A. Wilber. (United States, 2004), vol. US 2004/0138156.
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).
30. B. T. Bettinger, D. M. Gilbert, D. C. Amberg, Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 410–415 (2004). 10
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).
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). 20
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).
34. M. Jimenez-Alcazar, N. Kim, T. A. Fuchs, Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost* 43, 553–561 (2017). 30
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).
36. A. D. Bandaranayake, S. C. Almo, Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters* 588, 253–260 (2014).
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). 40
38. J. L. Cereghino, J. M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* 24, 45–66 (2000).
39. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for 50

heterologous protein production. Applied microbiology and biotechnology 98, 5301–5317 (2014).

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).

野生型DNasesの配列

配列番号1

ヒトDNase1 (P24855), アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MRGMKLLGALLALAAALLQGAVSLKIAAFNIQTTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRDShLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAAYGLSDQLAQAI SDHY PVEV MLK

10

20

配列番号2

ヒトDNase1L3 (Q13609), アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDIQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
KKS VTLRKKTKSKRS

30

配列番号3

マウスDNase1 (P49183) : アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MRYTGMLGTLTLVNLLQLAGTLRIAAFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRDIAV
IQEVDRDShLVAVGKLLDELNRDKPDTYRYVVSEPLGRKSYKEQYLFVYRPDQVSILDS
YQYDDGCEPCGNDTFNREPAIVKFFSPYTEVQEFIVPLHAAPTEAVSEIDALYDVYL
DVWQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTVTSTHCA
YDRIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDFQAEYGLSNQLAEAISDHYPVEVTLRKI

40

配列番号4

ラットDNase1 (P21704), アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

50

MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRDYDIAV
VQEVDRDTHLVAVGKLLDELNRDIPDNYRYIISEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDS
YHYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVREFAIIVPLHSAPTEAVSEIDALYDVYL
DVRQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTATSTHCA
YDRIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDFAEYRLTNQMAEAI SDHYPVEVTLRKT

配列番号 3 4

マウス D N a s e 1 L 3 (O 5 5 0 7 0) : アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

10

MSLHPASPRLASLLLFILALHDTLALRLCSFNVRSEFGASKKENHEAMDIIVKIIKRCD
LILLMEIKDSSNNICPMLMEKLNNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLV
SVKTKYHYHDYQDGD TDVFSREP FVVWFHSPFTAVKDFVIVPLHTTTPETSVKEIDELV
DVYTDVRSQWK TENFI FMGDFNAGCSYVPKAWQNI RLRTDPKFVWLIGDQEDTTVKK
STSCAYDRIVLCGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYDLSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSR
AFTNNRKS VSLKKRKKGNRS

20

配列番号 3 5

ラット D N a s e 1 L 3 (O 8 9 1 0 7) : アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MSLYPASPYLASLLLFILALHGALSRLCSFNVRSEFGESKKENHNAMDIIVKIIKRCD
LILLMEIKDSSNNNICPMLMEKLNNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLV
SVKAKYLYHDYQDGD TDVFSREP FVVWFQAPFTA AKDFVIVPLHTTTPETSVKEIDELA
DVYTDVRRRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPNFVWLIGDQEDTTVKK
STSCAYDRIVLRGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYELSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSR
AFTNSRKS VSLKKKKKGSRS

30

配列番号 3 6

チンパンジー D N a s e 1 (H 2 Q A H 1) : アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MRSMKLLGALLALAALLQGA VSLKIAAFNIQT FGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIAL
VQEVDRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPA FQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLQGA VVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

40

配列番号 3 7

チンパンジー D N a s e 1 L 3 (H 2 Q M U 7) : アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

50

MSRELTPLLLLLLLSIHSTLALRICSFNVRSFGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICFILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
KKSVTLRKKTKSKRS

10

配列番号 38

**ヒトDNase1様1 (NM_006730 (下線付き)) : アミノ酸配列 (シグナルペ
プチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :**

MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEV
VDSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSSYVY
NDEDDVFAREPFVAQFSLPSNVLPVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFEVLSQHWQS
KDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLH
GERCRSLLHTAAAFDFPTSFQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLL
LSLLSPQLCPAA

20

配列番号 39

**ヒトDNase1様2 (NM_001374 (下線付き)) : アミノ酸配列 (シグナルペ
プチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :**

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSI IAKILAGYDLALV
QEV RDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSEFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVDY
LYPDPEDEVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPH
QAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCYVRAQDWAAIRLSSEVFKWLI
PDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRSLKPQSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFP
VEVTLKEHR

30

ヒトDNase1 L3のC末端テール**配列番号 33**

アミノ酸配列 :

SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

40

DNase1バリエーションの配列**配列番号 5**

アミノ酸配列 (シグナルペプチド (下線付き) ; 成熟タンパク質) :

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDYDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 6

10

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDYDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVKEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYKLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 7

20

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 8

30

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 9

40

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVKEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

50

配列番号 1 0

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNRRNSRRGITYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAV
DSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTH
CAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

10

配列番号 1 1

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

20

配列番号 1 2

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

30

配列番号 1 3

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

40

配列番号 1 4

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

50

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTVKKSTHC
AYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 15**アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：**

10

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAV
DSYYYDDGCEPCGNDTFNREFPVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKST
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

配列番号 16**アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：**

20

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS

YYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHFPVEFKLQSSRAFTNS
KKSVTLRKKTKSKRS

30

D N a s e 1 L 3 バリエーションの配列**配列番号 17****アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：**

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVLIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
VKHRWKAENFI FMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

40

配列番号 18**アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：**

50

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKQENKTAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDNDTFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFIEMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFEQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KKSVTLRKKTKSKRS

10

配列番号 19

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDYQDGDADVFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTD
 VKHRWKAENFIEMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
 YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFEQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNS
 KKSVTLRKKTKSKRS

20

配列番号 20

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVM
 EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
 YHYHDGCEPCGNDTFNREPFVWVFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYT
 DVKHRWKAENFIEMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNC
 AYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFEQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTN
 SKKSVTLRKKTKSKRS

30

Pichia pastoris で使用される配列

配列番号 21

アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDIAL
 VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
 YYYDDGCEPCGSDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIIVPLHAAPGDVAEIDALYDVYL
 DVQEKWGLEDMVMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCA
 YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQALSDHYPVEVMLK

40

配列番号 22

配列番号 21 のコドン最適化 cDNA（開始コドン（太字、下線付き），シグナルペプチド（下線付き））：

50

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAAGGAG
CAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTCAAACCTTTGGCGAGACTAAAATGTC
CTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTGAGATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTG
GTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAGACAATCTTA
ACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAACTC
CTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCT
TACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCAG
CTATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCATCGTTCCATT
GCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTG
GACGTTGAGGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTG
GTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAAC
GTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCACTCCCACTCATTGTGCA
TATGACAGAATTGTTGTCGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTG
CTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCAT
CTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

10

20

配列番号 2 3**アミノ酸配列（シグナルペプチド（下線付き）；成熟タンパク質）：**

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSSATLVSYIVQILSRVDIAL
VQEVDRSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDS
YYYDDGCEPCGSDTFNREFFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYL
DVQEKWGLEDVMLMGDFENAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCA
YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

30

配列番号 2 4**配列番号 2 3 のコドン最適化 cDNA（開始コドン（太字、下線付き），シグナルペプチド（下線付き））：**

40

50

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAAGGAG
CAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCCTTTGGCGAGACTAAAATGTC
 CTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTTACAGATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTG
 GTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCCGTAAGCTGCTAGACAATCTTA
 ACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAACTC
 CTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGCTGCTGTGGACTCT
 TACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCAT
 TCATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCCGCCATCGTTCCATT
 GCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTG
 GACGTTTACGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTG
 GTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAAC
 GTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAAGCCCACTCATTTGTGCA
 TATGACAGAATTGTTGTGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTG
 CTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCAT
 CTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

10

20

配列番号 2 5

配列番号 2 のコドン最適化 cDNA（開始コドン（太字、下線付き），シグナルペプチド（下線付き））：

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCG
CCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAA
 AAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATG
 GAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCATCCTTATGGAAAAGCTGAATAGAA
 ACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACCTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACAC
 TTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCT
 TACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTCTCCAGAGAACCATTCG
 TTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACA
 CACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACCTGTTGAAGTTTACACCGAC
 GTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTTCAATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGAT
 GCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAACCATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATT
 TGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCT
 TACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCA
 ACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGT
 GTCCGACCACTTCCCTGTAGAGTTAAGCTGCAATCCTCCAGAGCATTCACTAACTCT
 AAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCTAAGAGATCG

30

40

配列番号 2 6

配列番号 17 のコドン最適化 cDNA（開始コドン（太字、下線付き），シグナルペプチド（下線付き））：

50

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCG
CCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAA
AAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATG
GAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGCTGAATAGAA
ACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACACTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACAC
TTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCT
TACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTCTG
TTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACA
CACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGAAGTTTACACCGAC
GTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTCATTTTCATGGGTGATTTC AACGCCGAT
GCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATT
TGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCT
TACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTGAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCA
ACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGT
GTCCGACCACTACCCTGTAGAGGTCATGTTGAAG

10

20

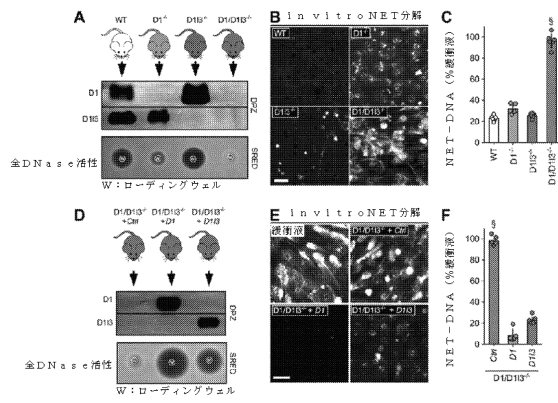
30

40

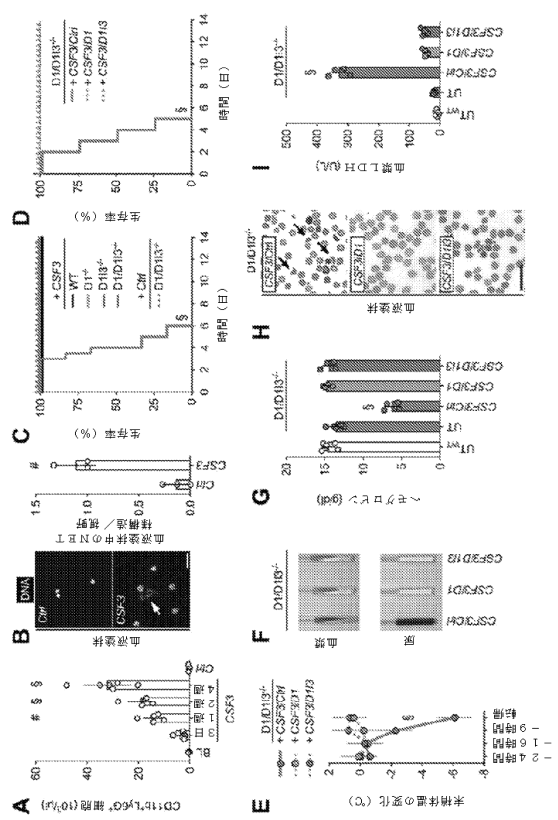
50

【図面】

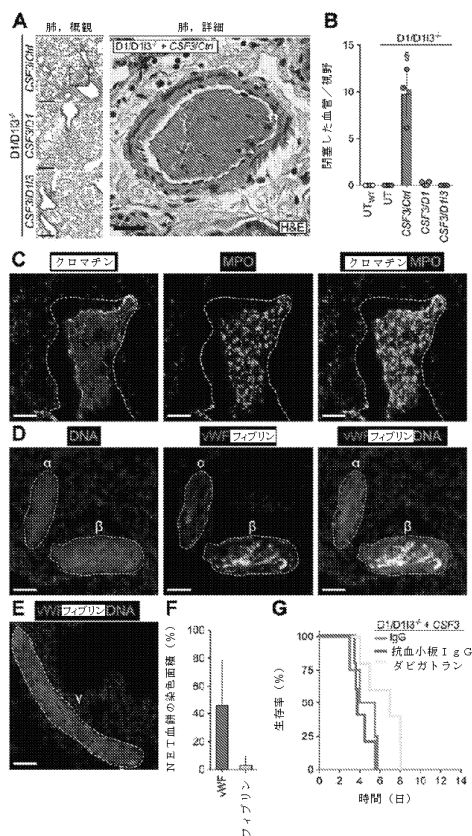
【図 1】



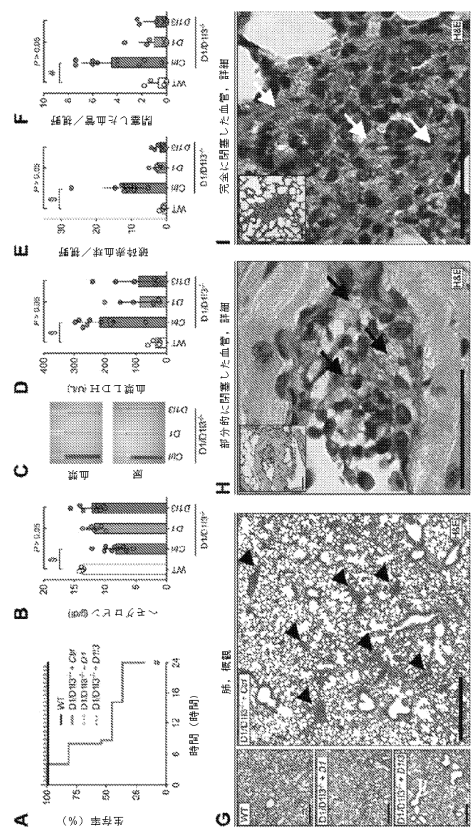
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

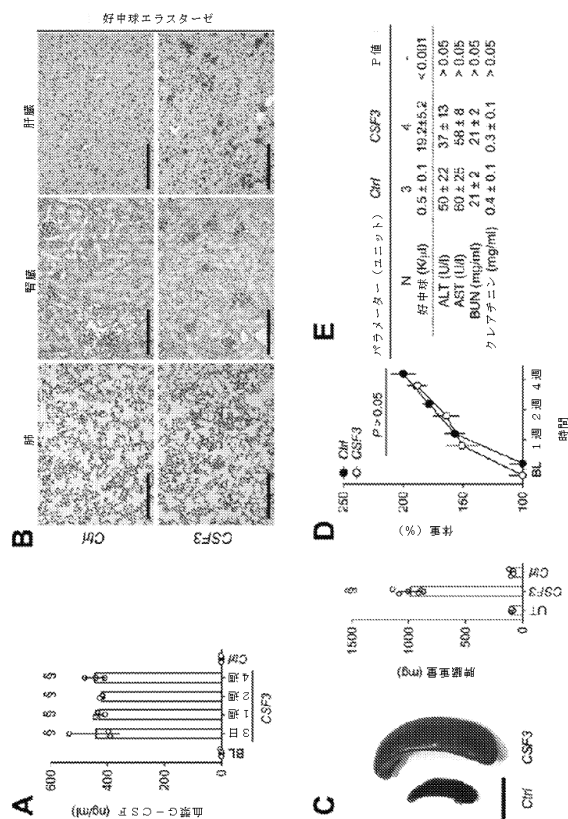
20

30

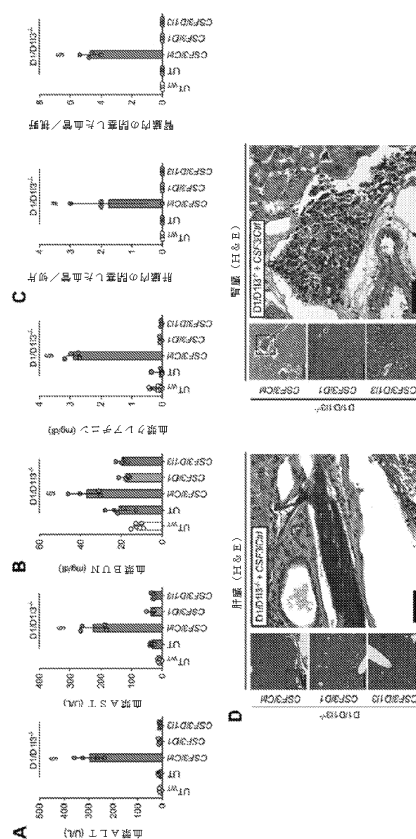
40

50

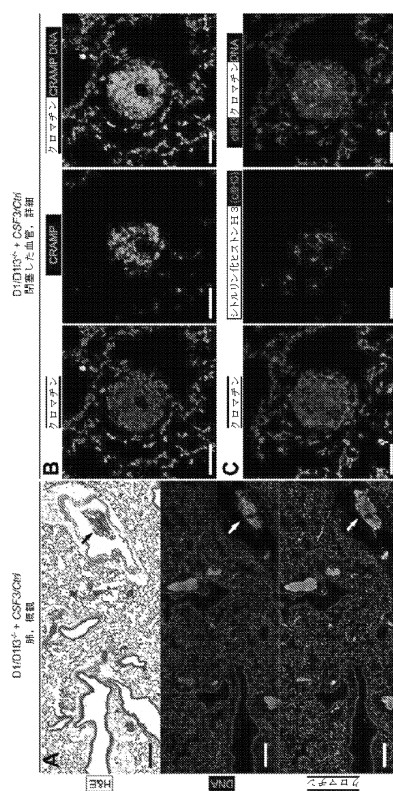
【図 5】



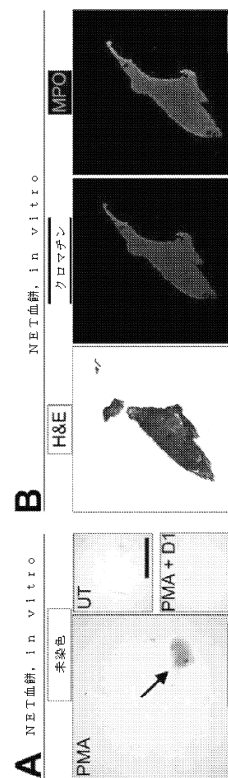
【図 6】



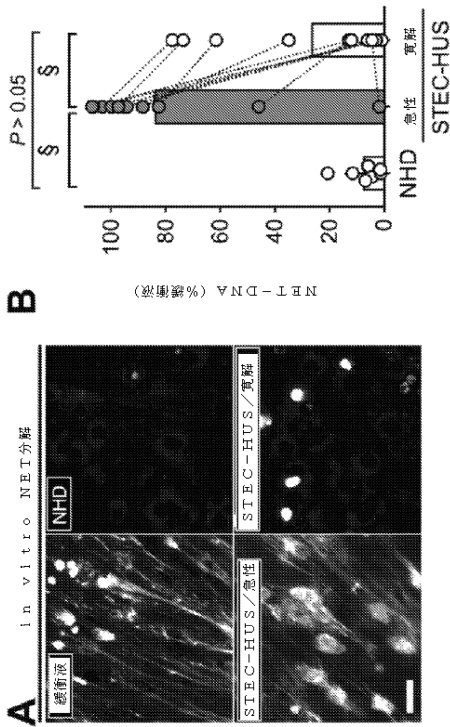
【図 7】



【図 8】



【図 9】



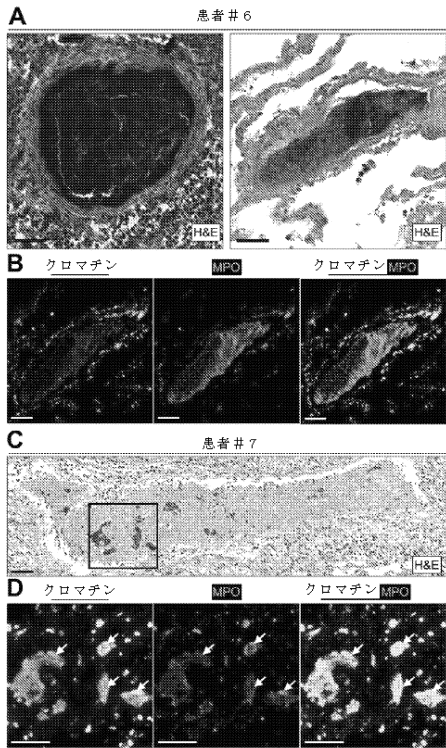
【図 10】

症例	死因	性別	年齢	組織	ヘマトキシリン染色血筋	クロマチン及びMPO陽性	局在化
1	ARDS	M	84	肺	あり	あり	気管支
2	敗血症性心血管障害 + ARDS	F	63	肺	なし	該当なし	該当なし
3	ARDS	F	67	肺	なし	該当なし	該当なし
4	敗血症性多臓器不全 + ARDS	M	72	肺	あり	あり	気管支
5	敗血症性心血管障害 + ARDS	F	75	肺	なし	該当なし	該当なし
6	敗血症性多臓器不全	M	60	肺	あり	あり	血管
7	敗血症性心血管障害	F	76	肺	あり	あり	血管
8	ARDS	F	68	肺	なし	該当なし	該当なし

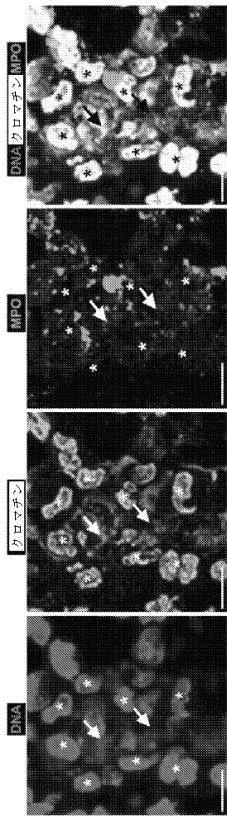
10

20

【図 11】



【図 12】

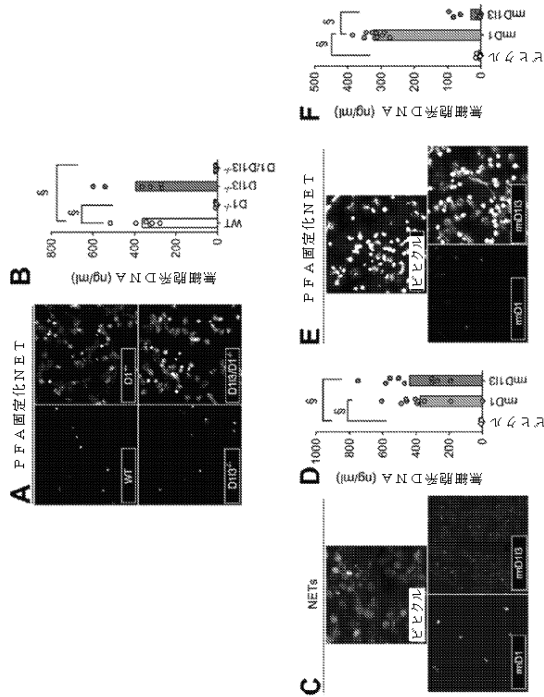


30

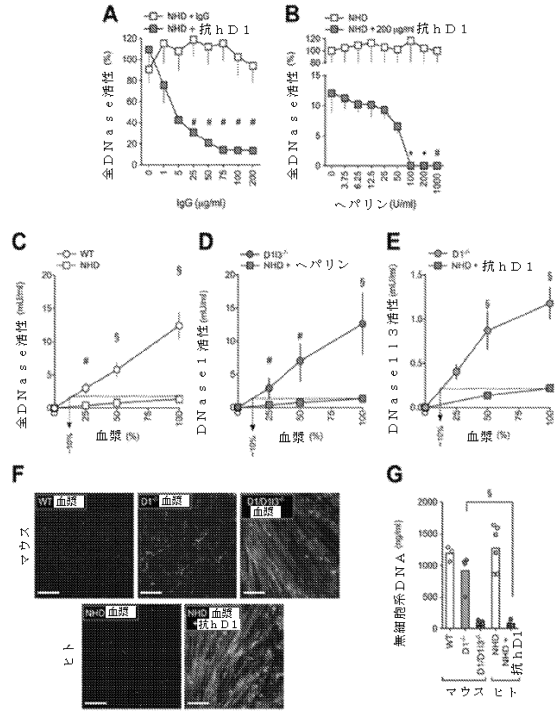
40

50

【図 13】



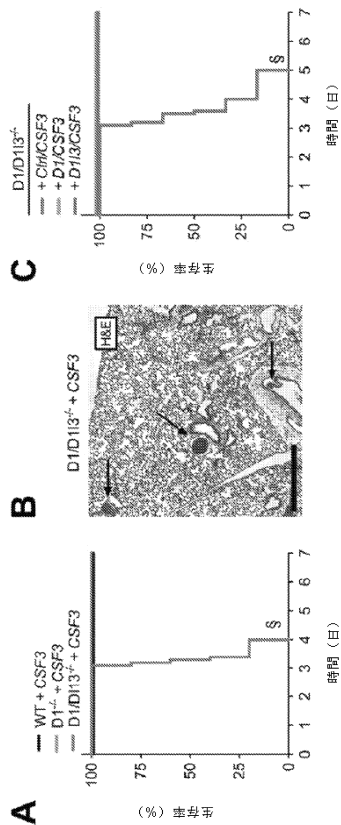
【図 14】



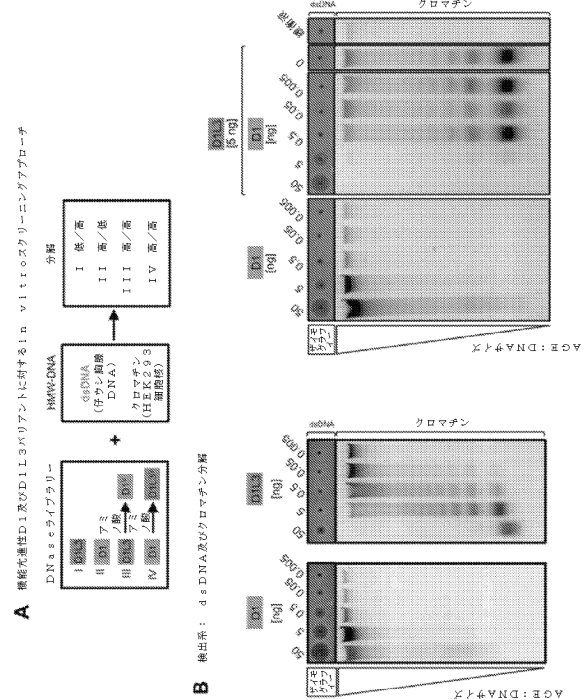
10

20

【図 15】



【図 16】

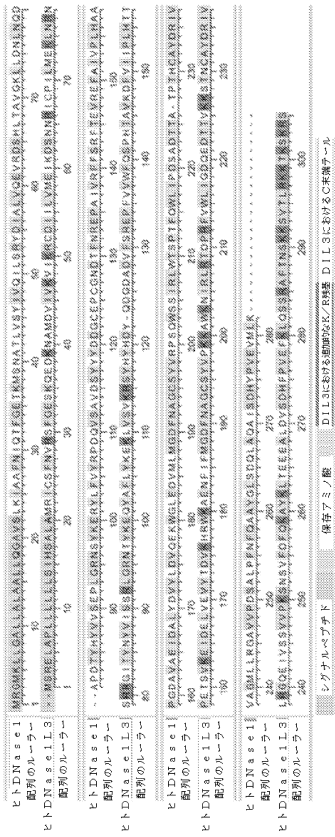


30

40

50

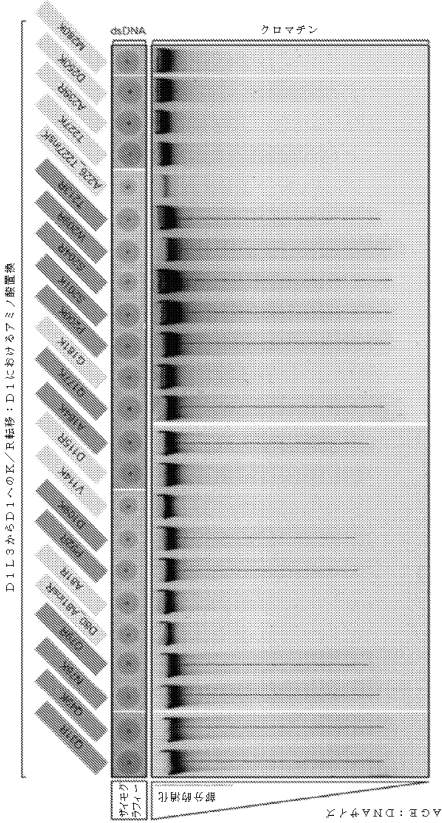
【図 17】



【図 18】

#	DNase1L3	DNase1	DNase1 中の変異	本出題における分析
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 (Q155K)	+
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)	-	-	-

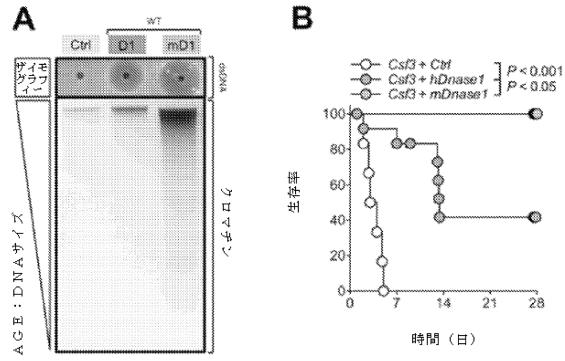
【図 19】



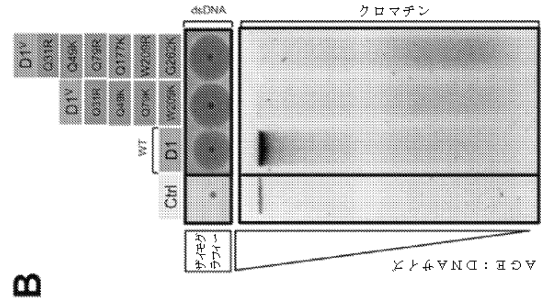
【図 20】

#	DNase1L3	DNase1	DNase1 中の変異	本出題における分析
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 (Q155K)	+
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)	-	-	-

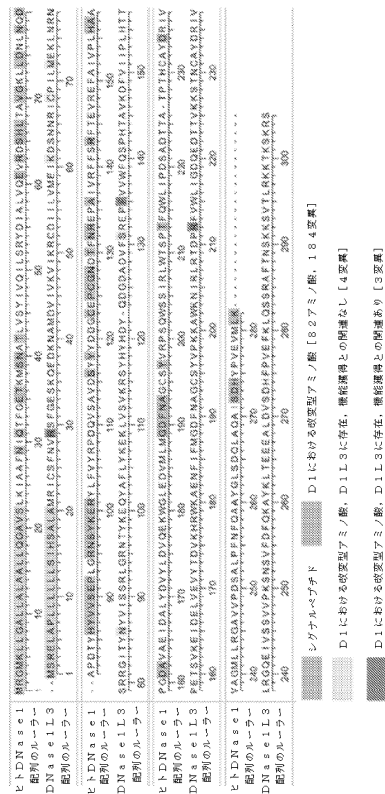
【図 2 1】



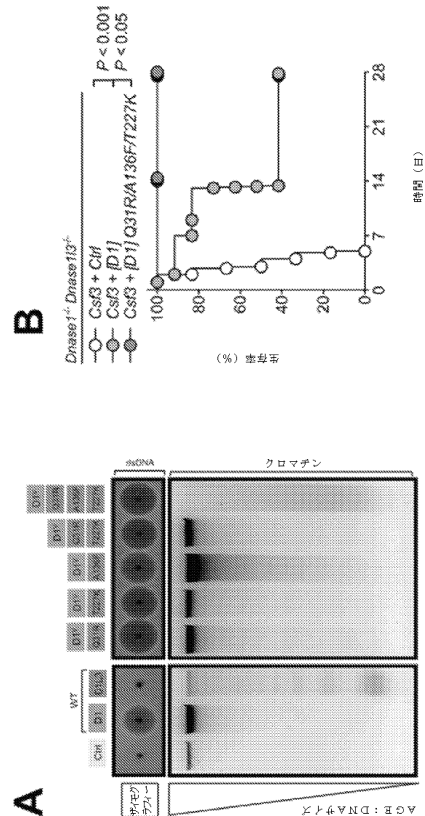
【図 22】



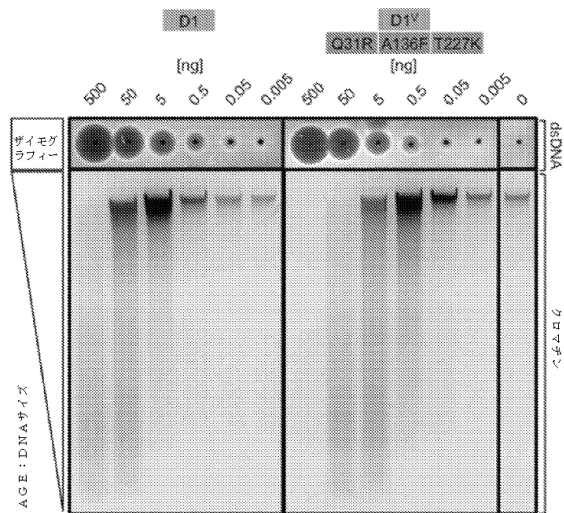
【図 23】



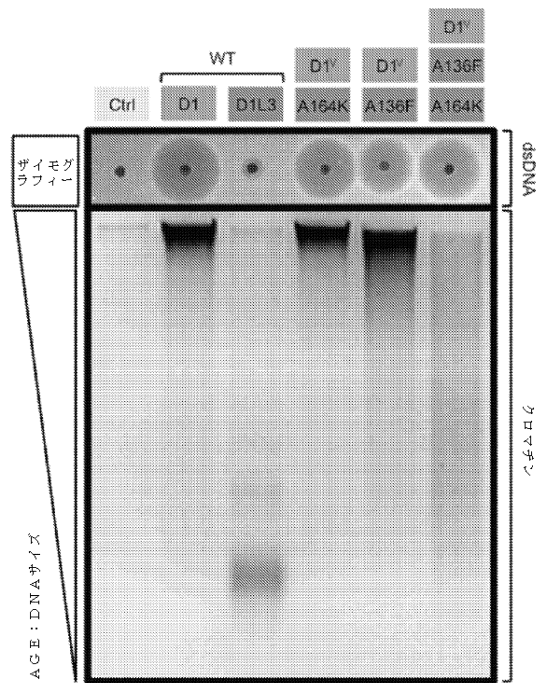
【図 24】



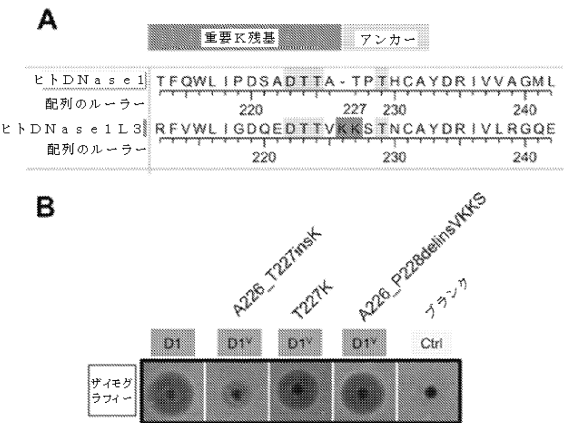
【図 2 5】



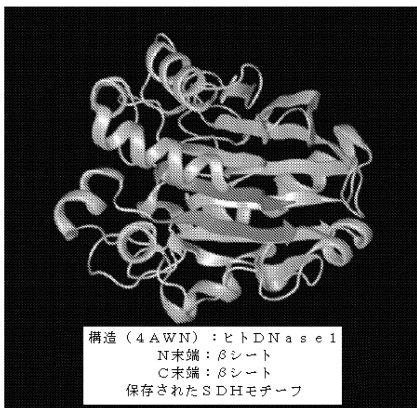
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

20

30

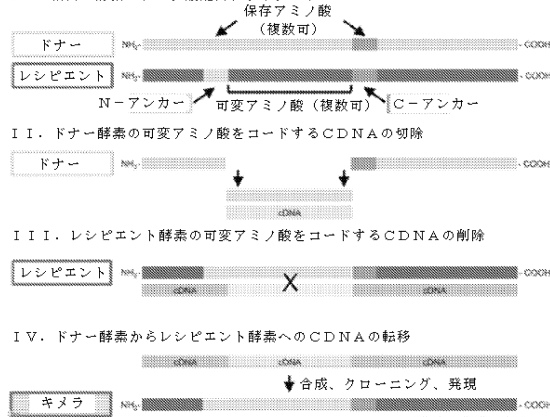
40

50

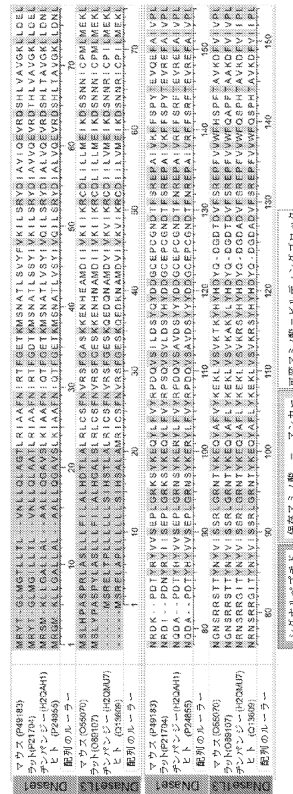
【圖 29】

相同タンパク質のビルディングブロック改変

I. 相同な酵素のアミノ酸配列アライメント



【図 30-1】



【図 30-2】

マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	160	170	180	190	200	210	220	230
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	240	250	260	270	280	290	300	310
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	320	330	340	350	360	370	380	390
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	400	410	420	430	440	450	460	470
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	480	490	500	510	520	530	540	550
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	560	570	580	590	600	610	620	630
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	640	650	660	670	680	690	700	710
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	720	730	740	750	760	770	780	790
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	800	810	820	830	840	850	860	870
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	880	890	900	910	920	930	940	950
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550
マウス (mouse)	HAARTFANGSEIDALVYXIDVNDWQKLEEDIMEDNENAGSGVSTSCNGSRIRLQWIPRQATVUTSTGICAYD								

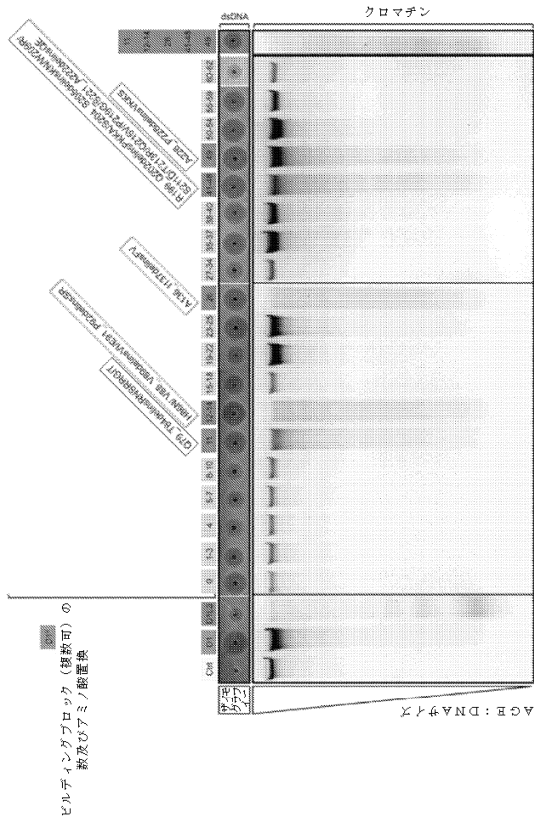
マウス (mouse)マウス

【図 3 1 A - 1】

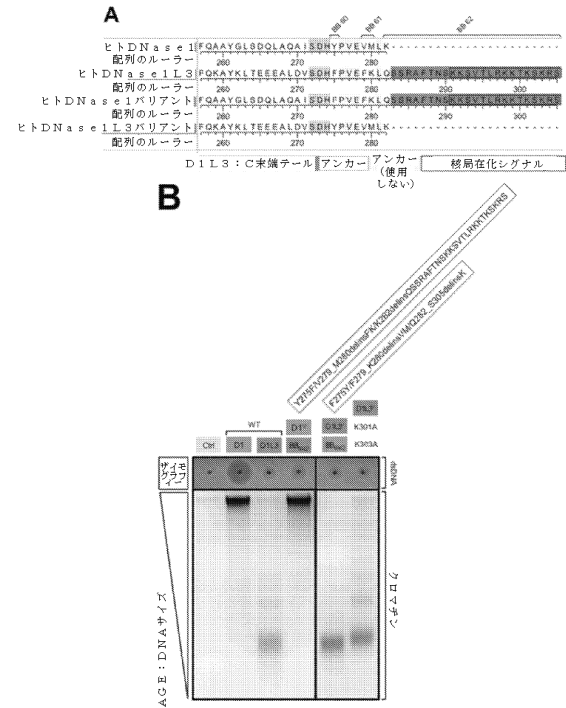
[illegible]

A: ビルディングブロック変更の例: ビルDNase1 (DIL3) 由来のビルディングブロックを精製するとDNase1 (D1) バリエーション

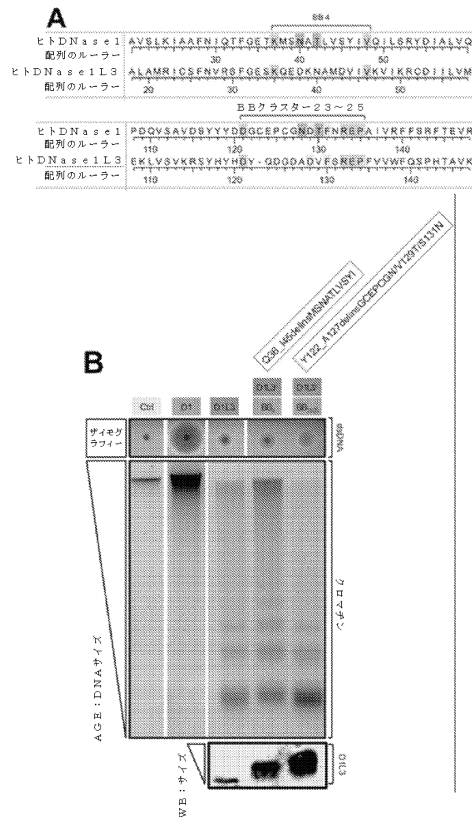
【図 3 3】



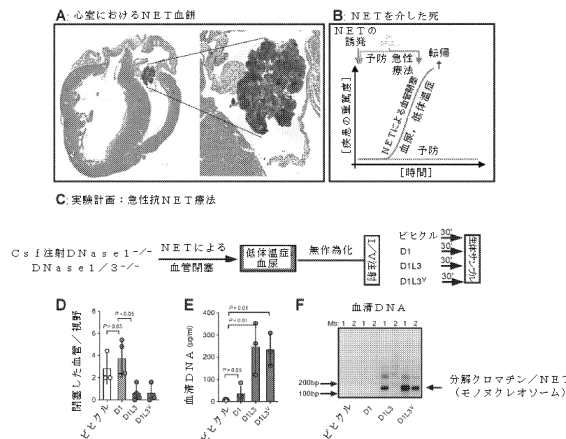
【図 3 4】



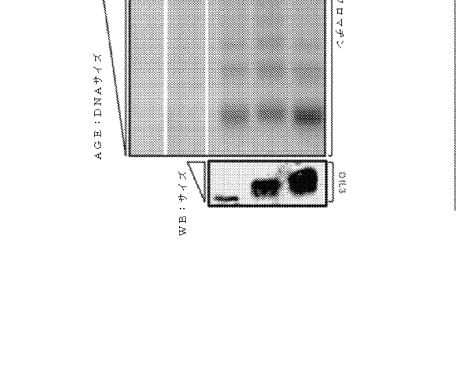
【図 3 5】



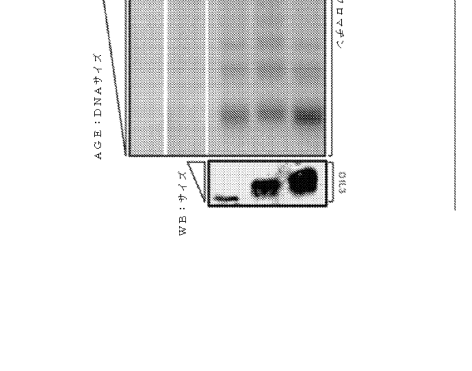
【図 3 6】



【図 3 6】



【図 3 6】

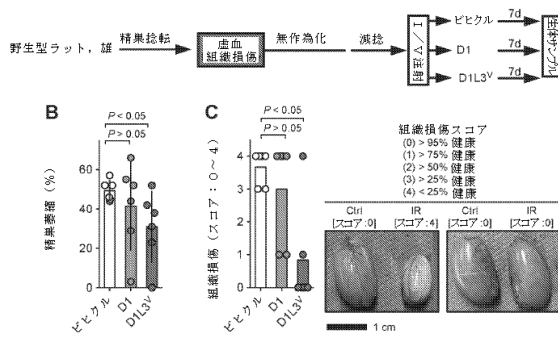


【図 3 6】



【図 3 7】

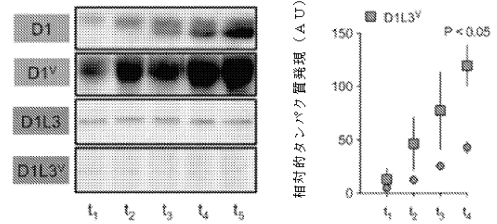
A: 實驗計畫：虛血再灌流損傷療法



【図 38】

A チャイニーズハムスター卵巣
 (CHO)細胞

B *Pichia pastoris*



C

D1L3 [ng] D1L3V [ng]

500 50 5 0.5 0.05 0.005 500 50 5 0.5 0.05 0.005

サイモグラフィー

AGE: DNA サイナス

【図 39】

配列番号	分類記載	変異 (シグナルペプチドを含まない成熟タンパク質)	ビルディング ブロック数	標的配列 番号
5	Dnae3 パリメント	Q31RQ4QKQ9KW69K (DRQ27KQ5KW19K)		
6	Dnae3 パリメント	Q31RQ4QKQ9KW69KQ25K (DRQ27KQ5KW19KQ24K)	1	
7	Dnae3 パリメント	Q31RMA3E7127K (ORVAT11E725K)	1	
8	Dnae3 パリメント	A1HEA16K (A1HEA24K)	1	
9	Dnae3 パリメント	Q7L T4GLDINKNSRGRT (Q2L T4ZGLDINKNSRGRT)	1	*(BB1)
10	Dnae3 パリメント	HBNVHS_VPSDINKNSRGRT (H4NVPS_VPTDINKNSRGRT)	1	*(BB1a)
11	Dnae3 パリメント	A136_137delinkSV A114_115delinkSV	1	*(BB3)
12	Dnae3 パリメント	R196_Q26delinkPKAS204_Q26delinkKNWP95S110T13RQ215V P196S321_A22delinkQE		
13	Dnae3 パリメント	R171_O16delinkPKAS182_S183delinkKNWP85S18Q217H18Q150V P197G-S199_A200delinkQE	1	*(BB1a)
14	Dnae3 パリメント	A22E_P26delinkVYKS (A204_P26delinkVYKS)	1	*(BB4)
15	Dnae3 パリメント	Q7L T4GLDINKNSRGRT16NVHS_VPSDINKNSRGRT_P26delinkSR A136_137delinkSV R196_Q26delinkPKAS204_Q26delinkKNWP95S311D T24SRQ215VP219G321_A22delinkQE428_P26delinkVYKS Q17_T24delinkNSRGRT16NVHS_VPTDINKNSRGRT_P26delinkVYKS A114_115delinkSVR171_O16delinkPKAS182_S183delinkKNWP85S18Q215 T19SRQ180P197G-S199_A200delinkQE A204_P26delinkVYKS	1	*(BB1, BB1a, BB4, BB4a)
17	Dnae3 L3 パリメント	T27F77F79_K26delinkVQ232_S130delink (T25F77F79_K26delinkVQ232_S130delinkSV)	2	*(BB5a)
18	Dnae3 L3 パリメント	Q12_KdelinkMNSATLVS1 (Q16_K2delinkMNSATLVS1)	2	*(BB6)
19	Dnae3 L3 パリメント	Y12_A17delinkCEPGQVW127S11M (Y02_A17delinkCEPGQVW127S11M)	2	*(BB7)

【配列表】
0007577314000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	9/22	(2006.01)	C 1 2 N	9/22	Z N A
C 1 2 N	9/96	(2006.01)	C 1 2 N	9/96	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N	15/55	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

トリート 7 0 0 シー／オー ニュートロリス セラピューティクス インコーポレイテッド

(72)発明者

ゲーベル ジョセフィン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ ケンブリッジ ノース メイン ストリート 7 0 0
シー／オー ニュートロリス セラピューティクス インコーポレイテッド

(72)発明者

イングラート ハンナ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ ケンブリッジ ノース メイン ストリート 7 0 0
シー／オー ニュートロリス セラピューティクス インコーポレイテッド

審査官

長谷川 茜

(56)参考文献

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2015年, Vol. 13, pp. 732-742

Molecular Therapy, 2002年, Vol. 6, No. 1, pp. 35-42

Biochem. J., 2005年, Vol. 389, pp. 355-364, figure 1

FEBS, 2009年, Vol. 276, pp. 1059-1073

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)