



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105120902 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201380073220. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 16

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 37/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/739, 072 2012. 12. 19 US

61/829, 251 2013. 05. 31 US

61/871, 277 2013. 08. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/075509 2013. 12. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/099824 EN 2014. 06. 26

(71) 申请人 得克萨斯州立大学董事会

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 志建·陈 丽君·孙 嘉西·吴

和平·史 绰·陈

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 王芝艳

权利要求书1页 说明书31页

(54) 发明名称

哺乳动物的环二核苷酸信号通路的药物靶向

(57) 摘要

环-GMP-AMP 合酶 (cGAS) 和包括 2' 3'-cGAMP、2' 2'-cGAMP、3' 2'-cGAMP 和 3' 3'-GAMP 的环-GMP-AMP(cGAMP) 用于药物制剂 (包括疫苗佐剂)、药物筛选、疗法和诊断。

1. 一种包含预定量的环 -GMP-AMP (cGAMP) 的组合物。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中 cGAMP 是 2' 3' -cGAMP、2' 2'-cGAMP、3' 2' -cGAMP 或 3' 3' -cGAMP。
3. 如权利要求 1 所述的组合物,其中 cGAMP 是 2' 3' -cGAMP。
4. 权利要求 1 所述的组合物,其基本上不含其它的环二核苷酸。
5. 一种包含权利要求 1 所述的组合物的佐剂。
6. 一种包含预定的抗原和权利要求 1 所述的组合物的疫苗。
7. 如权利要求 6 所述的疫苗,其中抗原对靶病原体具有选择性。
8. 一种诱导或促进免疫应答的方法,其包括向有需要的哺乳动物施用有效量的权利要求 1 所述的组合物。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中施用是经黏膜(舌下或鼻内)给药、肌肉内给药或皮下给药。
10. 一种抑制环 -GMP-AMP 合酶(cGAS)或抑制 cGAS 结合到底物或辅助因子的方法,其包括:
 - (a) 用有效量的外源 cGAS 抑制剂接触细胞或细胞提取物,并检测所获得的合酶的抑制;或
 - (b) 用有效量的外源 cGAS 抑制剂接触所确定的有需要的细胞;或
 - (c) 在抑制剂抑制了 ATP 和 GTP 到环 -GMP-AMP 和无机焦磷酸的合酶催化转化的条件下将包括合酶、ATP、GTP 的混合物与抑制剂接触,并检测所获得的合酶的抑制;或
 - (d) 在抑制剂抑制合酶与底物或辅因子的结合的条件下将包括合酶和 ATP 或 GTP 底物或 DNA 辅因子的混合物与抑制剂接触,并检测所获得的结合的抑制。
11. 如权利要求 10 的 (a)、(b) 或 (c) 所述的方法,其中
 - (i) 通过由二聚化或核转位、干扰素产生或 NF- κ B 激活所测量的环 -GMP-AMP 诱导的 IRF3 激活来推理性检测所获得的抑制;
 - (ii) 方法包括向确定有需求的且包含所述细胞的哺乳动物施用抑制剂;
 - (iii) 抑制剂是 cGAS- 特异性 shRNA 或 siRNA ;和 / 或
 - (iv) 混合物进一步包括 DNA 且转化是 DNA- 依赖的。
12. 一种制备权利要求 1 所述的环 -GMP-AMP (cGAMP) 的方法,其包括在合酶催化从 ATP 和 GTP 至 cGAMP 的转化的条件下,形成包括环 -GMP-AMP 合酶(cGAS)、ATP 和 GTP 的混合物,其中合酶、ATP 和 GTP 是预定量的,或者方法进一步包括分离或检测所获得的 cGAMP 的步骤。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中混合物进一步包含 DNA 且转化是 DNA- 依赖的。
14. 一种用于检测 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变的方法,其包括以下步骤:

检测来自人的样品中的 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变,并基于 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变向人分配自身免疫性疾病度量;和

任选地,向人施用用于自身免疫性疾病的疗法。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中 cGAMP 是 2' 3' -cGAMP。

哺乳动物的环二核苷酸信号通路的药物靶向

[0001] 本发明在由美国国立卫生研究院 (NIH) 提供的基金编号 ROI AI-093967 的政府支持下进行。政府对本发明具有一定的权利。

背景技术

[0002] 细胞质的 DNA 诱导 I 型干扰素和其它的细胞因子,其对于抗微生物防御是重要的,但也可导致自身免疫。此 DNA 信号通路需要衔接蛋白 STING 和转录因子 IRF3,但 DNA 传感 (DNA sensing) 的机制尚不清楚。本文中,本发明人报道了在存在 DNA 而没有 RNA 的情况下,哺乳动物细胞质提取物在体外从 ATP 和 GTP 合成了环 GMP-AMP (cGAMP)。哺乳动物细胞的 DNA 转染或 DNA 病毒感染也触发 cGAMP 的产生。cGAMP 结合 STING,导致激活 IRF3 并诱导干扰素 β (IFN β)。因此, cGAMP 代表了后生动物中的第一环二核苷酸,并且其作为响应细胞质 DNA 而触发干扰素产生的内源第二信使起作用。

[0003] 通过生化分级和定量质谱,本发明人还确定了 cGAMP 合酶 (cGAS),其属于核苷酸转移酶家族。cGAS 的过表达激活转录因子 IRF3 并以 STING- 依赖的方式诱导 IFN β 。敲除 cGAS 抑制了经 DNA 转染或 DNA 病毒感染的 IRF3 激活和 IFN β 诱导。cGAS 在细胞质中结合 DNA 并催化 cGAMP 合成。这些结果表明, cGAS 是胞质 DNA 传感器,其通过产生第二信使 cGAMP 诱导干扰素。

[0004] 本发明将这些发现应用于涉及环 -GMP-AMP 合酶 (cGAS) 和环 -GMP-AMP (cGAMP) 的新方法和组合物,包括其在制剂 (包括疫苗佐剂)、药物筛选、治疗方法和诊断中的用途。

发明内容

[0005] 在一个方面中,本发明提供了基于细胞的药物筛选,这包括抑制 cGAS 的方法,其包括将细胞或细胞提取物与有效量的外源性 cGAS 抑制剂相接触,并检测所获得的合酶抑制。在具体的实施方式中,通过环 -GMP-AMP 诱导的 IRF3 激活 (二聚化或核转位)、干扰素产生或 NF- κ B 激活来推理检测所获得的抑制。

[0006] 在另一个方面中,本发明提供了治疗方法,这包括抑制 cGAS 的方法,其包括将确定的有需求的细胞与有效量的外源 cGAS 抑制剂相接触。在具体的实施方式中,方法包括向确定的有需求且包含所述细胞的哺乳动物施用抑制剂,和 / 或抑制剂是小分子环化酶抑制剂或是 cGAS 特异性 shRNA 或 siRNA。

[0007] 在另一个方面中,本发明提供了体外药物筛选,这包括抑制 cGAS 的方法,其包括将包含合酶、ATP、GTP 的混合物与抑制剂在条件下相接触,其中所述条件下抑制剂抑制了经合酶的 ATP 和 GTP 到环 -GMP-AMP 和无机焦磷酸的催化转化,并检测所获得的合酶抑制。在一个具体的实施方式中,混合物进一步包括 DNA 并且转化是 DNA- 依赖性的。在其它的实施方式中, cGAS 是组成型活性的。

[0008] 在另一个方面中,本发明提供了体外药物结合测定,这包括抑制 cGAS 结合到底物或辅因子的方法,其包括将包含合酶和 ATP 或 GTP 的底物或 DNA 辅因子的混合物与抑制剂在条件下相接触,其中所述条件下抑制剂抑制了合酶到底物或辅因子的结合,并检测所获

得的结合抑制。

[0009] 在另一个方面中,本发明提供了制备 cGAMP 的方法,所述方法包括在条件下形成包含 cGAS、ATP 和 GTP 的混合物,其中所述条件下合酶催化转换 ATP 和 GTP 到 cGAMP,其中合酶、ATP 和 GTP 是预定义量的,或者方法进一步包括分离或检测所获得的 cGAMP 的步骤。在具体实施方式中,混合物进一步包括 DNA 并且转化是 DNA- 依赖性的。

[0010] 在另一个方面中,本发明提供了检测 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变的方法,所述方法包括以下步骤:检测来自人的样品中的 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变,并基于 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变将所述的人分配一个自身免疫性疾病度量;和任选地向所述的人施用用于自身免疫性疾病的治疗方法。

[0011] 在另一个方面中,本发明提供了包含预定量的 cGAMP 的组合物,如进一步包含针对靶病原体的免疫原的疫苗,其中 cGAMP 提供了佐剂。在具体实施方式中,组合物不含其它的环二核苷酸,和 / 或另外地,适合于作为佐剂或疫苗,例如无菌的,药学上可接受的,以确定的、预定的量、比率等,并且组合物可以是单个使用量化的散装或单位剂量。本发明还提供了诱导或促进免疫应答的方法,包括向有需求的哺乳动物施用有效量的此类组合物。在具体实施方式中,给药是粘膜(舌下或鼻内)、肌内或皮下给药。

[0012] 本发明包括所列具体实施方式的所有组合。进一步的实施方式和本发明的适用性的全部范围将因下文所给出的详细描述而变得显而易见。然而,应当理解的是,详细描述和具体实施例虽然表示了本发明的优选实施方式,但仅以说明的方式给出,这是因为本发明的精神和范围内的各种变化和修改因这一详细描述而对于本领域技术人员而言变得显而易见。

具体实施方式

[0013] 本发明提供了涉及 cGAS 和 cGAMP 的方法和组合物,这包括其在制剂(包括疫苗佐剂)、药物筛选、治疗方法和诊断中的用途。

[0014] 要点:2' 3' -cGAMP 是哺乳动物细胞所产生的内源性第二信使;2' 3' -cGAMP 是 STING 的高亲和配体;2' 3' -cGAMP 是 I 型干扰素的强诱导物;2' 3' -cGAMP 结合诱导了 STING 的构象变化。

[0015] 在一个方面中,本发明提供了基于细胞的药物筛选,这包括抑制 cGAS 的方法,药物筛选包括将细胞或细胞提取物与有效量的外源性 cGAS 抑制剂相接触,并检测所获得的合酶抑制。合酶通常地是人或鼠 cGAS,并且可以在融合蛋白中被截断、重组,或进行其它修改以适合分析。通常,方法是作为筛选分析进行的,其中抑制剂是用于分析的候选抑制剂,其可能来自文库、先导化合物优化等。例如通过 cGAMP 诱导的 IRF3 激活(二聚化或核转位)、干扰素产生或 NF- κ B 激活直接或推理检测抑制,通过例如质谱、基于抗体的分析(例如,ELISA、ALPHA、荧光偏振等)直接检测 cGAMP 和其它产物。例如,可以通过 q-RT-PCR 测量 IFN RNA,通过非变性凝胶电泳测量 IRF3 二聚化。另外的合适的读取包括 ATP、GTP 和焦磷酸(PPi)的测量。

[0016] 在另一个方面中,本发明提供了治疗方法,这包括抑制 cGAS 的方法,治疗方法包括将确定的有需求的细胞与有效量的外源 cGAS 抑制剂相接触。在具体的实施方式中,方法包括向确定的有需求且包含所述细胞的哺乳动物施用抑制剂,和 / 或抑制剂是小分子环化

酶抑制剂,或是 cGAS 特异性 shRNA 或 siRNA,或其它的 RNAi 或反义 RNA cGAS 特异性抑制剂。

[0017] 本发明人的数据表明,cGAS 和 cGAS-cGAMP 途径对于触发针对自身和外源 DNA 的炎症反应是重要的,因此 cGAS 抑制剂可用于降低相关自身免疫性疾病的病原性 cGAS 活性。类似地,本发明人的数据表明,cGAS 对于从正常细胞到癌细胞的转化也是重要的,并且对于癌细胞的生存和转移也是重要的,因此 cGAS 抑制剂可用于降低相关的肿瘤性 (neoplastic) 疾病的病原性 cGAS 活性。

[0018] 目前用于狼疮和其它自身免疫性疾病的治疗方法涉及大剂量的免疫抑制剂,其具有严重的副作用。虽然一种新的 BAFF 抗体 (Benlysta) 已被批准用于治疗狼疮,但其只能勉强有效。用小分子抑制剂 (尤其是口服可用的那些) 靶向 cGAS 提供了超过现有治疗方法的显著的优点。cGAS 抑制剂靶向于狼疮和其它自身免疫性疾病的根本原因,并为患者提供了治疗益处。此外,在自身免疫性病况如全身性红斑狼疮 (SLE)、Sjögren 综合征和 Aicardi-Goutières 综合征下,细胞溶质的 DNA 先天免疫途径是异常激活的,并且 cGAS 抑制为这些疾病和其它自身免疫性疾病提供了一种合理的治疗方法。

[0019] 在另一个方面中,本发明提供了体外药物筛选,这包括抑制 cGAS 的方法,药物筛选包括将包含合酶、ATP、GTP 的混合物与抑制剂在条件下相接触,其中所述条件下抑制剂抑制了经合酶的 ATP 和 GTP 到 cGAMP 和无机焦磷酸的催化转化,并检测所获得的合酶抑制。在具体的实施方式中,混合物进一步包括 DNA 且转化是 DNA- 依赖性的。在其它的实施方式中,cGAS 是组成型活性的。通常,方法是作为筛选分析进行的,其中抑制剂是用于分析的候选抑制剂,其可以来自文库、先导化合物优化等。混合物可以包含于细胞或细胞提取物中,或可以是无细胞的。

[0020] 在另一个方面中,本发明提供了体外药物结合测定,这包括抑制 cGAS 结合到底物或辅因子的方法,药物结合测定包括将包含合酶和 ATP 或 GTP 的底物或 DNA 辅因子的混合物与抑制剂在条件下相接触,其中所述条件下抑制剂抑制了合酶到底物或辅因子的结合,并检测所获得的结合抑制。通常,方法是作为筛选分析进行的,其中抑制剂是用于分析的候选抑制剂,并且可以以各种合适的方式 (包括固相免疫分析、荧光偏振分析等) 来实现。

[0021] 在另一个方面中,本发明提供了制备 cGAMP 的方法,所述方法包括在条件下形成包含 cGAS、ATP 和 GTP 的混合物,其中所述条件下合酶催化转换 ATP 和 GTP 到 cGAMP,其中合酶、ATP 和 GTP 是预定义量的,或者方法进一步包括分离或检测所获得的 cGAMP 的步骤。在具体实施方式中,混合物进一步包括 DNA 并且转化是 DNA- 依赖性的。

[0022] cGAS 活性的病原性表达,尤其是作为过表达或突变的结果,与人类自身免疫性疾病相关;因此,本发明还提供了用于检测 cGAS 水平或突变的方法和分析,尤其是作为用于人类自身免疫性疾病的诊断工具。因此,在另一个方面中,本发明提供了检测 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变的方法,所述方法包括以下步骤:检测来自人的样品中的 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变,并基于 cGAMP 水平、cGAS 水平或 cGAS 突变将所述的人分配一个自身免疫性疾病的度量;和任选地向所述的人施用用于自身免疫性疾病的治疗方法。

[0023] 在另一个方面中,本发明提供了包含预定量的 cGAMP 的组合物,如进一步包含针对靶病原体的免疫原的疫苗,其中 cGAMP 提供了佐剂。在具体实施方式中,组合物基本上或实质上不含其它的环二核苷酸。本发明还提供了诱导或促进免疫应答的方法,所述方法包

括向有需求的哺乳动物施用有效量的此类组合物。在具体实施方式中,给药是粘膜(舌下或鼻内)、肌内或皮下给药。

[0024] 作为 I 型干扰素的强诱导物,cGAMP 提供了合理的免疫佐剂。cGAMP 可以用作疫苗佐剂,尤其是粘膜疫苗,并且可以与免疫原配制并形成环-二-GMP 和 c-二-AMP 作为疫苗佐剂进行递送;参见,例如 Pedersen 等人,PLoS ONE,Nov 2011,6,11,e26973;Ebensen 等人,Vaccine 29,2011,5210-5220;Chen 等人,Vaccine 28,2010,3080-3085。实际上,cGAMP 佐剂往往更有效,这是因为 cGAMP 比 c-二-GMP 在诱导干扰素方面更有效。

[0025] 应当理解的是,本文所描述的实施例和实施方式仅用于说明的目的,并且考虑到其各种修改或改变都对本领域技术人员有暗示作用,它们均包括于本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。所有本文引用的出版物、专利和专利申请(包括其中引用的)通过引用以其整体出于所有目的并入本文。

[0026] 实施例

[0027] 实施例 1. 环-GMP-AMP 在胞质 DNA 的天然免疫信号中是内源性第二信使

[0028] 对抗外源遗传因素的宿主防御是活有机体的最基本的功能之一。真核细胞感知细胞质中存在自身或外源 DNA,作为异物侵入的危险信号或标志(1)。DNA 可以经细菌或病毒感染、转染或在导致自身免疫性疾病如狼疮的某些病理条件下从核或线粒体中“泄漏”而被引入到细胞质内。在哺乳动物细胞中,胞质 DNA 触发 I 型干扰素(IFN)和通过内质网蛋白 STING(也称为 MITA、MPYS 或 ERIS)的其它细胞因子的产生(2)。STING 招募并激活胞质激酶 IKK 和 TBK1,其分别激活转录因子 NF- κ B 和 IRF3。然后 NF- κ B 和 IRF3 进入细胞核并一起发挥作用以诱导 IFN 和其它细胞因子。DNA 依赖性 RNA 聚合酶 III 已被证明是一种传感器,其检测和转录富含 AT 的 DNA 如聚[dA:dT] 到能够刺激 RIG-I 途径的 RNA 配体以诱导 IFN(3,4)。然而,大多数 DNA 序列不激活 RNA 聚合酶 III-RIG-I 途径。相反的,胞质 DNA 以序列独立性方式激活 STING-依赖性途径。胞质 DNA 如何激活 STING 途径仍然难以理解。

[0029] 本发明人假设 DNA 结合并激活假定的胞质 DNA 传感器,其然后直接或间接地激活 STING,导致 IRF3 和 NF- κ B 的激活。为了测试这一模型,本发明人使用鼠纤维肉瘤细胞系 L929(已知其以 STING 依赖性方式诱导干扰素- β (IFN β)(5))开发了体外互补分析。本发明人使用稳定表达抗 STING 的短发夹(sh)RNA 的 L929 细胞系,使得 DNA 转染仅激活 STING 的上游因子(包括假定的 DNA 传感器)。用不同类型的 DNA 转染 L929-shSTING 细胞,然后将这些细胞的细胞质提取物与人单核细胞系 THP1 或鼠巨噬细胞系 Raw264.7 相混合,将其用产气荚膜梭菌素 O(perfringolysin O)(PFO)透化。PFO 处理在质膜上打孔(6),允许细胞质扩散进出细胞,同时在细胞内保留了包括内质网(其包含 STING)和高尔基体的细胞器(7)。如果在 DNA 转染的细胞中产生了 STING 的上游激活物,则预期包含这种激活子的细胞质在 PFO-透化的细胞中激活 STING,导致 IRF3 的磷酸化和二聚化。

[0030] 转染有已知为干扰素刺激性 DNA(ISD)、聚[dA:dT]、富含 GC 的 50 个碱基对的 dsDNA(G:C50)、聚[dI:dC] 或鲱鱼睾丸 DNA(HT-DNA) 的 DNA 序列的 L929-shSTING 细胞的细胞质提取物在透化的 THP1 细胞中激活 IRF3,这表明此活性独立于 DNA 序列。

[0031] 为了确定 STING 激活物是否是一种蛋白质,本发明人在 95°C 孵育细胞质提取物以变性大多数蛋白质,然后将“热的上清液”与透化的 THP1 细胞孵育。意外的是,来自于 ISD 或 HT DNA 转染的细胞的热的上清液引起了 IRF3 的二聚化。此活性抵抗 Benzonase(其降

解 DNA 和 RNA) 或蛋白酶 K 的处理。因此, STING 激活物可能不是蛋白质、DNA 或 RNA。

[0032] 为了测试 DNA 是否可以在体外刺激耐热的 STING 激活物的产生, 本发明人将 HT DNA 与 L929-shSTING 细胞质提取物 (S100) 在存在 ATP 的情况下孵育。将反应混合物加热至 95°C 使蛋白质变性。引人注目的是, 上清液与透化的 Raw264.7 细胞的孵育导致了 IRF3 的二聚化。这一活性依赖于添加 DNA 到细胞质提取物中。其它的 DNA (包括聚 [dA:dT]、聚 [dG:dC] 和 ISD) 也在 L929-shSTING 细胞质提取物中刺激了 STING 的产生, 而聚 [I:C] 和单链 RNA 没有活性。用透化的 THP1 细胞获得了类似的结果。在透化的 THP1 细胞中敲降 STING 去除了经转染到 L929 细胞的 DNA 或添加到 L929 细胞质提取物的 DNA 所产生的耐热因子的 IRF3 的激活。对照实验表明, STING 的敲降抑制了 IRF3 的激活以及在 HT-DNA 转染的 THP1 细胞中的 IFN β 和 TNF α 的诱导, 但经聚 [I:C] 转染或仙台病毒感染 (已知其激活 RIG-I 途径) 的 IRF3 的激活不受 STING 敲降的影响。本发明人还测试了数种细胞系的细胞质提取物产生耐热 STING 激活物的能力。将 HT-DNA 与来自原代 MEF 细胞、小鼠骨髓衍生的巨噬细胞 (BMDM) 和 L929 细胞的提取物孵育, 导致产生了激活 IRF3 的耐热因子。来自 THP1 而不是 HEK293T 细胞的人类细胞提取物也能够产生这种 STING 激活物。这些结果与本发明人先前所发现的原代 MEF、BMDM、L929 和 THP1 细胞 (而不是 HEK293T 细胞) 具有 STING 依赖性、RNA 聚合酶 III 非依赖性通路以诱导 I 型干扰素 (3) 相一致。

[0033] 之后, 本发明人使用多个层析步骤 (包括 STING- 标签亲和纯化步骤) 从 L929 细胞提取物中纯化耐热的 STING 激活物。先前的研究已经表明, 细菌分子环-二-AMP 和环-二-GMP 结合到 STING 并诱导 I 型干扰素 (8,9)。然而, 使用微型 (nano) 液相色谱质谱 (微型-LC-MS), 本发明人没有检测到与所预期的 c-二-GMP ($[M+H]^+ = 691$) 或 c-二-AMP ($[M+H]^+ = 659$) 相一致的 MS 或 MS/MS 谱。有趣的是, MS 谱的深入研究揭示了具有 675.1 ($z = 1^+$) 和 338.1 ($z = 2^+$) 的质荷比 (m/z) 的两个离子, 其存在于活性部分但不存在于背景谱中。这些 m/z 值 (尽管质谱仪 (LTQ) 的低质量精度) 相当于 c-二-GMP 和 c-二-AMP 的计算的平均 m/z 值 ($675 = [691+659]/2$)。这一观察表明, 所检测的离子是 c-二-GMP 和 c-二-AMP 的杂合体, 即环-GMP-AMP ($m/z = 675.107, z = 1^+; m/z = 338.057, z = 2^+$)。这种离子的碰撞诱导解离 (CID) 碎片 ($m/z = 338.1, z = 2^+$) 揭示了数个占优势的具有所预期的产物离子 c-GMP-AMP (cGAMP) 的 m/z 值的离子。重要的是, 使用选择性反应监测 (SRM) 的定量质谱表明, 来自 C18 柱的级分中代表 cGAMP 的离子丰度与其 IRF3 刺激活性很好地相关联。最近已在细菌弧菌 (*Vibrio cholera*) 中鉴定了 cGAMP 并显示出在细菌趋化性和定植中发挥作用 (10)。然而, 尚未报道 cGAMP 在真核细胞中存在或具有功能。

[0034] 为了验证耐热 STING 激活物的身份, 本发明人使用了高分辨率高精度质谱仪 (Q Exactive, Thermo) 来进行微型-LC-MS 分析。细胞衍生的 STING 激活物具有 675.107 ($z = 1^+$) 和 338.057 ($z = 2^+$) 的 m/z , 其精确匹配 cGAMP 的理论值。为了进一步表征 cGAMP 的结构和功能, 本发明人开发了十步的单烧瓶方案以化学合成 cGAMP。细胞衍生的 STING 激活物的 MS/MS 谱与化学合成的 cGAMP 的谱相同。这些结果证实 L929 细胞产生 cGAMP。

[0035] 定量 RT-PCR 和 ELISA 分析表明, 化学合成的 cGAMP 在引入到细胞后在 L929 细胞中诱导 IFN β RNA 和蛋白质。滴定实验表明, 即使浓度低至 10nM, cGAMP 也强烈地诱导 IFN β RNA。实际上, 基于 ELISA 分析, cGAMP 在诱导 IFN β 方面比 c-二-GMP 更强。cGAMP 还在激活 IRF3 方面比 c-二-GMP 和 c-二-AMP 更强。为了确定 L929 提取物是否包含可以

合成其它类型的能激活 IRF3 的二-核苷酸或寡核苷酸的酶,本发明人以不同组合测试了所有四种核糖核苷酸。ATP 和 GTP 都是支持 IRF3 的激活物的合成所必要且充分的,这进一步支持了 L929 包含从 ATP 和 GTP 合成 cGAMP 的酶。

[0036] 为了确定 DNA 病毒感染是否导致细胞中 cGAMP 的产生,本发明人用缺少 ICP 34.5 (已知在受感染的细胞中拮抗干扰素产生的病毒蛋白 (11)) 的 HSV-1 感染 L929 细胞。如 DNA 转染一样,HSV-1 Δ ICP34.5 感染导致 L929 细胞中 IRF3 的激活。来自转染 DNA 或感染病毒的细胞的细胞提取物包含可以在透化的 Raw264.7 细胞中激活 IRF3 的耐热因子。作为对照,本发明人用水泡性口炎病毒株 VSV- Δ M51-GFP (已知通过 RIG-I 通路引发强干扰素产生的 RNA 病毒 (12,13)) 感染 L929 细胞。与 HSV-1 相比,VSV 感染的细胞在相同的体外分析中不包含耐热 IRF3 激活物,尽管 VSV 感染确实在 L929 细胞中诱导 IRF3 的激活。通过反相 HPLC 富集并使用 SRM 通过微型-LC-MS 定量 HSV-1 感染细胞中的耐热因子。DNA 转染的或 HSV-1 感染的细胞 (而不是模拟处理的或 VSV 感染的细胞) 产生了升高水平的 cGAMP。动力学实验表明,DNA 转染到 L929 细胞后,在 IRF3 二聚化之前产生 cGAMP 且可以检测到 IFN β 诱导。为了测试 DNA 病毒是否可以在人细胞中诱导 cGAMP 产生,本发明人用 HSV1 或牛痘病毒 (VACV) 感染 THP1 细胞。两种病毒都在细胞中诱导了 IRF3 的二聚化。重要的是,这两种病毒也都引发了激活 IRF3 的 cGAMP 的产生。总之,这些结果表明,在人和小鼠细胞中的 DNA 转染和 DNA 病毒感染产生了 cGAMP,其导致 IRF3 激活。

[0037] 为了确定 cGAMP 是否通过 STING 激活 IRF3,本发明人进行了三组实验。首先,本发明人建立了稳定表达 STING 的 HEK293T 细胞系,用 cGAMP 刺激这些细胞,然后通过定量 RT-PCR 测量 IFN β 的诱导。HEK293T 细胞不响应 cGAMP,这可能是由于在这些细胞中缺乏 STING 表达或 STING 表达水平非常低。HEK293T 细胞中 STING 的表达使得产生经 cGAMP 的高水平的 IFN β 的诱导。然而,DNA 未刺激 HEK293T/STING 细胞以诱导 IFN β ,这与 HEK293T 细胞缺少产生对 DNA 刺激的响应的 cGAMP 相一致。相比之下,L929 细胞诱导响应经 cGAMP 或 DNA 的刺激 IFN β 。HSV-1 感染在 L929 中诱导 IRF3 二聚化,而 HEK293T 或 HEK29T/STING 细胞则没有,这表明 cGAMP 的产生对 HSV-1 在细胞中激活 IRF3 是重要的。实际上,来自 HSV-1 感染的 L929 (而不是来自 HEK293T 或 HEK293T/STING 细胞) 的提取物包含导致在透化的 Raw264.7 细胞中的 IRF3 二聚化的 cGAMP 活性。这些结果表明,在 HEK293T 细胞中 STING 的表达赋予细胞响应 cGAMP 以激活 IRF3 并诱导 IFN β 的能力,但不足以建立对 DNA 或 DNA 病毒响应,这是由于 HEK293T 细胞在合成 cGAMP 方面存在缺陷。

[0038] 其次,本发明人测试了 L929 和 L929-shSTING 细胞对 cGAMP 的响应。与 ISD 和 c-二-GMP 类似,cGAMP 诱导的 IRF3 二聚化依赖于 STING。相比之下,聚 [I :C] 在不存在 STING 的情况下仍诱导 IRF3 的二聚化。这些结果证明,对于 cGAMP 激活 IRF3 而言,STING 是必要的。

[0039] 最后,本发明人检查了 STING 是否直接结合 cGAMP。从大肠杆菌中表达并纯化包含残基 139-379 的重组 STING 蛋白 (已证明其结合 c-二-GMP (14)),然后用 32 P-cGAMP 孵育,随后进行 UV 诱导的交联。当 STING 和 32 P-cGAMP 都存在时,检测到对应于交联的 STING-cGAMP 复合体的放射性同位素示踪带。高浓度的 ATP 或 GTP 未竞争 STING-cGAMP 复合体的形成。相比之下,此条带的强度随竞争的冷 cGAMP、c-二-GMP 或 c-二-AMP 浓度的增加而下降,这表明 STING 上的 cGAMP 结合位点与和 c-二-GMP 以及 c-二-AMP 相互作用的结合位点相

重叠。实际上,最近表明参与 STING 到 c-二-GMP 的结合 (14) 中的数个残基的突变 (包括 S161Y、Y240S 和 N242A) 也削弱了 STING 到 cGAMP 的结合。总之,这些结果证明,cGAMP 是结合并激活 STING 的配体。

[0040] 已经显示环二核苷酸的功能为调节多种生理过程 (包括细菌运动性和生物膜形成) 的细菌第二信使 (15)。最近的报告显示,C-二-GMP 在原生动物网柄菌 (*Dictyostelium*) 中产生,其功能是作为形态发生素以诱导柄细胞的分化 (16)。在此实例中,本发明人鉴定了 cGAMP 是后生动物中的第一环二核苷酸。此外,本发明人示出了 cGAMP 是 I 型干扰素的诱导物。cGAMP 的作用类似于 cAMP (其是研究最多的第二信使 (17)) 的作用。如 cAMP 一样 (当腺苷酸环化酶被上游配体激活时,由腺苷酸环化酶合成),cGAMP 由响应 DNA 配体刺激的环化酶合成 (18)。cAMP 结合并激活蛋白激酶 A 和其它效应物分子。类似地,cGAMP 结合并激活 STING 以引发下游信号级联。作为哺乳动物细胞中的内源性分子,cGAMP 可用于免疫治疗方法或作为疫苗佐剂。

[0041] 参考文献和注释

[0042] 1. R. Barbalat, S. E. Ewald, M. L. Mouchess, G. M. Barton, *Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. Annu Rev Immunol*, (Apr 5).

[0043] 2. G. N. Barber, *Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunological reviews* 243, 99 (Sep, 2011).

[0044] 3. Y. H. Chiu, J. B. Macmillan, Z. J. Chen, RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576 (Aug 7, 2009).

[0045] 4. A. Ablasser et al., RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*, (Jul 16, 2009).

[0046] 5. Y. Tanaka, Z. J. Chen, STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Sci Signal* 5, ra20 (2012).

[0047] 6. J. Rossjohn et al., Structures of perfringolysin O suggest a pathway for activation of cholesterol-dependent cytolysins. *Journal of molecular biology* 367, 1227 (Apr 13, 2007).

[0048] 7. T. Saitoh et al., Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20842 (Dec 8, 2009).

[0049] 8. J. J. Woodward, A. T. Iavarone, D. A. Portnoy, c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 328, 1703 (Jun 25, 2010).

[0050] 9. D. L. Burdette et al., STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515 (Oct 27, 2011).

[0051] 10. B. W. Davies, R. W. Bogard, T. S. Young, J. J. Mekalanos, Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* 149, 358 (Apr 13, 2012).

[0052] 11. K. L. Mossman, J. R. Smiley, Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *Journal of virology* 76, 1995 (Feb, 2002).

[0053] 12. D. F. Stojdl et al., VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263 (Oct, 2003).

[0054] 13. Q. Sun et al., The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24, 633 (May, 2006).

[0055] 14. Q. Yin et al., Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Molecular cell* 46, 735 (Jun 29, 2012).

[0056] 15. C. Pesavento, R. Hengge, Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* 12, 170 (Apr, 2009).

[0057] 16. Z. H. Chen, P. Schaap, The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* 488, 680 (Aug 30, 2012).

[0058] 17. S. A. Blumenthal, Earl Sutherland (1915–1975) and the discovery of cyclic AMP. *Perspect Biol Med* 55, 236 (2012).

[0059] 18. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. J. Chen, Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type-I interferon pathway. *Science*, (2012).

[0060] 实施例 2. 环 GMP-AMP 合酶是激活 I 型干扰素途径的细胞质 DNA 传感器

[0061] 在 DNA 被证明是遗传物质很久之前, 已知 DNA 刺激免疫应答, 但 DNA 作为免疫刺激物的功能的机制仍知之甚少 (1)。虽然在树突细胞中 DNA 可通过结合内涵体中的 Toll-样受体 9 (TLR9) 来刺激 I 型干扰素的产生, 但在细胞质中 DNA 如何诱导 IFN 仍不清楚。具体而言, 在干扰素途径中检测细胞质 DNA 的传感器仍然难以捉摸 (2)。虽然数种蛋白质 (包括 DAI、RNA 聚合酶 III、IFI16、DDX41 和若干其它的 DNA 解链酶) 已暗示具有作为潜在的诱导 IFN 的 DNA 传感器的功能, 但还均未得到普遍认可 (3)。

[0062] 环 GMP-AMP 合酶 (cGAS) 的纯化和鉴定。本发明人示出, 递送 DNA 到哺乳动物细胞或细胞质提取物引发了环 GMP-AMP (cGAMP) 的产生, 其结合并激活 STING, 导致 IRF3 的激活和 IFN β 的诱导 (4)。为了鉴定 cGAMP 合酶 (cGAS), 本发明人从鼠纤维肉瘤细胞系 L929 中分离出包含 cGAMP 合成活性的细胞质提取物 (S100)。在存在鲱鱼精巢 DNA (HT-DNA) 的情况下, 通过将柱级分与 ATP 和 GTP 孵育来分析这一活性。用 Benzonase 消化 DNA 并 95°C 加热以变性蛋白之后, 将包含 cGAMP 的耐热上清液与产气荚膜梭菌素 O (PFO)-透化的 Raw264.7 细胞 (转化的巨噬细胞) 孵育。通过非变性凝胶电泳分析这些细胞中 cGAMP 诱导的 IRF3 二聚化 (4)。通过使用这种分析, 本发明人进行了三个独立路线的纯化, 各个路线由四个步骤的色谱组成, 但差别在于所使用的柱或柱的顺序。具体而言, 第三路线包括使用生物素化的 DNA 寡聚物 (已知作为免疫刺激 DNA 或 ISD 的 45-bp DNA) 的亲和纯化步骤。本发明人估计本发明人获得一系列 8000–15000 倍的纯化和来自于这些分离路线的活性的 2–5% 的回收率。然而, 在各个纯化路线的最后步骤中, 级分的银染并未揭示与 cGAS 活性共纯化的清晰的蛋白条带, 这表明假定的 cGAS 蛋白的丰度可能在 L929 细胞质提取物中是非常低

的。

[0063] 本发明人开发了一种定量质谱策略以鉴定各个纯化路线的最后步骤中与 cGAS 活性共纯化的一系列蛋白。本发明人有理由认为,在所有三个纯化路线中假定的 cGAS 蛋白必须与其活性共纯化,而大多数“污染”蛋白则不会。因此,从各个纯化路线的最后步骤中,本发明人选择了包含大部分 cGAS 活性的级分(峰级分)和包含非常弱或没活性的相邻的级分。通过 SDS-PAGE 分离各个级分中的蛋白质并用微型液相色谱质谱(微型 LC-MS)进行鉴定。通过使用 MaxQuant 软件的无标记定量来分析数据(5)。值得注意的是,虽然在一个或两个纯化路线中,许多蛋白质与 cGAS 活性共纯化,但在所有三个路线中仅有三种蛋白质共纯化。这三个都是假定的未鉴定蛋白:E330016A19(登记号#:NP_775562)、具有包含双 PH 结构域的蛋白 2 的 Arf-GAP(NP_742145)和信号识别颗粒 9kDa 蛋白(NP_036188)。在这些之中,在 E330016A19 中鉴定了超过 24 个独特的多肽,代表了在此 507 个氨基酸的蛋白中 41% 的覆盖率。

[0064] 生物信息学分析驱使本发明人关注 E330016A19,其表现出对于寡腺苷酸合酶(OAS1)的催化结构域的结构和序列同源性。具体而言,E330016A19 包含保守的 $[G[G/S]x_{9-13}[E/D]h[E/D]h]$ 基序,其中 x_{9-13} 表示由任意氨基酸组成的 9-13 个侧翼残基,h 表示疏水氨基酸。这一基序被发现于核苷酸转移酶(NTase)家族(6)。除 OAS1 之外,这一家族包括腺苷酸环化酶、聚[A]聚合酶和 DNA 聚合酶。E330016A19 的 C 末端包含雄性异常 21(Mab21)结构域(其首次在线虫(*C. elegans*)蛋白 Mab21 中被鉴定(7))。序列比对揭示了 C-末端的 NTase 和 Mab21 结构域从斑马鱼到人类都是高度保守的,而 N 末端序列的保守性小得多(8)。有趣的是,E330016A19 的人同源物 C6orf150(也被称为 MB21D1)最近被鉴定为在筛选其过表达抑制病毒复制的干扰素刺激的基因(ISG)的数个阳性命中之一(9)。为了澄清并基于本文所提出的证据,本发明人提出将小鼠蛋白 E330016A19 命名为 m-cGAS,并且将人同源物 C6orf150 命名为 h-cGAS。定量 RT-PCR 示出 m-cGAS 的表达在永生 MEF 细胞中是低的,但在 L929、Raw264.7 和骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)中是高的。类似地,h-cGAS RNA 的表达在 HEK293T 细胞中是非常低的,但在人单核细胞系 THP1 中是高的。免疫印迹进一步证实,h-cGAS 蛋白在 THP1 中表达但不在 HEK293T 细胞中表达。因此,不同细胞系中的 m-cGAS 和 h-cGAS 的表达水平与这些细胞响应细胞质 DNA 产生 cGAMP 和诱导 IFN β 的能力相关(4, 10)。

[0065] cGAS 催化触发 I 型干扰素的产生。在 HEK293T(其缺少 STING 表达)中的 m-cGAS 的过表达不诱导 IFN β ,而在 HEK293T 细胞中 STING 的稳定表达使得这些细胞高度有能力经 m-cGAS 诱导 IFN β 。重要的是,假定的催化残基 G198 和 S199 点突变至丙氨酸去除了 m-cGAS 诱导 IFN β 的能力。这些突变以及其它的假定的催化残基 E211 和 D213 突变至丙氨酸,也去除了 HEK293T-STING 细胞中的 m-cGAS 诱导 IRF3 二聚化的能力。由 c-GAS 诱导的 IFN β 的幅度与由 MAVS(衔接蛋白,其在 RNA 传感器 RIG-I 的下游起作用)诱导的相当,且比其它假定的 DNA 传感器(包括 DAI、IFI16 和 DDX41)诱导的高数个数量级。为了确定 cGAS 和其它假定的 DNA 传感器的过表达是否导致细胞中 cGAMP 的产生,将来自经热处理的细胞提取物的上清液与 PF0-透化的 Raw264.7 细胞进行孵育,然后测量 IRF3 的二聚化。在 HEK293T-STING 细胞中表达的所有蛋白质中,仅有 cGAS 能在细胞中产生 cGAMP 活性。

[0066] 为了测试 cGAS 是否能在体外合成 cGAMP,本发明人纯化了野生型(WT)和来自转

染的 HEK293T 细胞的突变体 Flag-cGAS 蛋白。WT m-cGAS 和 h-cGAS (而不是 cGAS 的无催化活性的突变体) 能产生 cGAMP 活性, 其在透化的 Raw264.7 细胞中刺激 IRF3 二聚化。重要的是, m-cGAS 和 h-cGAS 的体外活性都依赖于 HT-DNA 的存在。为了测试 DNA 是否在细胞中增强经 cGAS 的 IFN β 诱导, 将带有或不带有 HT-DNA 的不同数量的 cGAS 表达质粒转染进 HEK293T-STING 细胞。经低剂量 (10 和 50ng) 的 cGAS 质粒, HT-DNA 显著地增强了 IFN β 的诱导, 而高剂量 (200ng) 则没有。相比于 cGAS, IFI16 和 DDX41 即使与 HT-DNA 共转染, 也不诱导 IFN β 。

[0067] IFN β 经 DNA 转染和 DNA 病毒感染的诱导需要 cGAS。本发明人使用了两对不同的 siRNA 以在 L929 细胞中敲降 m-cGAS, 并且发现两种 siRNA 寡核苷酸均显著地抑制了经 HT-DNA 的 IFN β 诱导, 且抑制的程度与敲降 m-cGAS RNA 的效率相关。本发明人还建立了两个稳定表达靶向于 m-cGAS 的不同区域的 shRNA 序列的 L929 细胞系。相比于表达对照 shRNA (GFP) 的另一种细胞系, 这些细胞响应 HT-DNA 以诱导 IFN β 能力严重受损。重要的是, 在 L929-sh-cGAS 细胞中 cGAS 的表达恢复了 IFN β 的诱导。在 L929-sh-cGAS 细胞中 STING 或 MAVS 的表达或递送 cGAMP 至这些细胞也诱导 IFN β 。相比之下, 在 L929-shSTING 细胞中 cGAS 的表达或 cGAMP 的递送不能诱导 IFN β , 而在这些细胞中 STING 或 MAVS 的表达恢复了 IFN β 的诱导。定量 RT-PCR 分析证实了在稳定表达相应 shRNA 的 L929 细胞系中敲降 cGAS 和 STING 的特异性和效率。这些结果表明, cGAS 在 STING 的上游起作用且是 IFN β 经细胞质 DNA 的诱导所需要的。

[0068] 单纯性疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 是已知的通过 STING 和 IRF3 的激活诱导 IFN 的 DNA 病毒。重要的是, 抗 m-cGAS (而不是 GFP) 的 shRNA 在 L929 细胞中强烈抑制由 HSV-1 感染诱导的 IRF3 二聚化。相比之下, cGAS 的敲降不影响 IRF3 经仙台病毒 (一种 RNA 病毒) 的激活。为了确定在细胞中 cGAMP 的产生是否需要 cGAS, 本发明人将 HT-DNA 转染进 L929-shGFP 和 L929-sh-cGAS 或用 HSV-1 感染这些细胞, 然后制备包含 cGAMP 的耐热级分, 其随后递送到透化的 Raw264.7 细胞中以测量 IRF3 的激活。cGAS 的敲降在很大程度上去除了由 DNA 转染或 HSV-1 感染所产生的 cGAMP 活性。使用选择性反应监测 (SRM) 的定量质谱表明, 由 DNA 转染或 HSV-1 感染诱导的 cGAMP 的丰度在缺少 cGAS 的 L929 细胞中显著地降低。总之, 这些结果证实, cGAS 对于产生 cGAMP 并响应 DNA 转染或 HSV-1 感染激活 IRF3 而言是必要的。

[0069] 为了确定在人类细胞中的 DNA 传感通路中 cGAS 是否是重要的, 本发明人建立了稳定表达靶向于 h-cGAS 的 shRNA 的 THP1 细胞系。h-cGAS 的敲降强烈抑制了经 HT-DNA 转染的或经牛痘病毒 (另一种 DNA 病毒, 而不是仙台病毒) 感染的 IFN β 诱导。h-cGAS 的敲降也在 THP1 细胞中抑制了由 HSV-1 感染诱导的 IRF3 二聚化。这一结果进一步在另一个表达靶向于 h-cGAS 的不同区域的 shRNA 的 THP1 细胞系中得到证实。多个 cGAS 的 shRNA 序列在小鼠和人细胞系中抑制 DNA 诱导的 IRF3 激活和 IFN β 诱导的强且特异性的作用证明了 cGAS 在 STING 依赖的 DNA 传感通路中的关键作用。

[0070] 重组 cGAS 蛋白以 DNA 依赖的方式从 ATP 和 GTP 催化合成 cGAMP。为了测试 cGAS 是否足以催化 cGAMP 的合成, 本发明人在 HEK293T 细胞中表达了 Flag 标记的 h-cGAS 并将其纯化至表观同质性。在 HT-DNA 存在的情况下, 纯化的 c-GAS 蛋白催化产生 cGAMP 活性, 其在透化的 Raw264.7 细胞中刺激 IRF3 二聚化。DNase-I 处理去除了此活性。通过其它的 DNA (包括聚 (dA:dT)、聚 (dG:dC) 和 ISD, 而没有 RNA 聚 (I:C)) 也能刺激 cGAS 活性。经

cGAS 的 cGAMP 合成需要 ATP 和 GTP,但不需要 CTP 或 UTP。这些结果表明,纯化的 cGAS 蛋白质的环化酶活性被 DNA 刺激,而不是 RNA。

[0071] 本发明人还在大肠杆菌中表达 m-cGAS 作为 SUMO 融合蛋白。纯化后, sumo-m-cGAS 以 DNA 依赖的方式产生 cGAMP 活性。然而,经 Sumo 蛋白酶去除 SUMO 标记之后, m-cGAS 蛋白以非 DNA 依赖的方式催化 cGAMP 的合成。这一缺少 DNA 依赖性的原因尚不清楚,但可能是由于在 sumo 去除后的一些构象变化。滴定实验示出,小于 1nM 的重组 cGAS 蛋白导致了可检测的 IRF3 的二聚化,而 cGAS 的无催化活性的突变体即使在高浓度也不能激活 IRF3。为了正式地证明了 cGAS 催化 cGAMP 的合成,用 SRM 通过微型 -LC-MS 分析反应产物。在包含纯化的 cGAS、ATP 和 GTP 的 60 分钟反应中检测到了 cGAMP。cGAMP 的身份进一步通过使用碰撞诱导解离 (CID) 的离子碎裂来确认。由纯化的 cGAS 合成的 cGAMP 的片段化方式揭示了 m/z 值与那些化学合成的 cGAMP 相匹配的产物离子。总之,这些结果证实,纯化的 cGAS 催化从 ATP 和 GTP 的 cGAMP 的合成。

[0072] cGAS 结合 DNA。经 DNA 的 cGAS 活性的刺激表明 c-GAS 是 DNA 传感器。实际上, GST-m-cGAS 和 GST-h-cGAS (而不是 GST-RIG-I 的 N 末端 [RIG-I (N)] 都被生物素化的 ISD 所沉淀。相比之下,生物素化的 RNA 不结合 cGAS。缺失分析显示包含残基 1-212 的 h-cGAS 的 N-末端片段 (而不是 C-末端片段 213-522) 结合 ISD。包含残基 161-522 的较长的 C 端片段结合 ISD,这表明序列 161-212 可能对于 DNA 的结合是重要的。然而,来自 h-cGAS 的残基 161-212 的缺失并未显著地损害 ISD 的结合,这表明 cGAS 在 N-末端包含另一个 DNA 结合结构域。实际上,包含残基 1-160 的 N 末端片段也结合 ISD。因此, cGAS 可以在 N-末端包含两个单独的 DNA 结合结构域。然而,清楚地,包含残基 1-212 的 h-cGAS 的 N-末端是结合 DNA 所必要且充分的。

[0073] 在 HEK293T-STING 细胞中过表达 h-cGAS 的不同的缺失突变体以确定其激活 IRF3 和诱导 IFN β 和细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的能力。蛋白片段 1-382 (其缺乏包括 Mab21 结构域的大部分残基的 C-末端的 140 个残基) 不能诱导 IFN β 或 TNF α 或激活 IRF3, 这表明完整的 Mab21 结构域对于 cGAS 功能是重要的。如所预期的, N-末端 212 残基 (片段 213-522) (其包括 NTase 结构域的一部分) 的缺失去除了 cGAS 活性。催化残基之前的 NTase 折叠的第一螺旋内的仅仅 4 个氨基酸 (KLKL, Δ 171-174) 的内部缺失也摧毁了 cGAS 的活性。有趣的是, N-末端 160 个残基的缺失并不影响 IRF3 的激活或经 cGAS 的细胞因子诱导。体外分析表明,此蛋白片段 (161-522) 仍以 DNA 依赖的方式激活 IRF3 通路。因此, h-cGAS 的 N-末端 160 个氨基酸 (其一级序列在进化上并非高度保守) 似乎对于 DNA 的结合和经 cGAS 的催化是高度可有可无的。相比之下, NTase 和 Mab21 结构域对于 cGAS 活性是重要的。

[0074] cGAS 主要定位于细胞质中。为了确定 cGAS 是否是细胞质 DNA 传感器,本发明人从 THP1 细胞制备了细胞质和细胞核的提取物并通过免疫印迹分析了内源性 h-cGAS 的定位。在细胞质提取物中检测到了 h-cGAS,而在细胞核提取物中几乎未检测到。将 THP1 提取物进一步进行差速离心以将各个亚细胞器相互分离并从细胞质中分离。在 S100 和 P100 (在 100,000 $\times$ g 离心后的沉淀) 中检测到相似量的 h-cGAS,这表明此蛋白在细胞质中是可溶的,但该蛋白的显著级分与轻 (light) 囊泡或细胞器相关。在 P5 (其包含线粒体和 ER, 分别由存在 VDAC 和 STING 证明) 中未检测到 cGAS 蛋白。也未在 P20 (其主要包含 ER 和重囊

泡)中检测到 cGAS。

[0075] 本发明人还使用稳定表达 Flag-m-cGAS 的 L929 细胞通过共聚焦免疫荧光显微镜检查了 cGAS 的定位。cGAS 蛋白分布于整个细胞质中,但也可以在细胞核内或细胞核周围区域观察到。有趣的是,在细胞用 Cy3 标记的 ISD 转染 2 或 4 小时后,观察到 cGAS 的点状形式且其与 DNA 荧光相重叠。在多于 50% 的所观察的细胞中都观察到了此类 cGAS 和 Cy3-ISD 的共定位和表观聚集。这些结果以及 cGAS 与 DNA 直接结合的生化证据表明了 cGAS 在细胞质中结合 DNA。

[0076] 讨论。在此实例中,本发明人开发了一种策略,其结合定量质谱与常规的蛋白纯化以鉴定从粗细胞提取物中部分纯化的生物活性蛋白。这一策略普遍适用于因丰度非常低、活性不稳定或起始物质稀少而难以被纯化至均质的蛋白质。作为原则的证明,本发明人使用这一策略来鉴定小鼠蛋白 E330016A19 作为合成 cGAMP 的酶。这一发现导致鉴定出 cGAS 的一个大家族,其从鱼类至人类中都是保守的,这正式地证明了脊椎动物包含进化保守的合成环二核苷酸的酶,而其之前仅发现于细菌、古细菌和原生动物中 (11-13)。霍乱弧菌能通过其环化酶 DncV (VC0179) 合成 cGAMP,其包含 NTase 结构域,但与哺乳动物 cGAS 缺少显著的一级序列同源性 (12)。

[0077] 本发明人的结果不仅证明了 cGAS 是触发 I 型干扰素通路的细胞质 DNA 传感器,同时也揭示了一种免疫信号的新机制,其中 cGAS 产生第二信使 cGAMP,其结合并激活 STING (4),从而引发 I 型干扰素的产生。发现 cGAS 是细胞质 DNA 传感器极大地扩展了宿主免疫系统所检测到的微生物库。原则上,所有能携带 DNA 进入宿主细胞质中的微生物,如 DNA 病毒、细菌、寄生虫 (例如疟疾) 和逆转录病毒 (例如 HIV) 都可以触发 cGAS-STING 通路 (14,15)。经 cGAS 的 cGAMP 的酶促合成为稳健且灵敏的免疫应答提供了一种信号放大的机制。然而,经 cGAS 的宿主细胞质中的自身 DNA 的检测也可导致自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、**Sjögren** 综合征和 Aicardi-Goutières 综合征 (16-18)。

[0078] 已报道了数个其它的 DNA 传感器如 DAI、IFI16 和 DDX41 诱导 I 型干扰素 (19-21)。DAI、IFI16 或 DDX41 的过表达并未导致 cGAMP 的产生。本发明人还发现,经 siRNA 敲降 DDX41 和 p204 (IFI16 的小鼠同源物) 在 HT-DNA 转染的 L929 细胞中并不抑制 cGAMP 活性的产生。与其它假定的 DNA 传感器和大多数模式识别受体 (例如 TLR) 不同, cGAS 是能接受经小分子化合物抑制的环化酶,其用于治疗人类自身免疫性疾病提供了治疗剂。

[0079] 参考文献和注释

[0080] 1. L. A. O' Neill, DNA makes RNA makes innate immunity. Cell 138, 428 (Aug 7, 2009).

[0081] 2. G. N. Barber, Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunological reviews 243, 99 (Sep, 2011).

[0082] 3. S. E. Keating, M. Baran, A. G. Bowie, Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. Trends in immunology 32, 574 (Dec, 2011).

[0083] 4. J. Wu et al., Cyclic-GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science, (2012).

[0084] 5. J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein

quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367 (Dec, 2008).

[0085] 6. K. Kuchta, L. Knizewski, L. S. Wyrwicz, L. Rychlewski, K. Ginalski, Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res* 37, 7701 (Dec, 2009).

[0086] 7. K. L. Chow, D. H. Hall, S. W. Emmons, The mab-21 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates. *Development* 121, 3615 (Nov, 1995).

[0087] 8. J. Pei, B. H. Kim, N. V. Grishin, PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res* 36, 2295 (Apr, 2008).

[0088] 9. J. W. Schoggins et al., A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481 (Apr 28, 2011).

[0089] 10. Y. H. Chiu, J. B. Macmillan, Z. J. Chen, RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576 (Aug 7, 2009).

[0090] 11. C. Pesavento, R. Hengge, Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* 12, 170 (Apr, 2009).

[0091] 12. B. W. Davies, R. W. Bogard, T. S. Young, J. J. Mekalanos, Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* 149, 358 (Apr 13, 2012).

[0092] 13. Z. H. Chen, P. Schaap, The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* 488, 680 (Aug 30, 2012).

[0093] 14. S. Sharma et al., Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* 35, 194 (Aug 26, 2011).

[0094] 15. N. Yan, Z. J. Chen, Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 13, 214 (2012).

[0095] 16. V. Pascual, L. Farkas, J. Banchereau, Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Current opinion in immunology* 18, 676 (Dec, 2006).

[0096] 17. Y. Yao, Z. Liu, B. Jallal, N. Shen, L. Ronnblom, Type I Interferons in Sjogren's Syndrome. *Autoimmunity reviews*, (Nov 29, 2012).

[0097] 18. R. E. Rigby, A. Leitch, A. P. Jackson, Nucleic acid-mediated inflammatory diseases. *Bioessays* 30, 833 (Sep, 2008).

[0098] 19. A. Takaoka et al., DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501 (Jul 26, 2007).

[0099] 20. L. Unterholzner et al., IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11, 997 (Nov, 2010).

[0100] 21. Z. Zhang et al., The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 12, 959 (Oct, 2011).

[0101] 22. 人类和小鼠的 cGAS 序列的 GenBank 登录号是 KC294566 和 KC294567。

[0102] 实施例 3. 包含混合的磷酸二酯键的环 GMP-AMP 是 STING 的内源高亲和性配体

[0103] 微生物感染的天然免疫传感是由种系编码的模式识别受体所介导的,其包括膜蛋白如 Toll 样受体 (TLR) 和细胞质蛋白如 NOD 样受体 (NLR) 和 RIG-I 样受体 (RLR) (Iwasaki 和 Medzhitov, 2010 ;Ronald 和 Beutler, 2010 ;Takeuchi 和 Akira, 2010)。由于几乎所有的感染性微生物在其生命周期中均包含并需要核酸,天然免疫系统已演化以识别微生物 DNA 和 RNA 来作为宿主防御的核心策略。具体地,数个 TLR 在内涵体膜上定位,以检测内涵体内腔中的 RNA 或 DNA,而 RLR 负责检测细胞质中的病毒和细菌 RNA。

[0104] 已知 DNA 是免疫刺激分子已一个多世纪,但至今 DNA 如何激活宿主免疫系统还未被广泛研究 (O'Neill, 2013)。通过 TLR9 检测内涵体中的 DNA,其将引发 I 型干扰素和炎性细胞因子的产生。当微生物或宿主 DNA 递送到细胞质时,其也可以通过内质网膜蛋白 STING (也称为 MITA、ERIS 或 MPYS) 诱导 I 型干扰素 (Barber, 2011)。STING 的功能为募集并激活蛋白激酶 IKK 和 TBK1 的衔接蛋白,所述激酶依次又激活转录因子 NF- κ B 和 IRF3 以诱导干扰素和其它细胞因子。

[0105] 本发明人最近鉴定了环 GMP-AMP 合酶 (cGAS) 为激活 STING 的 DNA 传感器 (Sun 等人, 2013 ;Wu 等人, 2013)。具体地,本发明人发现 cGAS 在 DNA 存在的情况下催化从 ATP 和 GTP 到环 GMP-AMP (cGAMP) 的合成。然后 cGAMP 发挥结合并激活 STING 的第二信使的作用。虽然这些研究清楚地证实,cGAMP 是哺乳动物细胞中经 cGAS 产生的内源性第二信使,cGAMP 中 GMP 和 AMP 之间的内部磷酸二酯键的确切性质部分并未确定,这部分是由于单独的质谱无法在没有所有 cGAMP 异构体作为标准参考可用的情况下明确地区分这些键。尽管化学合成的包含同质的 3'-5' 键的 cGAMP 能诱导 IFN β ,但仍然可能的是,包含其它磷酸二酯键的 cGAMP 也可能激活 STING 通路。

[0106] 在这一研究中,本发明人进一步通过化学和生物物理学技术的组合来研究 cGAMP 的结构。本发明人发现,由 cGAS 产生的 cGAMP 在 GMP 的 2'-OH 和 AMP 的 5'-磷酸之间包含磷酸二酯键且在 AMP 的 3'-OH 和 GMP 的 5'-磷酸之间包含另一个磷酸二酯键。本发明人进一步发现,这一分子 (本文中称为 2' 3'-cGAMP) 在哺乳动物细胞中产生,以响应细胞质中的 DNA。此外,本发明人证明了 2' 3'-cGAMP 以高亲和力结合 STING 并且是干扰素 β (IFN β) 的强诱导物。本发明人还解析了结合到 cGAS 产物的 STING 的晶体结构并观察到 2' 3'-cGAMP 和 STING 之间的广泛的相互作用,其为它们的特异性和高亲和结合提供了结构基础。重要的是,STING-cGAMP 复合体的结构揭示了在 STING 激活时,此天然配体诱导了 STING 中的构象重排。

[0107] cGAS 的产物是包含混合的磷酸二酯键的环 GMP-AMP

[0108] 已知在核苷酸之间天然存在着 2'-5' 和 3'-5' 磷酸二酯键,而 2'-5' 键则不常见。由 cGAS 产生的天然 cGAMP 的内部磷酸二酯键仍有待确定。因此,本发明人化学合成了包含所有四种可能的磷酸二酯键的 cGAMP 分子 (表 S1)。使用修改自己出版方法 (Gaffney 等人, 2010 ;Zhang 等人, 2006) 的方法进行 cGAMP 同种型的化学合成。简明起见,本发明人按形成磷酸二酯键的 GMP 的 OH 位置接 AMP 的 OH 位置来命名这些 cGAMP 分子;例如,2' 3'-cGAMP 包含在 GMP 的 2'-OH 和 AMP 的 5'-磷酸之间的磷酸二酯键和在 AMP 的 3'-OH 和 GMP 的 5'-磷酸之间的另一个磷酸二酯键。本发明人还使用纯化的 cGAS 蛋白在 DNA 存在

的情况下从 ATP 和 GTP 酶促合成天然的 cGAMP (Sun 等人, 2013)。通过核磁共振 (NMR) 谱分析纯化的 cGAS 产物和合成的 cGAMP 异构体。引人注意的是, cGAS 产物的 ^1H NMR 谱与合成的 2' 3' -cGAMP 的 ^1H NMR 谱相同, 但与其它 cGAMP 异构体不同。具体而言, 异头质子 ($\text{H}1'$) 与具有 3' - 磷酸的单峰, 和具有 2' - 磷酸的双峰。一致的是, 仅有 2', 3' -cGAMP 的磷酸盐具有与天然 cGAMP 的磷酸盐相同的 ^{31}P NMR 化学位移。本发明人还使用 Q-Exactive (具有高分辨率和质量准确度的仪器) 进行了天然的和合成的 cGAMP 的质谱分析。每个单电荷分子的总质量 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 是 675.107, 其精确匹配了 cGAMP 的理论质量。cGAS 产物 (使用较高能量碰撞解离 (HCD) 使其片段化) 的串联质谱 (MS/MS) 与合成的 2' 3' -cGAMP 的串联质谱相同, 与 2' 2' -cGAMP 和 3' 3' -cGAMP 的串联质谱相似但不相同。3' 2' -cGAMP 的 MS/MS 谱似乎与 2' 3' -cGAMP 和 cGAS 产物的谱最为不同。反相 HPLC 分析表明, 天然 cGAMP 与 2' 3' -cGAMP 共洗脱, 但不与其它 cGAMP 分子共洗脱。本发明人还通过圆二色谱 (CD) 确定了 cGAS 产物的构象, 证实了其衍生自 D-核糖。天然的 cGAMP 的 CD 谱与 2' 3' -cGAMP 的 CD 谱很好地重叠。近 -UV CD 谱表明, 4 个 cGAMP 采用了显著不同的构象, 2' 3' -cGAMP 和 2' 2' -cGAMP 形成的 CD 条带图案与 3' 2' -cGAMP 和 3' 3' -cGAMP 所形成的不同。总之, 这些结果提供了 cGAS 在体外合成 2' 3' -cGAMP 的明确证据。

[0109] 在 DNA 转染的细胞中产生的内源性 cGAMP 包含混合的磷酸二酯键

[0110] 为了测试哺乳动物细胞是否能够产生包含混合的磷酸二酯键的内源性 cGAMP, 本发明人用鲑鱼精巢 DNA (HT-DNA) 转染了小鼠细胞系 L929 和人单核细胞 THP1, 然后将细胞裂解物在 95°C 加热以变性蛋白, 并制备上清液以通过质谱分析内源性 cGAMP (Wu 等人, 2013)。来自两种细胞系的内源性分子的 MS/MS 谱与 cGAS 产物和 2' 3' -cGAMP 的 MS/MS 谱相同, 这表明内源性第二信使是 2' 3' -cGAMP。

[0111] 2' 3' -cGAMP 是 STING 的高亲和性配体

[0112] 本发明人进行了等温滴定量热法实验以测量 STING 结合到天然的和合成的 cGAMP 的亲合力 (K_d)。在大肠杆菌中表达包含人类 STING (其在之前被证明介导与细菌第二信使环二-GMP 的结合 (Burdette 等人, 2011; Huang 等人, 2012; Ouyang 等人, 2012; Shang 等人, 2012; Shu 等人, 2012; Yin 等人, 2012)) 的残基 139-379 的 C 端结构域 (CTD) 并纯化至表观同质性, 以用于 ITC 实验。与之前的报道一致, 本发明人发现, c-二-GMP 以 1.21 μM 的 K_d 结合 STING。有趣的是, 天然的 cGAMP 和合成的 2' 3' -cGAMP 均以如此高的亲合力结合 STING, 使得曲线拟合是困难的。此外, 与 c-二-GMP 的结合 (其是一个放热过程) 不同, 天然的 cGAMP 和 2' 3' -cGAMP 与 STING 的结合是吸热的, 这表明能量可能用于 STING 的构象变化 (见下文)。为了获得天然的和合成的 2' 3' -cGAMP 对 STING 的 K_d , 本发明人滴定了不同量的此类化合物, 以作为进入 STING-c-二-GMP 复合体的竞争物。这些测量获得的 cGAS 产物的 K_d 为 4.59 nM, 2' 3' -cGAMP 的 K_d 为 3.79 nM。对 3' 2' -cGAMP 也进行了竞争实验, 这是由于其与 STING 的结合产生了小的热量变化。这一化合物以 1.61 μM 的 K_d 结合 STING。将 2' 2' -cGAMP 和 3' 3' -cGAMP 直接滴定至 STING 并计算 K_d 值分别为 287 nM 和 1.04 μM 。因此, 2' 3' -cGAMP 的 K_d 比 c-二-GMP、3' 2' -cGAMP 和 3' 3' -cGAMP 低约 300 倍, 比 2' 2' -cGAMP 低约 75 倍。

[0113] cGAMP 是 I 型干扰素的强诱导物

[0114] 本发明人递送了不同量的 cGAMP 异构体以及 c-二-GMP 进 L929 细胞并通过

q-RT-PCR 测量 IFN β 的诱导。cGAMP 分子诱导 IFN β 的 EC_{50} 的范围是从 15nM 至 42nM, 而 c-二-GMP 具有大于 500nM 的 EC_{50} 。因此, 似乎不同的环二核苷酸的结合亲和性在基于细胞的分析中不能与其 EC_{50} 具有很好的相关性。这一点的原因并不明确, 但可能的是, 不同的化合物在细胞中具有不同的稳定性或分布。无论如何, 这些实验提供了直接的证据表明, cGAS 产物、2' 3'-cGAMP 是 STING 在细胞中的高亲和性配体 (K_d : $\sim$ 4nM) 且是 IFN β 的强诱导物 (EC_{50} : $\sim$ 20nM)。

[0115] STING-cGAMP 复合体的晶体结构揭示了 STING 的配体诱导的构象重排

[0116] 本发明人以 C2 空间群共结晶了 STING 的 C 末端结构域 (CTD) (残基 139-379) 与纯化的 cGAS 产物。使用 apo-STING 结构 (PDB 代码: 4F9E) 作为搜索模型通过分子置换解析复合体的结构并精化 (refined) 到 1.88 Å 的分辨率 (表 M1)。在晶体不对称单位中存在一个 STING 原聚体, 其与另一个以晶体二重对称 (crystallographic two-fold symmetry) 相关联的原聚体形成蝴蝶状二聚体。结合的 cGAMP 分子位于二重轴上 (详见下文)。STING 的有序区域 (从 Asn152 至 Glu336) 采用了类似于 apo-STING 的整体结构, 其特点在于被 4 个 α 螺旋包围着中心扭曲 β 折叠。然而, 与 cGAMP 复合的 STING 在单体结构和二聚体排列中显示出与 apo-STING 具有数个显著的差异。与 apo-二聚体相比, 复合体结构的二聚体中的 2 个原聚体相对于 cGAMP 结合位点实质上进行了向内旋转。这一更紧密的排列在 2 个原聚体之间产生了更深的口袋以接纳 cGAMP。此外, cGAMP 结合位点被 4 股反平行 β 折叠的盖和由 2 个原聚体中的每一个的残基 219-249 所形成的连接环所覆盖。相比之下, apo-结构中的这一区段很大程度上是无序的 (Ouyang 等人, 2012; Yin 等人, 2012)。 β 片层的形成不归因于晶体包装 (crystallographic packing)。在盖内的域间相互作用涉及数对极性接触: 在 Tyr245 的侧基和 Gly234 的主链羰基氧原子之间, 在 Ser243 的侧基和 Lys236 的主链酰胺氮原子之间以及在 Asp237 和 Lys224 的侧基之间。

[0117] 2' 3'-cGAMP 和 STING 之间的广泛的相互作用是其特异性和高亲和性结合的基础

[0118] 由于晶体二重轴穿过不对称的 2' 3'-cGAMP 分子, cGAMP 必须采用与二重对称性相关的两个取向。这与下述事实一致, STING 二聚体中的 2 个原聚体预期具有相同的与鸟苷 (guanidine) 或腺苷部分相互作用的概率。因此, 本发明人为 cGAMP 和数个周边氨基酸残基分配了 2 个具有 0.5 占据 (occupancy) 的可选构象。精细结构的模拟退火省略图显示了 cGAMP 的合适 (decent) 密度。2' 3'-cGAMP (而不是其它的亚型) 很好地匹配电子密度图。与结合 STING 的 c-二-GMP 相比, cGAMP 在 STING 二聚交界之间的缝隙中深了约 2.5 Å。此外, 蝴蝶的两翼在 STING:cGAMP 结构中相互近了约 20 Å, 这是由于 2 个 STING 原聚体的排列更接近。cGAMP 结合口袋的进一步分析表明 cGAMP 很好地受广泛的极性和疏水相互作用协调。cGAMP 嘌呤碱基的环堆积于 4 个周围的芳香族残基 (2 个原聚体中的每一个的 Tyr240 和 Tyr167)。值得注意的是, cGAMP 的 2 个 α -磷酸基团从 2 个原聚体接触 Arg238 以及从 1 个原聚体接触 Arg232。GMP 的游离 3'-OH 指向来自口袋下部的 2 个 Ser162 残基。鸟嘌呤碱基直接与 Glu260 和 Thr263 的侧基以及 Val239 的主链羰基氧相互作用。这些独特的极性接触解释了为什么 2' 3'-cGAMP 是 STING 的特异性和高亲和性配体。此外, 来自 β -折叠的残基 (Arg232、Arg238、Val239, 其参与 cGAMP 结合) 有可能控制盖的形成及 STING 的进一步激活。

[0119] STING 的精氨酸 232 对于细胞质 DNA 信号通路是重要的

[0120] 结合环-二-GMP 的 STING 的晶体结构的三个先前的报道中使用了稀有的人类变体(用组氨酸替换 Arg232)(Ouyang 等人, 2012; Shu 等人, 2012; Yin 等人, 2012)。来自人类群体的 DNA 的广泛测序表明, Arg232 等位基因是普遍的, 因此, 应考虑为野生型 STING(Jin 等人, 2011)。STING 的 H232 变体的使用可以解释在这些研究中为什么 c-二-GMP 不诱导 STING 的显著构象变化(Ouyang 等人, 2011; Shu 等人, 2011; Yin 等人, 2012)。先前的报道显示, 小鼠 STING 的 Arg231(相当于人类 STING 的 Arg232)到丙氨酸的突变去除了经环-二-GMP(而不是 DNA)的 IFN β 诱导(Burdette 等人, 2011)。然而, 基于本发明人的 STING-cGAMP 复合体的晶体结构, Arg232 到组氨酸的突变预期显著减弱了 cGAMP 的结合和经 STING 的下游信号, Arg232 到丙氨酸的突变应该更加不利。因此, 本发明人在两组实验中研究了 STING 的 Arg232 的功能。首先, 本发明人通过 RNAi 敲降了 L929 细胞中的内源性 STING 并用人类 STING 的 WT、R232A 或 R232H 将其取代。用 HT-DNA 转染或用 2' 3'-cGAMP 处理这些稳定的细胞系, 然后通过 q-RT-PCR 测量 IFN β 。表达 WT STING 的细胞能够响应 DNA 或 cGAMP 刺激以诱导 IFN β , 而那些表达 R232A 或 R232H 的则存在缺陷。作为对照, 双链 RNA 类似物聚[I:C]在所有这些细胞系中都刺激 IFN β 的表达。其次, 本发明人在 HEK293T 细胞(其检测不到内源性 STING 和 cGAS 的表达)(Sun 等人, 2013)中稳定表达 WT STING 或突变体 STING。然后用人类 cGAS 表达质粒转染细胞, 再测量 IFN β 的 RNA。WT STING(而不是 R232A 突变体)能经 cGAS 支持 IFN β 的诱导。R232H 突变体是部分缺陷的, 这可能是由于带正电荷的组氨酸可能微弱地取代了 Arg232 的一些功能。MAVS(RIG-I 通路的重要衔接蛋白(Seth 等人, 2005))能够在所有这些细胞系中诱导 IFN β 。总之, 本发明人的结构和功能数据强烈表明, Arg232 在 STING 的功能中发挥重要作用, 并进一步强调了 cGAS 作为不可或缺的细胞质 DNA 传感器的作用。

[0121] 讨论

[0122] 本发明人以前的研究鉴定 cGAS 为细胞质 DNA 传感器和使用 ATP 和 GTP 作为底物合成 cGAMP 的环化酶(Sun 等人, 2013; Wu 等人, 2013)。然后, cGAMP 作为第二信使起作用以结合并激活 STING。本文中, 本发明人采用了化学合成和数个生物物理方法来进一步表征 cGAS 产物的内部磷酸二酯键并确定其是 2' 3'-cGAMP。随后, Gao 等人报道了 apo 结合形式和 DNA 结合形式的 cGAS 的结构, 其证实了 cGAS 确实是 DNA 激活的环-GMP-AMP 合酶, 其催化从 ATP 和 GTP 到 cGAMP 的合成(Gao 等人, 2013)。该巧妙的研究还阐明了 DNA 结合导致 cGAS 激活的结构机理。通过使用不同的方法, Gao 等人还发现, 截短的 cGAS 蛋白在体外合成 2' 3'-cGAMP。然而, 他们并没有测试 2' 3'-cGAMP 是否具有任何的生物或生化活性, 也没有示出在哺乳动物细胞中是否产生了内源性 2' 3'-cGAMP。在这一报道中, 本发明人表明, 用 DNA 刺激小鼠和人类细胞导致了内源性 2' 3'-cGAMP 的产生。此外, 本发明人证明了 2' 3'-cGAMP 以比其它 cGAMP 异构体和 c-二-GMP 大得多的亲和力结合 STING。本发明人进一步示出 2' 3'-cGAMP 和其它 cGAMP 异构体在诱导细胞中 IFN β 方面比 c-二-GMP 强力的多。

[0123] 对 2' 3'-cGAMP 的结构和功能的进一步洞察获得自结合这一内源性配体的 STING CTD 的晶体结构。这一晶体结构具有 1.88 Å 的分辨率, 其允许详细观察配体结构, 包括 2'-5' 磷酸二酯键和 3'-5' 磷酸二酯键二者。结构揭示了 STING 上介导了 2' 3'-cGAMP 的结

合的特定残基。此外,将这一结构与先前公布的 apo 形式的 STING CTD 结构相比较揭示了经该天然配体诱导的广泛的构象重排。具体地,V 形 STING 二聚体的 2 个臂移动近了约 20 Å,且在配体结合的 STING 结构中的 cGAMP 结合位点上,新的 4 个 β 链片层形成盖子。这些特征不存在于先前确定的 STING:c-二-GMP 结构中(其使用包含 R232H 突变的 STING 变体)。在这些结构中,c-二-GMP 结合不诱导 STING 中的任何明显的构象重排(Ouyang 等人,2012;Shu 等人,2012;Yin 等人,2012)。然而,在包含 WT STING(Arg232)和 c-二-GMP 的另外 2 个结构中,一个显示出与在 STING-cGAMP 复合体中所观察到的构象变化类似的构象变化(Huang 等人,2012),另一个显示出不同的构象变化,这是由于 Arg232 的方向不同(Shang 等人,2012)。Huang 等人所观察到的“关闭的”(closed)构象可能已经捕获经 c-二-GMP 诱导的 STING 的活性状态,其能够激活 STING,尽管比 cGAMP 更弱。

[0124] 在 STING 和 2' 3'-cGAMP 之间的广泛相互作用为它们的高亲和性结合提供了结构基础。具体而言,Glu260、Thr263 和 Val239 与 GMP 的鸟嘌呤碱基相互作用且 Ser162 与 GMP 的游离 3'-OH 基团相互作用,这解释了为什么包含在 GMP 的 2'-OH 和 AMP 的 5'-磷酸之间的磷酸二酯键的 cGAMP 是高亲和性配体。此外,2 个 α 磷酸基团与一个原聚体的 Arg232 和 2 个原聚体的 Arg238 相互作用。这一结构分析解释了 R232A 或 R232H 突变强烈削弱了 STING 响应 DNA 或 cGAMP 的功能。本发明人的数据突出了在结构和功能研究中使用野生型(Arg232)STING 的重要性。

[0125] 虽然 2' 3'-cGAMP 以比包含其它磷酸二酯键的 cGAMP 异构体高得多的亲和力结合 STING,所有 4 个 cGAMP 异构体以相似的 EC_{50} 值诱导 IFN β ,其均比 c-二-GMP 低得多。因此,所有 cGAMP 亚型都是 IFN β 的强诱导物。

[0126] 总之,本发明人的结果表明:1)哺乳动物细胞中所产生的响应细胞质 DNA 刺激的内源性第二信使是 2' 3'-cGAMP;2)2' 3'-cGAMP 是 STING 的高亲和性配体;3)2' 3'-cGAMP 是哺乳动物细胞中 IFN β 的强诱导物;4)2' 3'-cGAMP 诱导可能是其激活基础的 STING 中的构象重排;和 5)在复合体的晶体结构中所观察到的 2' 3'-cGAMP 和 STING 之间的广泛相互作用解释了它们的特异性和高亲和性结合。

[0127] 本发明人得出结论:2' 3'-cGAMP 是由哺乳动物细胞产生的内源性第二信使;2' 3'-cGAMP 是 STING 的高亲和性配体;2' 3'-cGAMP 是 I 型干扰素的强诱导物;和 2' 3'-cGAMP 结合诱导 STING 的构象变化。

[0128] 登录号

[0129] 结合人类 STING CTD 结构的 2' 3'-cGAMP 的坐标已保存于 RCSB 蛋白质数据库(PDB:4KSY)。

[0130] 参考文献

[0131] GUSSI. 在互联网 <http://biophysicsswmededu/MBR/softwarehtml> 上。

[0132] Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica* 66, 213-221.

[0133] Barber, G. N. (2011). Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological reviews* 243, 99-108.

- [0134] Burdette, D. L. , Monroe, K. M. , Sotelo-Troha, K. , Iwig, J. S. , Eckert, B. , Hyodo, M. , Hayakawa, Y. , and Vance, R. E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515-518.
- [0135] DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. 在互联网<http://www.pymol.org>上。
- [0136] Emsley, P. , Lohkamp, B. , Scott, W. G. , and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta crystallographica* 66, 486-501.
- [0137] Gaffney, B. L. , Veliath, E. , Zhao, J. , and Jones, R. A. (2010). One-flask syntheses of c-di-GMP and the [Rp, Rp] and [Rp, Sp] thiophosphate analogues. *Org Lett* 12, 3269-3271.
- [0138] Gao, P. , Ascano, M. , Wu, Y. , Barchet, W. , Gaffney, B. L. , Zillinger, T. , Serganov, A. A. , Liu, Y. , Jones, R. A. , Hartmann, G. , et al. (2013). Cyclic[G(2', 5')pA(3', 5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell*.
- [0139] Houtman, J. C. , Brown, P. H. , Bowden, B. , Yamaguchi, H. , Appella, E. , Samelson, L. E. , and Schuck, P. (2007). Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Sci* 16, 30-42.
- [0140] Huang, Y. H. , Liu, X. Y. , Du, X. X. , Jiang, Z. F. , and Su, X. D. (2012). The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. *Nature structural & molecular biology* 19, 728-730.
- [0141] Iwasaki, A. , and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.
- [0142] Jin, L. , Xu, L. G. , Yang, I. V. , Davidson, E. J. , Schwartz, D. A. , Wurfel, M. M. , and Cambier, J. C. (2011). Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. *Genes and immunity* 12, 263-269.
- [0143] Keller, S. , Vargas, C. , Zhao, H. , Piszczek, G. , Brautigam, C. A. , and Schuck, P. (2012). High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Analytical chemistry* 84, 5066-5073.
- [0144] Minor, W. , Cymborowski, M. , Otwinowski, Z. , and Chruszcz, M. (2006). HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution--from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta crystallographica* 62, 859-866.
- [0145] O'Neill, L. A. (2013). Immunology. Sensing the dark side of DNA. *Science* 339, 763-764.
- [0146] Ouyang, S. , Song, X. , Wang, Y. , Ru, H. , Shaw, N. , Jiang, Y. , Niu, F. , Zhu, Y. , Qiu, W. , Parvatiyar, K. , et al. (2012). Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding.

Immunity 36,1073-1086.

[0147] Ronald, P. C., and Beutler, B. (2010). Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. Science 330, 1061-1064.

[0148] Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. Cell 122, 669-682.

[0149] Shang, G., Zhu, D., Li, N., Zhang, J., Zhu, C., Lu, D., Liu, C., Yu, Q., Zhao, Y., Xu, S., et al. (2012). Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. Nature structural & molecular biology 19, 725-727.

[0150] Shu, C., Yi, G., Watts, T., Kao, C. C., and Li, P. (2012). Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. Nature structural & molecular biology 19, 722-724.

[0151] Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science 339, 786-791.

[0152] Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140, 805-820.

[0153] Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science 339, 826-830.

[0154] Yin, Q., Tian, Y., Kabaleeswaran, V., Jiang, X., Tu, D., Eck, M. J., Chen, Z. J., and Wu, H. (2012). Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. Molecular cell 46, 735-745.

[0155] Zhang, Z., Kim, S., Gaffney, B. L., and Jones, R. A. (2006). Polymorphism of the signaling molecule c-di-GMP. J Am Chem Soc 128, 7015-7024.

[0156] 表 M1. 结合 STING 的 cGAMP 的数据收集和精化的统计

[0157]

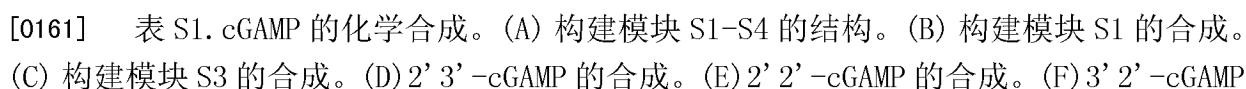
数据	结合 STING 的 cGAMP
空间群	C2
单胞($\text{\AA}$, $^\circ$)	89.525 77.927 35.974 90 96.98 90
ASU 中的分子数	1

[0158]

波长(Å)	0.97918
分辨率(Å)	50-1.88 (1.91-1.88)
R _{merge} (%)	7.8 (65.0)
I/σ	17.82 (2.20)
完整性(%)	99.4 (98.6)
所测量的反射的数量	99,635
独特反射的数量	19,800
冗余	5.0 (4.8)
Wilson B 因子(Å ²)	30.80
R-因子 (%)	16.07 (23.09)
R _{free} (%)	18.15 (30.83)
原子数	
大分子	1483
配体	45
水	72
所有原子	1600
平均 B 值(Å ²)	
大分子	46.20
配体	23.10
溶剂	50.00
所有原子	45.70
理想值的 Rms 偏差	
键(Å)	0.007
角度(°)	1.213
拉氏图统计(%)	
青睐	97.22
允许	2.78
离群	0

[0159] 括号中的数值是最高分辨率的外沿的。 $R = \Sigma |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \Sigma F_{\text{obs}}$, 其中 F_{calc} 是从原子模型所计算的蛋白结构因子 (用 10% 的所选反射计算 R_{free})。

[0160]



的合成。(G) 3' 3' -cGAMP 的合成。

[0162] 实施例 4. 环 GMP-AMP 合酶是 HIV 和其它逆转录病毒的自然免疫传感器

[0163] 包括 HIV 的逆转录病毒可激活天然免疫应答,但逆转录病毒的宿主传感器在很大程度上是未知的。本文中,本发明人示出了 HIV 感染激活了环 -GMP-AMP (cGAMP) 合酶 (cGAS) 以产生 cGAMP,其结合并激活衔接蛋白 STING 以诱导 I 型干扰素和其它细胞因子。HIV 逆转录酶而不是整合酶的抑制剂去除了经病毒的干扰素 β 的诱导,这表明逆转录的 HIV DNA 触发了天然免疫应答。在小鼠或人类细胞系中 cGAS 的敲除或敲降阻止了经 HIV、鼠白血病病毒 (MLV) 和猴免疫缺陷病毒 (SIV) 的细胞因子的诱导。这些结果表明,cGAS 检测逆转录病毒 DNA,并且 cGAS 是 HIV 和其它逆转录病毒的自然免疫传感器。

[0164] 虽然在许多微生物病原体的天然免疫识别的理解上有了巨大的进步 (1-3),但对于逆转录病毒感染的天然免疫应答还相对知之甚少 (4)。逆转录病毒被认为引发弱的或没有引发天然免疫应答,其通常通过炎性细胞因子和 I 型干扰素的产生所测量。然而,最近的研究已经表明,逆转录病毒如 HIV 能引发天然免疫应答,其通常被病毒或宿主因子所遮掩 (5-8)。例如, TREX1 是细胞质外切核酸酶,其降解来自 HIV 或内源性反转录因子的 DNA,从而防止会引发天然免疫的细胞质 DNA 的累积 (9,10)。人类中的 TREX1 的功能突变的缺失已与 Aicardi Goutieres 综合征 (AGS) 密切相关,该病是特征在于升高表达的炎性细胞因子和干扰素刺激基因的狼疮样疾病 (11)。

[0165] 本发明人最近鉴定了酶环 GMP-AMP (cGAMP) 合酶 (cGAS) 是触发 I 型干扰素和其它细胞因子产生的细胞质 DNA 传感器 (12,13)。DNA 结合并激活 cGAS,其催化从 ATP 和 GTP 到独特的 cGAMP 异构体的合成。此 cGAMP 异构体 (被称为 2' 3' -cGAMP,包含 2' -5' 和 3' -5' 磷酸二酯键) 的功能为结合并激活内质网蛋白 STING 的第二信使 (14-17)。然后,STING 激活蛋白激酶 IKK 和 TBK1,其依次激活转录因子 NF- κ B 和 IRF3 以诱导干扰素和其它细胞因子 (18)。cGAS 的敲降抑制了经 DNA 病毒如单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 和牛痘病毒的 IFN β 的诱导 (13)。由于逆转录病毒通过逆转录从病毒 RNA 生成互补 DNA,本发明人推测 cGAS 可能检测逆转录病毒的 DNA 并触发天然免疫应答。

[0166] 本发明人使用了单轮 HIV-1 病毒,其包膜蛋白被水泡性口炎病毒的糖蛋白 (VSV-G) 所替代,使得其能够感染各种人类和小鼠细胞类型 (9)。这种病毒也表达 GFP,其可以用于监测病毒感染。用 HIV-GFP 感染人单核细胞系 THP1 导致 IRF3 的二聚化 (其激活的标志)。在 HIV 感染后也检测到 STAT1 在 Tyr-701 的磷酸化,这表明干扰素信号通路在病毒感染的细胞中被激活 (19)。HIV 感染导致 IFN β 和趋化因子 CXCL10 的诱导,其伴随着 HIV Gag 游离型 DNA 的产生。IFN β 产生的水平与 HIV 感染的多重性成正比。用 DNaseI 处理 HIV-GFP 病毒不损害其诱导 IFN β 的能力,而用 DNaseI 处理鲑鱼精巢 DNA (HT-DNA) 抑制了 IFN β 的诱导,这表明经 HIV-GFP 的 IFN β 的诱导并不归因于任何污染的 DNA。通过用佛波醇 -12- 肉豆蔻酸酯 -13- 乙酸酯 (PMA) 处理细胞使得 THP1 从单核细胞分化至巨噬细胞,这抑制了 HIV-GFP 的感染或复制并强烈抑制了 IFN β 的诱导。因此,除非另外说明,在本发明人的研究中所用的 THP1 细胞在 HIV 感染之前未经 PMA 处理。

[0167] 为了测试 HIV 是否需要逆转录以激活天然免疫应答,本发明人用 HIV 逆转录酶抑制剂 (叠氮胸苷 (AZT) 和奈韦拉平 (nevirapine) (NVP)) 处理 THP1 细胞。这两种抑制剂都阻断经 HIV 的 IRF3 的激活和 IFN β 的诱导。相比之下, HIV 整合酶抑制剂雷特格韦

(raltegravir) (RAL) 不影响此通路的激活。AZT 和 NVP 即使在高浓度下也不抑制经 HT-DNA 的 IFN β 的诱导,这表明 AZT 和 NVP 的抑制作用是由于其特异性地抑制 HIV 逆转录。这些结果表明,逆转录的 HIV DNA 是 IRF3 激活和 IFN β 产生的引发物。

[0168] 引人注意的是, shRNA 介导的 THP1 细胞中 cGAS 或 STING 的敲降强烈地抑制了经 HIV-GFP 的 IFN β 和 CXCL10 的诱导和 IRF3 的激活。对照实验表明,抗萤光素酶的 shRNA 不抑制此通路的激活,且 shRNA 载体特异性地敲降预定目标。具体而言, cGAS 的 shRNA 敲降 cGAS 但不会敲降 STING,并且在这些细胞中,将 cGAMP 递送进细胞恢复了 IFN β 的诱导,这说明 cGAS 的 shRNA 在 STING 通路中没有脱靶效应。

[0169] 以前的研究表明,VSV-G 假型化的 HIV-1 在 TREX1 缺陷小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中强烈诱导了 IFN β ,但不能在野生型 (WT)MEF 中强烈诱导 IFN β (9)。本发明人制备了稳定表达抗 cGAS、STING 或萤光素酶 (作为对照) 的 shRNA 的 Trex1^{-/-} MEF 细胞系。HIV 感染在对照细胞 (sh- 萤光素酶) 中诱导 IFN β 和 CXCL10RNA,但在 cGAS 或 STING 缺失的细胞中则没有。相比之下,cGAS 或 STING 的敲降不影响经双链 RNA 类似物聚 [I :C] 的 IFN β 或 CXCL10 的诱导。

[0170] 为了获得 cGAS 在细胞质 DNA 和反转录病毒的天然传感中作用的确切证据,本发明人采用 TALEN 技术破坏 L929 细胞中编码 cGAS 的基因 (Mb21d1),尤其是编码催化结构域的区域 (20)。虽然 L929 细胞包含三个拷贝的具有 cGAS 基因的 9 号染色体的,TALEN 表达细胞的 DNA 测序鉴定了在所有三个染色体中都具有缺失的多个克隆;选择这些克隆中的 3 个以用于进一步的研究。所有的 3 个克隆都在 cGAS 基因座包含产生移码突变的缺失 (21)。

[0171] 所有 3 个 cGAS 突变细胞系均未能响应 HT-DNA 转染或单纯性疱疹病毒 (HSV-1 ;双链 DNA 病毒) 感染来激活 IRF3。作为对照,这些细胞正常地响应聚 [I :C] 的转染或仙台病毒 (RNA 病毒) 的感染来激活 IRF3。cGAS 突变细胞也在响应 HT-DNA 诱导 CXCL10 上存在缺陷,但这一缺陷被使用小鼠 cGAS 表达质粒转染细胞所恢复。

[0172] 本发明人选择 cGAS 突变克隆 #18 和亲本 L929 细胞来研究 cGAS 在 HIV 感染的天然免疫识别中的作用。在稳定表达抗 TREX1 的 shRNA (而不是对照的萤光素酶) 的 L929 细胞中,HIV-GFP 感染诱导 IRF3 的二聚化并产生 IFN β 和 CXCL10。相比之下,L929cGAS 突变细胞未能产生任何可检测的对 HIV 感染的免疫应答,即使 TREX1 被消除,这证明了 cGAS 在抗 HIV 的免疫应答中发挥了重要作用。cGAS 的消除不影响经仙台病毒的 IFN β 或 CXCL10 的诱导。

[0173] 在之前,本发明人已经表明,HEK293T 细胞不表达可检测水平的 cGAS 和 STING,因此不能响应 DNA 转染或 DNA 病毒感染来激活 IRF3 (13)。与 cGAS 和 STING 在反转录病毒的检测中的重要作用一致,HIV-GFP 感染在 THP1 中而不在 HEK293T 细胞中激活 IRF3 和 STAT1。相比之下,仙台病毒在两种细胞系中都激活 IRF3 和 STAT1。为了确定 HIV 感染是否导致人类细胞中内源性 cGAMP 的产生,本发明人制备了来自 HIV 感染的 THP1 和 HEK293T 细胞的裂解物,将裂解物于 95 $^{\circ}$ C 加热以变性大多数蛋白 (通过离心去除 (12))。将潜在包含 cGAMP 的上清液递送至已被细菌毒素产气荚膜杆菌溶素 -0 (PF0) 透化的 THP1 细胞中,然后通过非变性凝胶电泳分析 IRF3 的二聚化。来自 HIV 感染的 THP1 (而不是 HEK293T 细胞) 的耐热上清液包含 cGAMP 活性,其在受体细胞中刺激 IRF3 的激活。此外,由 AZT、DDI (二脱氧肌苷) 或 NVP 抑制 HIV 逆转录阻止了 cGAMP 活性的产生,而 HIV 整合酶抑制剂 RAL 则没有影响。

L929-shTrex1 细胞中的 HIV-GFP 感染也导致了 cGAMP 活性的产生,其依赖于 cGAS。总之,这些结果表明,HIV 感染以依赖于 cGAS 和 HIV RNA 逆转录至 cDNA 的方式诱导内源性 cGAMP 的产生。

[0174] 为了测试 HIV 感染是否在细胞质中产生逆转录病毒 cDNA 以激活 cGAS,本发明人用 HIV-GFP 感染 HEK293T 细胞并制备细胞质提取物,其随后在 ATP 和 GTP 存在的情况下与纯化的 cGAS 蛋白孵育。来自 HIV 感染的细胞(而不是来自未感染的细胞)的细胞质提取物能刺激 cGAS 以产生在透化的 THP1 细胞中激活 IRF3 的 cGAMP 活性。用 AZT 处理 HEK293T 细胞抑制 cGAS 刺激活性的产生。进一步的分析表明,HIV 感染的细胞的细胞质中包含 HIV Gag 的 DNA 和 GFP 蛋白,这两者都被 AZT 抑制。

[0175] 使用选择性反应监测(SRM)通过质谱定量测定 cGAMP 丰度提供了 cGAMP 产生于 HIV 感染的(而不是空白处理的)THP1 细胞的直接证据。HIV 感染的 THP1 细胞的内源性 cGAMP 的串联质谱揭示了其与 cGAS 产物 $-2'3'$ -cGAMP 相同(15)。

[0176] 为了检测 HIV 感染在原代人类免疫细胞中是否会导致 cGAMP 的产生,本发明人分别用临床 HIV-1 分离物 HIV-BAL 和 HIV-GFP 感染单核细胞来源的巨噬细胞(MDM)和单核细胞来源的树突细胞(MDDC)。以前的研究已经表明,人类巨噬细胞和树突细胞表达 SAMHD1(其是水解 dNTP 的核酸酶,从而抑制 HIV 逆转录)。HIV-2 和猴免疫缺陷病毒(SIV)包含蛋白 Vpx,其靶向于用于泛素介导的蛋白酶体降解的 SAMHD1,从而消除了这一宿主制约因素。为了便于在人类 MDM 和 MDDC 中进行 HIV 感染,本发明人在 HIV 感染之前使用病毒样颗粒(VLP)将 SIV Vpx 递送到这些细胞中。在存在 Vpx 的情况下,分别用 HIV-BaL 和 HIV-GFP 感染 MDM 和 MDDC 导致 cGAMP 活性的产生。定量质谱分析进一步证实了在表达 Vpx 的 HIV 感染的 MDDC 中产生 $2'3'$ -cGAMP。在其它人类供体的 MDDC 和 MDM 中一致性地观察到了 cGAMP 活性,且用 HIV 感染的细胞中的这一活性高于仅用 Vpx 处理的细胞。这些结果证明,在允许病毒复制的条件下,人类巨噬细胞和树突细胞中的 HIV 感染导致产生 cGAMP。

[0177] 最后,本发明人通过用鼠白血病病毒(MLV)和 SIV 感染 L929 和 L929-cGAS KO 细胞系,测试了抗其它的逆转录病毒的天然免疫应答是否需要 cGAS。与 HIV 类似,在去除内源性 TREX1 的 L929 细胞中,MLV 和 SIV 诱导 IFN β 和 CXCL10RNA,但在 cGAS KO 细胞中此类诱导被完全消除。进一步支持 cGAS-STING 通路在逆转录病毒的天然免疫传感中发挥重要作用的是,在 Trex1^{-/-} MEF 细胞中敲降 cGAS 或 STING 强烈抑制了经 MLV 和 SIV 的 IFN β 的诱导。

[0178] 本文中,本发明人证明,cGAS 对于抗 HIV、SIV 和 MLV 的天然免疫应答是必要的,这表明 cGAS 是逆转录病毒 DNA 的一般天然免疫传感器。尽管 HIV 主要感染人类 CD4T 细胞,其也可以进入巨噬细胞和树突细胞,其通过将病毒核酸隐藏于衣壳中并通过增选(co-opting)宿主因子如 TREX1 和 SAMHD1 限制病毒 DNA 的累积使得其通常不触发明显的天然免疫应答(8)。在树突细胞中缺少针对 HIV 的严谨的天然免疫应答,这被认为是阻碍生产性 T 细胞应答和疫苗开发的主要因素(7)。本发明人的发现,即在允许性条件下 HIV 和其它逆转录病毒可以通过 cGAS 诱导产生 cGAMP,这表明 cGAMP 可用于绕过抗 HIV 的天然免疫应答的阻碍。因此,cGAMP 提供了有用的用于擅长破坏宿主天然免疫系统的 HIV 和其它病原体的疫苗佐剂。

[0179] 参考文献和注释

- [0180] 1. A. Iwasaki, R. Medzhitov, Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291 (Jan 15, 2010).
- [0181] 2. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805 (Mar 19, 2010).
- [0182] 3. P. C. Ronald, B. Beutler, Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* 330, 1061 (Nov 19, 2010).
- [0183] 4. R. Medzhitov, D. Littman, HIV immunology needs a new direction. *Nature* 455, 591 (Oct 2, 2008).
- [0184] 5. N. Manel, D. R. Littman, Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell* 147, 271 (Oct 14, 2011).
- [0185] 6. N. Manel et al., A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467, 214 (Sep 9, 2010).
- [0186] 7. J. Luban, Innate immune sensing of HIV-1 by dendritic cells. *Cell host & microbe* 12, 408 (Oct 18, 2012).
- [0187] 8. N. Yan, Z. J. Chen, Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 13, 214 (2012).
- [0188] 9. N. Yan, A. D. Regalado-Magdos, B. Stiggelbout, M. A. Lee-Kirsch, J. Lieberman, The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature immunology* 11, 1005 (Nov, 2010).
- [0189] 10. D. B. Stetson, J. S. Ko, T. Heidmann, R. Medzhitov, Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587 (Aug 22, 2008).
- [0190] 11. Y. J. Crow et al., Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutieres syndrome at the AGS1 locus. *Nature genetics* 38, 917 (Aug, 2006).
- [0191] 12. J. Wu et al., Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826 (Feb 15, 2013).
- [0192] 13. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. J. Chen, Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786 (Feb 15, 2013).
- [0193] 14. P. Gao et al., Cyclic[G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell* 153, 1094 (May 23, 2013).
- [0194] 15. X. Zhang et al., Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Molecular cell*, (Jun 3, 2013).
- [0195] 16. E. J. Diner et al., The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Rep* 3, 1355 (May 30, 2013).
- [0196] 17. A. Ablasser et al., cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide

second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380 (Jun 20, 2013).

[0197] 18. G. N. Barber, Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological reviews* 243, 99 (Sep, 2011).

[0198] 19. D. E. Levy, J. E. Darnell, Jr., Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 651 (Sep, 2002).

[0199] 20. T. Cermak et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39, e82 (Jul, 2011).

[0200] 21. 克隆 #18 在所有 3 个染色体中都具有移码突变。除了移码之外, 克隆 #36 在一条染色体中具有在催化结构域中移除 3 个氨基酸 (215-217) 的 9-bp 的缺失, 而克隆 #94 在一条染色体中具有 12-bp 的缺失并在另一条染色体中具有 18-bp 的缺失, 其分别在催化结构域中移除 4 个氨基酸 (214-217) 和 6 个氨基酸 (212-217)。

[0201] 实施例 5. cGAS-cGAMP 信号在抗病毒防御和免疫佐剂效应中的关键作用

[0202] 微生物 DNA 侵入动物细胞的细胞质引发宿主的有助于清除感染的免疫反应的级联; 然而, 细胞质中的自身 DNA 可引起自身免疫性疾病。生物化学方法鉴定了环 GMP-AMP (cGAMP) 合酶 (cGAS) 为触发天然免疫应答的细胞质 DNA 传感器。本文中, 本发明人表明, 包括成纤维细胞、巨噬细胞和树突细胞的来自 cGAS 缺陷 (cGas^{-/-}) 小鼠的细胞不能产生响应 DNA 转染或 DNA 病毒感染的 I 型干扰素和其它细胞因子。cGas^{-/-} 小鼠比野生型小鼠更易发生单纯性疱疹病毒 -1 (单纯疱疹病毒) 的致死性感染。本发明人还示出, cGAMP 是增强抗原特异性 T 细胞激活和抗体产生的佐剂。

[0203] 外源 DNA 入侵的检测是宿主防御的基本机制。在哺乳动物细胞中, 在细胞质中存在外来的或自身的 DNA 是触发宿主天然免疫应答的危险信号 (1)。通过生化研究, 本发明人最近鉴定了环 GMP-AMP (cGAMP) 合酶 (cGAS) 为触发产生 I 型干扰素和其它炎性细胞因子的细胞质 DNA 的天然免疫传感器 (2, 3)。cGAS 结合 DNA, 而与其序列无关; 此结合激活 cGAS 以催化独特的 cGAMP 异构体的合成, 其包含 2'-5' 和 3'-5' 磷酸二酯键 (4-7)。这一分子 (被称为 2' 3' cGAMP) 的功能为结合并激活衔接蛋白 STING 的第二信使 (3, 7)。然后 STING 激活蛋白激酶 IKK 和 TBK1, 其依次激活转录因子 NF- κ B 和 IRF3 以诱导干扰素和细胞因子 (8)。

[0204] 为了研究 cGAS 的体内功能, 本发明人制备了 cGas 敲除小鼠品系, 其中第一外显子被剪接进 LacZ 盒中, 因此去除了内源基因座的表达 (9)。cGas^{-/-} 小鼠以孟德尔比率出生, 且未表现出任何的明显的发育异常。来自肺成纤维细胞和骨髓衍生的巨噬细胞 (BMDM) 的 RNA 的定量逆转录 PCR (q-RT-PCR) 分析证实了 cGas^{-/-} 细胞在产生 cGas RNA 上有缺陷, 而 cGas^{+/+} 细胞产生了中等水平的 cGas RNA。

[0205] 本发明人从 WT、cGas^{+/+} 和 cGas^{-/-} 小鼠以及 goldenticket (gt/gt) 小鼠 (其具有一个导致 STING 表达缺失的点突变) 中获得肺成纤维细胞 (10)。将不同类型的 DNA (包括鲑鱼精巢 DNA (HT-DNA)、大肠杆菌 DNA 和干扰素刺激 DNA (ISD; 45bp 的双链 DNA) 转染进来自 WT 和 cGas^{+/+} 小鼠的肺成纤维细胞中, 导致稳定产生 IFN β 蛋白 (如通过 ELISA 所测量的) (11)。相比之下, cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} 细胞未能产生任何可检测水平的 IFN β 。聚 [I : C] (已知通过 RIG-I 样受体 (RLR) 通路诱导 IFN β 的双链 RNA 类似物 (12)) 在缺少 cGas

或 Sting 的情况下正常诱导 IFN β 。有趣的是,聚 [dA:dT] (先前表明其通过 RNA 聚合酶 III-RIG-I-MAVS 通路诱导 I 型干扰素 (13,14)) 在 cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} 细胞中正常诱导 IFN β 。q-RT-PCR 分析进一步证实了, cGAS 对通过不同类型的合成或细菌 DNA (除聚 [dA:dT] 之外) 诱导 IFN β RNA 是必要的。时间过程实验表明在 cGas^{-/-} 肺成纤维细胞中经 ISD 的 IFN β 的诱导被完全去除,甚至在 DNA 转染后的早期时间点 (2-8 小时) 时,这表明 cGAS 对于经细胞质 DNA 的 IFN β 诱导而言是必不可少的。

[0206] 为了测量 WT 和 cGas^{-/-} 细胞中 cGAMP 的产生,本发明人进行了生物测定,其在来自 ISD 转染细胞的细胞质提取物中测量 cGAMP 的活性。将提取物在 95°C 加热以变性大多数蛋白 (通过离心去除)。将可能包含 cGAMP 的上清液递送到人类单核细胞系 THP1 (其已被细菌毒素产气荚膜杆菌溶素 -O (PF0) 透化)。然后用非变性凝胶电泳测量 IRF3 的二聚化 (其激活的标志)。此分析表明,来自 WT 而不是 cGas^{-/-} 小鼠的 ISD 转染的肺成纤维细胞的提取物包含 cGAMP 活性,这表明 cGAS 在这些细胞响应细胞质 DNA 催化 cGAMP 合成的过程中具有非冗余的作用。

[0207] 之后,本发明人用 DNA 病毒单纯性疱疹病毒 -1 型 (HSV1)、牛痘病毒 (VACV) 和 HSV1 的突变株 (被称为 d109,其缺失如已知拮抗免疫应答的 ICP0 的病毒蛋白 (15)) 感染肺成纤维细胞。经各个病毒的 IFN β 诱导在 cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} 细胞中大部分被去除,在 cGas^{+/+} 细胞中部分地被抑制。相比之下,经仙台病毒 (已知激活 RIG-I 通路的 RNA 病毒) 的 IFN β 诱导并不受 cGAS 或 Sting 缺失的影响。将 cGAMP 递送进细胞质在 cGas^{-/-} 细胞而不是 Sting^{gt/gt} 细胞中恢复 IFN β 的诱导。类似地,经 DNA 病毒的趋化因子 CXCL10 的诱导依赖于 cGas 和 Sting。IRF3 二聚化的测量表明, cGas^{-/-} 细胞不能响应 HT-DNA 的转染或 WT HSV1 或 HSV1 病毒株 7134 (其也缺乏干扰素拮抗剂 ICP0 (16)) 的感染以激活 IRF3。cGas 缺陷并不影响经仙台病毒的 IRF3 的激活。因此,在小鼠肺成纤维细胞中,经 DNA 病毒而不是 RNA 病毒的 IRF3 的激活和细胞因子的诱导需要 cGAS。

[0208] 来自 cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} 小鼠的 BMDM 在响应 HT-DNA 或 ISD 的转染产生 IFN β 方面有缺陷。类似地,经 VACV 和 HSV1 病毒株 d109 和 7134 的 IFN β 的诱导在 cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} BMDM 中大部分被去除。然而,经 WT HSV1 的 IFN β 的诱导 cGas^{-/-} 或 Sting^{gt/gt} BMDM 中被严重地但未彻底地阻断,这表明这些细胞具有另一种通路,其能部分补偿 cGAS-STING 通路的损失以检测 WT HSV1 感染。BMDM 中 cGAS 或 STING 的缺失不影响经仙台病毒的 IFN β 诱导。动力学实验表明,在整个刺激时间过程中 cGas^{-/-} BMDM 中的经 ISD 和 HSV1-d109 的 IFN β 诱导被去除。与 IFN β 类似,经 HT-DNA 或 ISD 的 TNF α 的诱导在 cGas^{-/-} 或 Sting^{gt/gt} BMDM 中被去除。q-RT-PCR 分析表明,经 HT-DNA 或 ISD 的转染或 HSV1-d109 的感染的 IFN β 、白细胞介素 -6 (IL6) 和 CXCL10RNA 的诱导完全依赖于 cGas 和 Sting。相比之下,经聚 [I:C] 或仙台病毒诱导的这些细胞因子的 RNA 水平不受 cGas 或 Sting 缺失的影响。

[0209] 本发明人通过在包含 GM-CSF 和 Flt3 配体 (Flt3L) 的条件培养基中培养骨髓分别获得常规的树突细胞 (cDC) 和浆细胞样树突细胞 (pDC)。来自 cGas^{-/-} 和 Sting^{gt/gt} 小鼠的包含大量 cDC 的 GM-CSF DC 不能响应 HT-DNA 或 ISD 的转染以诱导 IFN α 或 IFN β 。GM-CSF DC 中 cGAS 或 STING 的缺失去除了经 HSV1-d109 和 VACV 的 IFN β 的诱导,部分抑制了经 WT HSV1 的 IFN β 的诱导。相比之下, cGAS 或 STING 的缺陷并不损害经仙台病毒的 IFN α 或 IFN β 的诱导。q-RT-PCR 实验进一步证实了, cGAS 和 STING 对于经 HT-DNA 或 ISD 的转染

或 HSV1-d109 的感染的 IFN β 、IL6 和 CXCL10RNA 的诱导是必要的,而经聚 [I :C] 或仙台病毒的这些细胞因子的诱导不依赖于 cGAS 或 STING。

[0210] 已知 pDC 表达 TLR9,其负责经合成的包含硫代磷酸酯键的 CpG DNA 诱导 I 型干扰素 (17)。当在存在或缺失脂质体 (Lipofectamine 2000) 的情况下使用 CpG DNA 刺激包含大量的 pDC 的 Flt3L-DC 时,其甚至在 cGas^{-/-}和 Sting^{gt/gt}细胞中诱导 IFN α 和 IFN β 的稳定产生。相比之下,其它形式的 DNA,包括 ISD、聚 [dA :dT] 和来自大肠杆菌和霍乱弧菌的基因组 DNA,在 Flt3L-DC 中仅在脂质体存在的情况下诱导 IFN α ,且这种经各个 DNA 的诱导在缺失 cGAS 或 STING 的情况下被去除。pDC 中经聚 [dA :dT] 的 IFN α 的诱导强烈依赖于 cGAS 和 STING,这表明在这些细胞中 cGAS-STING 通路而不是 Pol-III-RIG-I 通路在传感 DNA 方面发挥了主要作用。来自 cGas^{-/-}和 Sting^{gt/gt}小鼠的 Flt3L-DC 响应经仙台病毒而非 HSV1 的感染诱导 IFN α 和 IFN β 。总之,这些结果证明,cGAS 在树突细胞中负责检测天然 DNA (例如,细菌 DNA) 和 DNA 病毒感染。

[0211] 为了确定 cGAS 在抗 DNA 病毒的体内免疫防御中的作用,本发明人用 HSV1 经静脉内 (i.v) 途径感染 WT 和 cGas^{-/-}小鼠。ELISA 分析表明,WT 小鼠的血清中包含升高水平的 IFN α 和 IFN β ,其分别在 HSV1 感染 (1×10^7 pfu/小鼠) 后 8 小时和 4 小时达到峰值。IFN α 和 IFN β 的水平在由相同感染剂量的 HSV1 感染的 cGas^{-/-}小鼠中严重降低。在一个独立实验中,其中以 1×10^6 pfu/小鼠的感染剂量用 HSV1 感染后监视小鼠的生存率,五分之四的 cGas^{-/-}小鼠在病毒感染后 3 天发展出共济失调和麻痹,并在这些症状出现后数小时死亡。五分之一的 cGas^{-/-}小鼠在感染后第 4 天死亡。五分之三的 WT 小鼠在第 6 天发展出这些症状并在不久后死亡。在感染后第 3 天提取 WT 和 cGas^{-/-}小鼠的脑部以测量病毒滴度,在所有 5 只 cGas^{-/-}小鼠中都检测出高水平的 HSV1,而没有 WT 小鼠在脑部具有可检测水平的 HSV1。在 HSV1 的感染剂量增加至每只小鼠 1×10^7 pfu 的独立实验中观察到了类似的存活曲线和类似的脑部的病毒滴度。cGas^{-/-}小鼠对 HSV1 感染的易感性与 Sting^{gt/gt}小鼠相似,Sting^{gt/gt}小鼠也在血清中具有显著降低的 IFN α 和 IFN β ,并且在 HSV1 感染后 3-4 天内死亡 (18)。

[0212] 本发明人的结果是,在多种细胞类型 (包括抗原呈递细胞) 中,cGAS 对于经细胞质 DNA 的 I 型干扰素的诱导是必要的,这表明 cGAS 产物 (2' 3' cGAMP) 可用于取代 DNA 的免疫刺激效应,这包括 DNA 疫苗的佐剂效应 (19)。为了确定 2' 3' cGAMP 的佐剂效应,本发明人通过肌肉 (i.m) 途径在缺失或存在 2' 3' cGAMP 的情况下将模型蛋白抗原卵白蛋白 (OVA) 注射进 WT 或 Sting^{gt/gt}小鼠中。用相同的抗原制剂在第 10 天对小鼠进行一次强化。ELISA 分析表明,2' 3' cGAMP 在 WT 中于第 17 天强烈增强了 OVA 特异性抗体的产生,而在 Sting^{gt/gt}小鼠中则没有。在 I 型干扰素受体缺陷小鼠 (Ifnar^{-/-}) 中也未观察到 2' 3' cGAMP 的这种佐剂效应。为了研究 2' 3' cGAMP 对 T 细胞激活的影响,将分离自 WT 小鼠的脾白细胞 (其已被 OVA 或 OVA+2' 3' cGAMP 免疫 7 天) 与 OVA 肽 (已知通过 II 类 MHC 分子 I-A^b刺激 CD4T 细胞) 或另一种 OVA 肽 (通过 I 类 MHC 分子 H-2K^b刺激 CD8T 细胞) 培养。用 OVA+2' 3' cGAMP 免疫的 (而不是仅用 OVA 免疫的) 小鼠的 CD4 和 CD8T 细胞在用同源肽刺激后产生升高水平的 IFN γ 和 IL-2。使用由与 H-2K^b复合的 OVA 肽组成的四聚体的流式细胞分析显示,在用 OVA+2' 3' cGAMP 免疫的小鼠中,四聚体阳性 CD8T 细胞的百分比显著增加,这表明 2' 3' cGAMP 刺激带有 OVA 特异性 T 细胞受体的 CD8T 细胞的扩增。总之,这些结果表明,2' 3' cGAMP 的功

能为免疫佐剂,以刺激抗原特异性 T 细胞和 B 细胞应答。

[0213] 本文中,本发明人提供了证据,即 cGAS 对于经 DNA 转染和 DNA 病毒感染的 I 型干扰素和其它炎性细胞因子的诱导是必要的。除聚 [dA :dT] 和 CpG DNA 之外,大多数 DNA 分子,尤其是那些天然存在的(例如,细菌和病毒 DNA),其排他性地通过 cGAS-cGAMP-STING 通路刺激 I 型干扰素。在多种细胞类型(包括成纤维细胞、巨噬细胞和树突细胞)中,经牛痘病毒和数株 HSV1 的 I 型干扰素的诱导完全依赖于 cGAS 和 STING。然而,值得注意的是,经野生型 HSV1 的 IFN β 的诱导在来自 cGas^{-/-}或 Sting^{gt/gt}小鼠的 BMDM 和 GM-CSF DC 中被严重地但未彻底地去除。其它假定的 DNA 传感器如 IFI16 或 DDX41,可能也参与经 WT HSV1 的 IFN β 的剩余的诱导(20,21)。在 cGAS 的情况下,cGas^{-/-}小鼠的表型与 Sting^{-/-}小鼠极其相似(此研究和参考文献 18)。这些结果以及本发明人的示出了 cGAS 是由其结合到一般 DNA 所激活的细胞质酶(2,3)的生化数据正式证明了 cGAS 是激活 STING 的非冗余的且常规的细胞质 DNA 传感器。

[0214] 本发明人示出了,2'3' cGAMP 是增强抗原特异性抗体和 T 细胞应答的产生的有效佐剂。虽然细菌第二信使环二 GMP 和环二 AMP 正被开发为潜在的疫苗佐剂(22),2'3' cGAMP 是与任何的细菌环二核苷酸相比更加强力的 STING 配体(7)。因此,2'3' cGAMP 为下一代预防或治疗人类疾病(包括感染性疾病和癌症)的疫苗提供了有用的佐剂。

[0215] 参考文献和注释

[0216] 1. L. A. O'Neill, Immunology. Sensing the dark side of DNA. Science 339, 763 (Feb 15, 2013).

[0217] 2. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. J. Chen, Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science 339, 786 (Feb 15, 2013).

[0218] 3. J. Wu et al., Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science 339, 826 (Feb 15, 2013).

[0219] 4. A. Ablasser et al., cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. Nature 498, 380 (Jun 20, 2013).

[0220] 5. E. J. Diner et al., The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. Cell Rep 3, 1355 (May 30, 2013).

[0221] 6. P. Gao et al., Cyclic[G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. Cell 153, 1094 (May 23, 2013).

[0222] 7. X. Zhang et al., Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. Molecular cell, (Jun 3, 2013).

[0223] 8. H. Ishikawa, G. N. Barber, The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. Cellular and molecular life sciences: CMLS 68, 1157 (Apr, 2011).

[0224] 9. 通过体外受精使用带有在 cGas/Mb21d1 基因座的靶向插入物的精子制备

cGas^{-/-}小鼠。

[0225] 10. J. D. Sauer et al., The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun* 79, 688 (Feb, 2011).

[0226] 11. D. B. Stetson, R. Medzhitov, Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93 (Jan, 2006).

[0227] 12. M. Yoneyama et al., The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730 (Jul, 2004).

[0228] 13. A. Ablasser et al., RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*, (Jul 16, 2009).

[0229] 14. Y. H. Chiu, J. B. Macmillan, Z. J. Chen, RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576 (Aug 7, 2009).

[0230] 15. L. A. Samanigo, L. Neiderhiser, N. A. DeLuca, Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *Journal of virology* 72, 3307 (Apr, 1998).

[0231] 16. G. T. Melroe, N. A. DeLuca, D. M. Knipe, Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *Journal of virology* 78, 8411 (Aug, 2004).

[0232] 17. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805 (Mar 19, 2010).

[0233] 18. H. Ishikawa, Z. Ma, G. N. Barber, STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788 (Oct 8, 2009).

[0234] 19. C. J. Desmet, K. J. Ishii, Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature reviews. Immunology* 12, 479 (Jul, 2012).

[0235] 20. Z. Zhang et al., The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 12, 959 (Oct, 2011).

[0236] 21. L. Unterholzner et al., IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11, 997 (Nov, 2010).

[0237] 22. W. Chen, R. Kuolee, H. Yan, The potential of 3', 5'-cyclic diguanylic acid(c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine* 28, 3080 (Apr 19, 2010).