



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111566207 A

(43)申请公布日 2020.08.21

(21)申请号 201880068103.8

(22)申请日 2018.08.20

(30)优先权数据

62/547,220 2017.08.18 US

62/611,166 2017.12.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/047084 2018.08.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/036719 EN 2019.02.21

(71)申请人 纽特雷斯股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 托碧昂斯·A·富驰

米格尔·吉姆茨-阿卡兹

约瑟芬·戈贝尔(原名:约瑟芬·贝特灵)

汉娜·恩格勒特

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

代理人 吴立 杨剑

(51)Int.Cl.

C12N 9/22(2006.01)

C12N 9/18(2006.01)

C12N 9/00(2006.01)

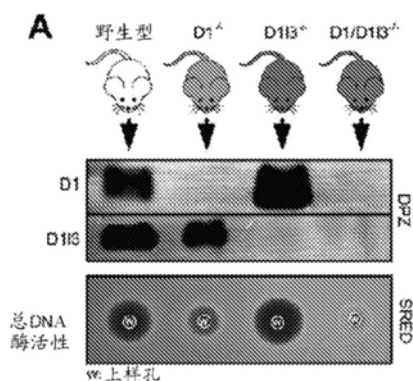
权利要求书11页 说明书55页 附图42页

(54)发明名称

工程化的DNA酶酶及其在疗法中的用途

(57)摘要

本发明提供了可用于治疗以中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚和/或释放为特征的疾患的工程化DNA酶蛋白(包括DNA酶1样3和DNA酶1)。在一些方面,本发明提供了用于预防或治疗牵涉NET的血管闭塞的组合物和方法。如本文所证明,NET参与血管闭塞的非规范机制,所述机制不依赖于纤维蛋白或血小板。



1. 一种DNA酶1样3 (D1L3) 变体,其包含与SEQ ID NO:2定义的酶至少80%同一的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2相比具有一个或多个选自以下的修饰:突变的DNA结合位点或突变的染色质结合位点、糖基化位点、核定位信号失活以及C端尾部的全部或部分缺失。

2. 如权利要求1所述的D1L3变体,其中所述D1L3蛋白变体与SEQ ID NO:2的野生型D1L3蛋白相比,具有增加的蛋白质稳定性、增加的蛋白酶抗性、增加的生物利用率、增加的循环半衰期、更高的在体外表达系统情况下的生产水平和/或基本上相同或更好的DNA和/或染色质和/或NET降解活性。

3. 如权利要求1所述的D1L3变体,其中所述变体与蛋白质或载体部分融合或缀合。

4. 如权利要求1所述的D1L3变体,其中所述变体包含一个或多个NX (T/S) 糖基化共有序列。

5. 如权利要求4所述的D1L3变体,其中所述糖基化共有序列包含D38N取代和N40T或N40S取代,和/或A127N取代和V129T或V129S取代,其氨基酸位置与SEQ ID NO:2相对应。

6. 如权利要求1所述的D1L3变体,其中所述变体包含失活的核定位信号 (NLS)。

7. 如权利要求6所述的D1L3变体,其中NLS因SEQ ID NO:2的NLS1和/或NLS2全部或部分缺失而失活。

8. 如权利要求6所述的D1L3变体,其中NLS因NLS1和/或NLS2内氨基酸的取代和/或缺失而失活。

9. 如权利要求8所述的D1L3变体,其中SEQ ID NO:2的NLS2缺失。

10. 如权利要求1所述的D1L3变体,其包含由SEQ ID NO:33定义的C端尾部的全部或部分缺失,和/或C端尾部中的氨基酸取代。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的D1L3变体,其中所述变体具有至少一个来自DNA酶1 (D1) 的构建嵌段取代。

12. 如权利要求11所述的D1L3变体,其中所述变体在SEQ IDNO:2中具有选自以下的一个或多个构建嵌段取代:M1_A20delinsM RGMKLLGALLALAALLQGAVS、M21_S25delinsLKIAA、V28_S30delinsIQT、E33_S34delinsET、Q36_I45delinsMSNATLVSYI、K47_K50delinsQILS、C52Y、I54_M58delinsIALVQ、I60_K61delinsVR、S63_I70delinsSHLTAVGK、M72_K74delinsLDN、R77_T84delinsQDAP DT、N86H、V88_I89delinsVV、S91_R92delinsEP、N96_T97delinsNS、Q101R、A103L、L105V、K107_L110delinsRPDQ、V113_S116delins AVDS、H118Y、H120D、Y122_A127delinsGCEPCGN、V129T、S131N、I35F_136VdelinsAI、W138R、Q140_H143delinsFSRF、A145_D148delinsAVKD、V150A、I152A、T156_T157delinsAA、E159_S161delinsGDA、K163A、E167A、V169_E170delinsYD、T173L、K176_R178delinsQEK、K180_A181delinsGL、N183_F186delinsDVML、P198_A201delinsRPSQ、K203_N204delinsSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220_E221delinsSA、V225_S228delinsATP、N230H、L238_R239delinsVA、Q241_S246delinsMLLRGA、K250D、N252_V254delinsALP、D256N、K259_A260delinsAA、K262G、T264_E267delinsSDQL、L269_V271delinsQAI、F275Y、F279_K280delinsVM和Q282_S305delinsK。

13. 如权利要求11所述的D1L3变体,其相对于SEQ ID NO:2包含以下氨基酸修饰:F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delins K。

14. 如权利要求11所述的D1L3变体,其相对于SEQ ID NO:2包含以下氨基酸修饰:Q36_

I45delinsMSNATLVSYI。

15. 如权利要求11所述的D1L3变体,其相对于SEQ ID NO:2包含以下氨基酸修饰:Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N。

16. 如权利要求11所述的D1L3变体,其相对于SEQ ID NO:2包含2个或3个选自以下的修饰:F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK、Q36_I45delinsMSNATLVSYI和Y122_A127delinsGCEP CGN/V129T/S131N。

17. 一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列的酶至少80%同一的氨基酸序列,并且包含至少一个来自人DNA酶1的构建嵌段取代。

18. 如权利要求17所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK,并且任选地包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

19. 如权利要求17所述的DNA酶酶,其中所述酶相对于SEQ ID NO:2包含以下修饰:Q36_I45delinsMSNATLVSYI/Y122_A127de linsGCEPCGN/V129T/S131N,并且任选地具有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

20. 一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:2的酶至少80%同一的氨基酸序列,其中所述酶在与SEQ ID NO:2的位置38和/或127相对应的位置处具有天冬酰胺取代,并且所述N38和/或N127天冬酰胺被糖基化。

21. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求1至20中任一项所述的D1L3变体。

22. 一种载体,其包含如权利要求21所述的多核苷酸。

23. 一种宿主细胞,其包含如权利要求22所述的载体。

24. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至20中任一项所述的D1L3变体,根据权利要求21所述的多核苷酸,或根据权利要求22所述的载体,以及药学上可接受的载剂。

25. 如权利要求24所述的药物组合物,其包含配制用于局部,肠胃外或肺部施用的D1L3变体。

26. 如权利要求24所述的药物组合物,其配制用于皮内、肌内、腹膜内、关节内、静脉内、皮下、动脉内、经口、舌下、经肺或透皮。

27. 如权利要求24至26中任一项所述的药物组合物,其包含在非哺乳动物表达系统中产生的D1L3变体。

28. 如权利要求24所述的药物组合物,其中所述非哺乳动物表达系统是巴斯德毕赤酵母。

29. 如权利要求28所述的药物组合物,其中所述巴斯德毕赤酵母编码包含SEQ ID NO:2的野生型人D1L3的信号肽的D1L3变体。

30. 如权利要求24至29中任一项所述的药物组合物,其还包含DNA酶1蛋白或其变体、编码DNA酶1蛋白或其变体的分离的多核苷酸或包含所述分离的多核苷酸的载体。

31. 如权利要求30所述的药物组合物,其包含所述D1L3变体和所述DNA酶1蛋白或其变体,比率(m/m)为100:1至1:100。

32. 如权利要求31所述的药物组合物,其中所述比率为10:1至1:10,并且任选地为约1:1。

33. 一种DNA酶1(D1)变体,其包含与SEQ ID NO:1的酶至少80%同一并且相对于SEQ ID NO:1具有一个或多个修饰的氨基酸序列,所述修饰选自:一个或多个突变的DNA结合位点或

突变的染色质结合位点、突变的肌动蛋白结合位点、突变的糖基化位点、添加核定位信号、添加与SEQ ID NO:2的野生型D1L3蛋白的C端尾部具有至少50%序列同一性的C端尾部;和/或与半衰期延长部分的N端或C端融合。

34.如权利要求33所述的D1变体,其在SEQ ID NO:1中包含一个或多个选自以下的构建嵌段取代:1M_S22delinsMSRELAPLLLL LLSIHSALA、L23_A27delinsMRICS、I30_T32delinsVRS、E35_T36delinsES、M38_I47delinsQEDKNAMDVI、Q49_S52delinsKVIK、Y54C、I56_Q60delinsIILVM、V62_R63delinsIK、S65_K72delinsSNNRIC PI、L74_N76delinsMEK、Q79_T84delinsRNSRRGIT、H86N、V88_V89delinsVI、E91_P92delinsSR、N96_S97delinsNT、R101Q、L103A、V105L、R107_Q110delinsKEKL、A113_S116delinsVKRS、Y118H、D120H、G122_N128delinsYQDGDA、T130S、N132S、A136_I137delinsFV、R139W、F141_F144delinsQSPH、E146_E149delinsAVKD、A151V、V153I、A157_A158delinsTT、G160_A162delinsETS、A164K、A168E、Y170_D171delinsVE、L174T、Q177_K179delinsKHR、G181_L182delinsKA、D184_L187delinsNFIF、R199_Q202delinsPKKA、S204_S205delinsKN、W209R、S211D、T213R、Q215V、P219G、S221_A222delinsQE、A226_P228delinsVKKS、H230N、V238_A239delins LR、M241_A246delinsQEIVSS、D250K、A252_P254delinsNSV、N256D、A259_A260delinsKA、G262K、S264_L267delinsTEEE、Q269_I271delinsLDV、Y275F、V279_M280delinsFK和K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS。

35.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:Q79_T84delinsRNSRRGIT。

36.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR。

37.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:A136_I137delinsFV。

38.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:

R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE。

39.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:A226_P228delinsVKKS。

40.如权利要求34所述的D1变体,其相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:

Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLR KKTKSKRS。

41.一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:1的酶至少80%同一并且包含一个、多个精氨酸和/或赖氨酸残基的取代、插入或添加的氨基酸序列,其中所述DNA酶酶与SEQ ID NO:1的酶相比,具有增加的染色质降解活性。

42.如权利要求41所述的DNA酶酶,其中所述一个或多个精氨酸和/或赖氨酸残基是选自与SEQ ID NO:1的位置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和280相对应的位置处的取代的氨基酸取代。

43.如权利要求41所述的DNA酶酶,其包含两个或更多个精氨酸和/或赖氨酸残基的取代和/或插入。

44.如权利要求43所述的DNA酶酶,其包含三个或更多个精氨酸和/或赖氨酸残基的取

代和/或插入。

45. 如权利要求41至44中任一项所述的DNA酶酶, 其在与SEQ ID NO:1的位置31、49、76、92、109、164、177、201、204和213相对应的一个或多个位置处包含精氨酸或赖氨酸。

46. 如权利要求41所述的DNA酶酶, 其在与SEQ ID NO:1的位置31、49、79和209相对应的位置处包含精氨酸或赖氨酸。

47. 如权利要求41所述的DNA酶酶, 其在与SEQ ID NO:1的位置31、49、79、177、209、262相对应的位置处包含精氨酸或赖氨酸。

48. 如权利要求41所述的DNA酶酶, 其在与SEQ ID NO:1的位置31和227相对应的位置处包含赖氨酸或精氨酸残基。

49. 如权利要求41所述的DNA酶酶, 其中所述酶在与SEQ ID NO:1的位置164相对应的位置处具有赖氨酸或精氨酸。

50. 如权利要求41至49中任一项所述的DNA酶酶, 其相对于SEQ ID NO:1在位置136处包含氨基酸取代, 并且其任选地是A136F。

51. 如权利要求42所述的DNA酶酶, 其包含一个或多个选自以下的氨基酸修饰: 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和K280M, 并且任选地具有产生肌动蛋白抗性的修饰, 其中产生肌动蛋白抗性的修饰相对于SEQ ID NO:1任选地是A136F。

52. 如权利要求42所述的DNA酶酶, 其中如果酶包含Q31R或T227K的取代, 则所述酶包含至少两个选自以下的氨基酸修饰: 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和K280M。

53. 如权利要求52所述的DNA酶酶, 其相对于SEQ ID NO:1包含氨基酸取代Q31R和T227K。

54. 如权利要求51所述的DNA酶酶, 其相对于SEQ ID NO:1包含氨基酸取代A164K。

55. 如权利要求45所述的DNA酶酶, 其包含一个或多个选自以下的氨基酸取代: Q31R、Q49K、N76K、Q79R、P92R、D109K、A164K、Q177K、P200K、S201K、S204R、T213R和G262K。

56. 如权利要求55所述的DNA酶酶, 其包含以下氨基酸取代: Q31R、Q49K、Q79R、A164K和W209R。

57. 如权利要求55所述的DNA酶酶, 其包含以下氨基酸取代: Q31R、Q49K、Q79R、A136F、Q177K、W209R、G262K。

58. 如权利要求48所述的DNA酶酶, 其包含以下氨基酸取代: Q31R、T227K和A136F。

59. 如权利要求49所述的DNA酶酶, 其包含以下氨基酸取代: A164K和A136F。

60. 如权利要求41至59中任一项所述的DNA酶酶, 其中所述酶包含糖基化共有序列, 所述糖基化共有序列相对于SEQ ID NO:1包含N40S取代和/或N128S取代。

61. 如权利要求60所述的DNA酶酶, 其相对于SEQ ID NO:1包含氨基酸取代Q31R、N40S、A136F、N128S和T227K。

62. 如权利要求41至61中任一项所述的DNA酶酶, 其中所述酶与SEQ ID NO:1的酶至少90%同一, 或与SEQ ID NO:1的酶至少约95%同一, 或与SEQ ID NO:1的酶至少约97%同一。

63.一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:1的酶至少80%同一的氨基酸序列,并且包含至少一个来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的构建嵌段取代,其中所述DNA酶酶与SEQ ID NO:1的所述DNA酶酶相比,具有增加的染色质降解活性。

64.如权利要求63所述的DNA酶酶,其中所述酶包含来自SEQ ID NO:2的至少两个相邻的构建嵌段取代。

65.如权利要求63所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代Q79_T84delinsRNSRRGIT,并且任选地包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

66.如权利要求64所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR,并且任选地包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

67.如权利要求63所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代A136_I137delinsFV,并且任选地包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

68.如权利要求64所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE,并且任选地包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

69.如权利要求63所述的DNA酶酶,其中所述酶包含构建嵌段取代A226_P228delinsVKKS,并且任选地包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

70.如权利要求63所述的DNA酶酶,其包含构建嵌段取代Q79_T84delinsRNSRRGIT、H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR、A136_I137delinsFV、R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE、A226_P228delinsVKKS,并且任选地包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

71.如权利要求41至70中任一项所述的DNA酶酶,其包含构建嵌段取代Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKKTskRS。

72.如权利要求41至71中任一项所述的DNA酶酶,其中所述酶表现出一种或多种选自以下的特性:与SEQ ID NO:1的酶相比对无蛋白DNA相似或更高的亲和力,与SEQ ID NO:1的酶相比更高的染色质降解活性,与SEQ ID NO:1的酶相比对肌动蛋白抑制具有抗性的酶促活性,及其组合。

73.一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:15至少95%同一的氨基酸序列。

74.一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求41至73中任一项所述的DNA酶酶。

75.一种载体,其包含根据权利要求74所述的多核苷酸。

76.一种宿主细胞,其包含根据权利要求75所述的载体。

77.一种药物组合物,其包含如权利要求41至73中任一项所述的酶,根据权利要求74所述的分离的多核苷酸或根据权利要求75所述的载体,以及药学上可接受的载剂。

78.如权利要求77所述的药物组合物,其包含配制用于肠胃外或肺部施用的所述DNA酶酶。

79.如权利要求77所述的药物组合物,其配制用于皮内、肌肉、腹膜内、关节内、静脉内、皮下、动脉内、经口、舌下、肺部、局部或透皮施用。

80.如权利要求77所述的药物组合物,其中所述酶在中国仓鼠卵巢细胞中产生。

81.如权利要求77所述的药物组合物,其中所述酶是非糖基化的并且在非哺乳动物表达系统中产生。

82. 如权利要求81所述的药物组合物,其中所述非哺乳动物表达系统是巴斯德毕赤酵母。

83. 如权利要求82所述的药物组合物,其中所述巴斯德毕赤酵母编码所述酶,以及SEQ ID NO:1的信号肽。

84. 如权利要求77至83中任一项所述的药物组合物,其还包含DNA酶1样3蛋白(D1L3)或其变体。

85. 一种用于治疗需要胞外DNA降解、胞外染色质降解、胞外诱捕网(ET)降解和/或中性粒细胞胞外诱捕网(NET)降解的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的根据权利要求1至16中任一项所述的D1L3变体,或根据权利要求17至20中任一项所述的DNA酶酶,或如权利要求24至32中任一项所述的组合物,或根据权利要求33至40中任一项所述的D1变体,或根据权利要求41至73中任一项所述的DNA酶酶,或如权利要求77至84中任一项所述的组合物。

86. 如权利要求85所述的方法,其中在治疗后,所述受试者表现出胞外DNA降解、胞外染色质降解、胞外诱捕网(ET)降解和/或中性粒细胞胞外诱捕网(NET)降解。

87. 如权利要求85或86所述的方法,其中所述受试者患有慢性或急性炎症性疾病。

88. 如权利要求85或86所述的方法,其中所述受试者患有急性或慢性感染。

89. 如权利要求85至88中任一项所述的方法,其中所述受试者患有包含NET的血管闭塞或处于所述血管闭塞的风险中。

90. 如权利要求85所述的方法,其中所述受试者患有慢性中性粒细胞增多症(例如,中性粒细胞数目增加)、中性粒细胞聚集和白细胞淤滞、血栓形成和血管闭塞(例如,镰状细胞病)、缺血-再灌注损伤(例如,中肠扭转、睾丸扭转、肢体缺血再灌注、重要器官缺血再灌注、器官移植)、手术和创伤性组织损伤、急性或慢性炎症性响应或疾病、自身免疫性疾病(例如,全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、脉管炎、全身性硬化症)、心血管疾病(例如,心肌梗塞、中风、动脉粥样硬化、静脉血栓栓塞症,包括溶血栓疗法)、代谢性疾病(例如,糖尿病)、全身炎症(例如,全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和血栓形成性微血管病(TMA))、呼吸道炎症性疾病(例如,囊肿性纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性肺损伤(ALI)、烟致肺损伤、输血诱发的肺损伤(TRALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和哮喘、肺膨胀不全、支气管炎、积脓)、肾脏炎症性疾病(急性和慢性肾病,包括急性肾损伤(AKI)和慢性肾脏病(CKD))、与移植组织相关的炎症性疾病(例如,移植物抗宿主病)和癌症(例如,白血病、肿瘤转移和实体瘤)。

91. 如权利要求85至90中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或组合物经静脉内、动脉内、关节内、肌内、皮下、局部施用或通过肺部施用。

92. 如权利要求85所述的方法,其中所述受试者在导管系统中患有具有导管闭塞或处于导管闭塞的风险中。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述导管系统是胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述受试者患有胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。

95. 如权利要求90至94中任一项所述的方法,其中所述DNA酶酶通过静脉内、动脉内或腹膜内施用来施用。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述受试者患有原发性硬化性胆管炎。

97. 如权利要求85所述的方法,其中所述受试者在内皮表面(例如,手术粘连)、皮肤(例如,创伤/瘢痕、溃疡)上,或在滑膜关节(例如,痛风、关节炎)中具有NET积聚或处于NET积聚风险中。

98. 如权利要求97所述的方法,其中所述受试者已经或正在接受侵入性医疗程序,并且处于手术粘连的风险中。

99. 如权利要求98所述的方法,其中所述DNA酶疗法在手术期间施用以预防或抑制手术粘连的形成。

100. 如权利要求97所述的方法,其中将所述DNA酶疗法局部施用于所述皮肤以预防或治疗创伤和/或瘢痕。

101. 如权利要求97所述的方法,其中将所述DNA酶疗法施用于滑膜关节以预防或治疗痛风和关节炎。

102. 如权利要求85所述的方法,其中所述受试者患有血栓形成、中风、脓毒症、肺损伤、动脉粥样硬化、病毒感染、镰状细胞病、心肌梗塞、耳部感染、创伤愈合、肝损伤、心内膜炎、肝脏感染、胰腺炎、原发性移植物功能障碍、肢体缺血再灌注、肾脏损伤、凝血、明矾诱发的炎症、肝肾损伤、胸膜渗出物、血胸、胆道内血块、后气动贫血、溃疡、耳鼻喉科疾患、口腔感染、轻伤、鼻窦炎、术后鼻整形、不育、膀胱导管、创伤清洁、皮肤反应测试、肺炎球菌性脑膜炎、痛风、腿部溃疡、囊性纤维化、卡塔格内综合征、哮喘、肺叶膨胀不全、慢性支气管炎、支气管扩张、狼疮、原发性纤毛运动障碍、细支气管炎、脓胸、胸膜感染、癌症、干眼病、下呼吸道感染、慢性血肿、阿尔茨海默氏病和阻塞性肺病。

103. 如权利要求85至102中任一项所述的方法,其中所述受试者还表现出冠状动脉疾病。

104. 如权利要求102所述的方法,其中所述受试者患有囊性纤维化。

105. 如权利要求85至104中任一项所述的方法,其包括监测来自所述受试者的血液、血浆或血清的NET降解活性。

106. 一种用于治疗表现出涉及NET的血管内闭塞或处于涉及NET的血管内闭塞的风险中的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体,和/或治疗有效量的D1或其变体。

107. 如权利要求106所述的方法,其中向所述受试者施用包含与SEQ ID NO:2所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶。

108. 如权利要求107所述的方法,其中所述酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序列。

109. 一种用于治疗在导管系统中具有导管闭塞或处于导管闭塞风险中的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的D1L3或其变体,和/或治疗有效量的D1或其变体。

110. 如权利要求109所述的方法,其中向所述受试者施用包含与SEQ ID NO:2所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶,和/或包含与SEQ ID NO:1所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶。

111. 如权利要求110所述的方法,其中所述酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序列,和/或包含由SEQ ID NO:1定义的酶的氨基酸序列。

112. 如权利要求109至111中任一项所述的方法,其中所述导管系统是胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。

113. 如权利要求109至112中任一项所述的方法,其中所述受试者患有胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。

114. 如权利要求109至113中任一项所述的方法,其中所述DNA酶酶通过静脉内、动脉内或腹膜内施用来施用。

115. 如权利要求114所述的方法,其中所述受试者患有原发性硬化性胆管炎。

116. 一种用于治疗需要胞外DNA降解、胞外染色质降解、胞外诱捕网 (ET) 降解和/或中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 降解的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体和D1或其变体。

117. 如权利要求116所述的方法,其中所述D1L3或其变体以及所述D1或其变体以单一药物组合物或单独的药物组合物施用,并且其中D1L3或其变体与D1或其变体的比率任选地在按质量计100:1至1:100,按质量计10:1至1:10的范围内,并且任选地为约1:1。

118. 如权利要求117所述的方法,其中在治疗后,所述受试者表现出胞外DNA降解、胞外染色质降解、胞外诱捕网 (ET) 降解和/或中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 降解。

119. 如权利要求116至118中任一项所述的方法,其中所述受试者患有慢性或急性炎症病症。

120. 如权利要求116至118中任一项所述的方法,其中所述受试者患有急性或慢性感染。

121. 如权利要求116至120中任一项所述的方法,其中受试者患有包含NET的血管闭塞或处于包含NET的血管闭塞的风险中。

122. 如权利要求116或117所述的方法,其中所述受试者患有慢性中性粒细胞增多症(例如,中性粒细胞数目增加)、中性粒细胞聚集和白细胞淤滞、血栓形成和血管闭塞(例如,镰状细胞病)、缺血-再灌注损伤(例如,中肠扭转、睾丸扭转、肢体缺血再灌注、重要器官缺血再灌注、器官移植)、手术和创伤性组织损伤、急性或慢性炎症反应或疾病、自身免疫性疾病(例如,全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、脉管炎、全身性硬化症)、心血管疾病(例如,心肌梗塞、中风、动脉粥样硬化、静脉血栓栓塞症,包括溶血栓疗法)、代谢性疾病(例如,糖尿病)、全身炎症(例如,全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和血栓形成性微血管病(TMA))、呼吸道炎症性疾病(例如,囊肿性纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性肺损伤(ALI)、烟致肺损伤、输血诱发的肺损伤(TRALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和哮喘、肺膨胀不全、支气管炎、积脓)、肾脏炎症性疾病(急性和慢性肾病,包括急性肾损伤(AKI)和慢性肾脏病(CKD))、与移植组织相关的炎症性疾病(例如,移植抗宿主病)和癌症(例如,白血病、肿瘤转移和实体瘤)。

123. 如权利要求116至122中任一项所述的方法,其中所述D1L3或其变体和所述D1或其变体中的每一种通过独立地选自静脉内、动脉内、关节内、肌肉内、皮下、局部和肺部施用的途径来施用。

124. 如权利要求123所述的方法, 其中所述受试者在导管系统中具有导管闭塞或处于导管闭塞的风险中。

125. 如权利要求124所述的方法, 其中所述导管系统是胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。

126. 如权利要求125所述的方法, 其中所述受试者患有胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。

127. 如权利要求124至126中任一项所述的方法, 其中所述DNA酶酶作为通过静脉内、动脉内、腹膜内或施用来施用的单一组合物施用。

128. 如权利要求127所述的方法, 其中所述受试者患有原发性硬化性胆管炎。

129. 如权利要求116至118中任一项所述的方法, 其中所述受试者在内皮表面、皮肤上或在滑膜关节中具有NET积聚或处于NET积聚的风险中。

130. 如权利要求129所述的方法, 其中所述受试者已经或正在接受侵入性医疗程序, 并且处于手术粘连的风险中。

131. 如权利要求130所述的方法, 其中所述DNA酶疗法在手术期间施用以预防或抑制手术粘连的形成。

132. 如权利要求129所述的方法, 其中将所述DNA酶疗法局部施用于所述皮肤以预防或治疗创伤和/或瘢痕。

133. 如权利要求129所述的方法, 其中将所述DNA酶疗法施用于滑膜关节以预防或治疗痛风和关节炎。

134. 如权利要求116至118中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有血栓形成、中风、脓毒症、肺损伤、动脉粥样硬化、病毒感染、镰状细胞病、心肌梗塞、耳部感染、创伤愈合、肝损伤、心内膜炎、肝脏感染、胰腺炎、原发性移植物功能障碍、肢体缺血再灌注、肾脏损伤、凝血、明矾诱发的炎症、肝肾损伤、胸膜渗出物、血胸、胆道内血块、后气动贫血、溃疡、耳鼻喉科疾患、口腔感染、轻伤、鼻窦炎、术后鼻整形、不育、膀胱导管、创伤清洁、皮肤反应测试、肺炎球菌性脑膜炎、痛风、腿部溃疡、囊性纤维化、卡塔格内综合征、哮喘、肺叶膨胀不全、慢性支气管炎、支气管扩张、狼疮、原发性纤毛运动障碍、细支气管炎、脓胸、胸膜感染、癌症、干眼病、下呼吸道感染、慢性血肿、阿尔茨海默氏病和阻塞性肺病。

135. 如权利要求116至134中任一项所述的方法, 其中所述受试者还表现出冠状动脉疾病。

136. 如权利要求134所述的方法, 其中所述受试者患有囊性纤维化。

137. 如权利要求116至136中任一项所述的方法, 其包括监测来自所述受试者的血液、血浆或血清的NET降解活性。

138. 一种用于治疗表现出涉及NET的血管内闭塞或处于涉及NET的血管内闭塞的风险中的受试者的方法, 所述方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体, 和/或治疗有效量的D1或其变体。

139. 如权利要求138所述的方法, 其中向所述受试者施用包含与SEQ ID NO:2所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶。

140. 如权利要求139所述的方法, 其中所述酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序

列。

141. 一种用于治疗在导管系统中具有导管闭塞或处于导管闭塞风险中的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的D1L3或其变体,和/或治疗有效量的D1或其变体。

142. 如权利要求141所述的方法,其中向所述受试者施用包含与SEQ ID NO:2所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶,和/或包含与SEQ ID NO:1所定义的酶具有80%或更高序列同一性的氨基酸序列的酶。

143. 如权利要求142所述的方法,其中所述酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序列,和/或由SEQ ID NO:1定义的酶的氨基酸序列。

144. 如权利要求141至143中任一项所述的方法,其中所述导管系统是胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。

145. 如权利要求141至143中任一项所述的方法,其中所述受试者患有胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。

146. 如权利要求141至145中任一项所述的方法,其中所述DNA酶酶通过静脉内、动脉内或腹膜内施用来施用。

147. 如权利要求146所述的方法,其中所述受试者患有原发性硬化性胆管炎。

148. 一种制备用于减少中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚的药物组合物的方法,其包括:提供在DNA酶1和DNA酶1样3活性方面有缺陷的遗传修饰小鼠,并表达异源G-CSF多核苷酸或用微生物化合物重复刺激,其中所述遗传修饰小鼠积聚NET;施用候选NET抑制剂或候选DNA酶酶;选择减少所述NET积聚的NET抑制剂或DNA酶酶;并且配制所述NET抑制剂或DNA酶酶用于向人类患者施用。

149. 如权利要求148所述的方法,其中将所述组合物配制成用于肠胃外或肺部施用。

150. 如权利要求148所述的方法,其经配制用于静脉内、动脉内、关节内、肌内、皮下、局部或肺部施用。

151. 如权利要求148所述的方法,其中所述遗传修饰的小鼠在肝细胞中表达异源G-CSF多核苷酸。

152. 一种用于重组产生选自人D1、人D1L3或其变体的DNA酶酶的方法,其包括:培养编码具有天然信号肽的所述DNA酶酶的巴斯德毕赤酵母宿主细胞;并从培养基中回收所述DNA酶酶。

153. 如权利要求152所述的方法,其中所述DNA酶酶是与SEQ ID NO:2的酶具有至少80%序列同一性的人D1L3或其变体。

154. 如权利要求153所述的方法,其中所述DNA酶酶是人D1L3。

155. 一种用于DNA酶酶工程化的方法,其包括:

提供供体和受体DNA酶酶的蛋白-蛋白比对;

鉴定用于转移的可变氨基酸序列,在所述供体和受体DNA酶酶中所述可变氨基酸的侧翼是一个或多个保守性氨基酸;用所述供体DNA酶的可变氨基酸取代所述受体DNA酶的可变氨基酸以产生嵌合DNA酶;重组产生所述嵌合DNA酶。

156. 如权利要求155所述的方法,其中所述DNA酶酶选自人D1、由SEQ ID NO:38定义的人DNA酶1样1(D1L1)、由SEQ ID NO:39定义的人DNA酶1样2(D1L2)以及人D1L3。

157. 如权利要求155或156所述的方法,其中所述构建嵌段取代具有至少两个氨基酸,或至少三个氨基酸,或至少四个氨基酸,或至少五个氨基酸。

工程化的DNA酶酶及其在疗法中的用途

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2017年12月28日提交的美国申请第62/611,166号和2017年8月18日提交的美国申请第62/547,220号,每个美国申请特此通过引用整体并入。

[0003] 发明背景

[0004] 炎症是控制入侵微生物和治愈受损组织必不可少的宿主响应。在多种炎症病症中不受控制的且持续性炎症会导致组织损伤。中性粒细胞是急性炎症中的主要白细胞。在感染期间,中性粒细胞会产生中性粒细胞胞外诱捕网(NET),即装饰有毒性组蛋白及固定并中和细菌的酶的DNA细丝网格。NET在宿主防御中的相关性通过以下事实得以说明:胞外DNA酶在几种致病细菌中充当毒力因子。然而,释放不当的NET可能因其细胞毒性、促炎性和促血栓形成活性而损害宿主细胞。实际上,NET经常与炎症或缺血性器官损伤相关,并且在各种动物模型中DNA酶的治疗性输注限制了宿主损伤。

[0005] 胞外诱捕网(ET)的形成不限于中性粒细胞,因为其他白细胞(即单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞和肥大细胞)也会释放ET。此外,癌细胞(包括急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞)和受损的内皮细胞也可以暴露出具有ET样特征的DNA细丝。

[0006] 对于宿主如何降解体内的NET以限制炎症发作期间的组织损伤知之甚少。已证实血清中的DNA酶1(D1)会消化体外NET的DNA骨架。已经鉴定了其他胞外DNA酶,包括循环中的DNA酶1样3(D1L3),其可以消化胞外微粒相关的染色质。

[0007] D1和D1L3与DNA酶1样1(D1L1)和DNA酶1样2(D1L2)一起形成DNA酶1蛋白家族,其是在人类中表达的并且为NET相关疾病提供了药物候选物的一类同源分泌性DNA酶酶。然而,这些酶的物理、酶促和药代动力学特性对于治疗而言并不理想。

[0008] 本发明提供了工程化的DNA酶,包括DNA酶1样3和DNA酶1,用于治疗,包括用于预防或治疗可因急性炎症发作期间NET释放而引起的血管闭塞。

发明内容

[0009] 本发明提供了可用于治疗以中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚和/或释放为特征的疾患的工程化的DNA酶蛋白(包括DNA酶1样3和DNA酶1)。在一些方面,本发明提供了用于预防或治疗牵涉NET的血管闭塞的组合物和方法。如本文所证明,NET参与血管闭塞的非规范机制,所述机制不依赖于纤维蛋白和血小板。

[0010] 在一些方面,本发明提供了经工程化为具有更适于治疗,例如减少或预防受试者中的NET积聚的物理、药效学和/或酶促特性的DNA酶1样3(D1L3)变体。在一些实施方案中,D1L3酶在制造方面具有优势,提供了适合用于治疗的重组酶的产生。在各种实施方案中,本发明提供了重组D1L3变体,其包含导致一个或多个糖基化、核定位信号失活和/或C端尾部全部或部分缺失的一个或多个氨基酸改变。

[0011] 在各种实施方案中,与野生型D1L3蛋白相比,D1L3蛋白变体具有增加的蛋白质稳定性、增加的对蛋白酶抑制的抗性、增加的生物利用率以及基本上相同或更好的DNA和/或染色质和/或NET降解活性(体外或体内)。在各种实施方案中,D1L3变体相对于野生型D1L3

(例如,SEQ ID NO:2)包含以下一种或多种特性:相同或基本上相同(或更高)的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性,相同或基本上相同(或更高)的染色体DNA(染色质)降解活性,蛋白酶抗性,增加的循环半衰期以及更高的在体外表达系统(例如中国仓鼠卵巢细胞和/或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))中的生产水平。

[0012] 在一些实施方案中,D1L3变体包括来自人DNA酶1(SEQ ID NO:1)的一个或多个嵌段取代(block substitution),在本文中描述为构建嵌段取代(building block substitution)。

[0013] 在一些方面,本发明提供了经工程化为具有更适于治疗,例如减少或预防受试者中的NET积聚的物理、药效学和/或酶促特性的DNA酶1(D1)变体。在一些实施方案中,D1酶在制造方面具有优势,提供了适合用于治疗的重组酶的生产。在各种实施方案中,工程化D1变体包含与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的成熟酶至少80%同一的氨基酸序列,具有一个或多个氨基酸取代、添加(包括插入)或缺失,产生以下的一种或多种:突变的DNA结合位点、突变的染色质结合位点、突变的肌动蛋白结合位点、突变的糖基化位点、核定位信号(例如,与D1L3的NLS1或NLS2具有相似性或同一性)的添加和/或与D1L3的C端尾部相似或同一的C端结构域。

[0014] 在各种实施方案中,将D1变体工程化为相对于野生型酶包括以下一种或多种特征:相同或更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性、更高的染色体DNA(染色质)降解活性、相似或提高的蛋白酶抗性、肌动蛋白抗性、相似或提高的从血液向尿液和/或胆汁的渗透,以及更高的在体外表达系统(例如中国仓鼠卵巢细胞和/或巴斯德毕赤酵母)中的生产水平。

[0015] 本文所述的D1变体可以具有点突变的组合,包括添加阳离子残基,和/或可以包含来自D1L3(SEQ ID NO:2)的一个或多个嵌段取代。此类嵌段取代在本文中有描述,并且称为“构建嵌段取代”。

[0016] 在一些方面,本发明提供了药物组合物,其包含D1L3和/或D1变体,或编码所述变体的多核苷酸或载体,以及药学上可接受的载剂。在各种实施方案中,将组合物配制用于肠胃外或肺部施用。在一些实施方案中,将组合物配制用于静脉内、动脉内、腹膜内、关节内、肌内、局部或皮下施用。在一些实施方案中,该组合物包含D1L3和D1两者,其各自任选地是本文所述的工程化变体。在一些实施方案中,该组合物包含含有来自D1和D1L3的嵌段序列的嵌合蛋白。在图31中示出了D1和D1L3之间的示例性嵌段取代。

[0017] 在其他方面,本发明提供通过产生嵌合序列,进行DNA酶工程化的方法。例如,在这些方面,该方法包括提供供体和受体DNA酶酶的蛋白-蛋白比对;鉴定用于转移的可变氨基酸序列(“构建嵌段”)。在供体和受体DNA酶酶中所述一个或多个可变氨基酸的侧翼是一个或多个保守性氨基酸(在构建嵌段的上游和下游)。这些构建嵌段可以在受体蛋白和供体蛋白之间交换。然后重组产生嵌合酶。

[0018] 在其他方面,本发明提供了制备用于减少或预防中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚的药物组合物的方法。在这些实施方案中,本发明采用了在D1和D1L3活性和G-CSF多核苷酸的异源表达(例如,在肝细胞中)或诱导持续的内源性G-CSF表达(例如,通过重复施用微生物化合物)方面有缺陷的遗传修饰小鼠。该小鼠模型积聚NET,并迅速发展NET相关的血管闭塞。在这些实施方案中,本发明包括向遗传修饰小鼠施用候选NET抑制剂或候选DNA酶酶(包括根据本公开的D1L3或D1变体),并选择减少NET积聚的NET抑制剂或DNA酶酶。将选

定的抑制剂或酶配制成用于向人类患者施用。

[0019] 在一些方面,本发明提供了一种用于治疗需要中性粒细胞胞外诱捕网(NET)降解的受试者的方法。该方法包括施用治疗有效量的根据本公开的D1L3和/或D1和/或其变体。D1L3或D1变体可以作为药物组合物施用,所述药物组合物包含重组蛋白,或在一些实施方案中,包含编码DNA或RNA,或在一些实施方案中,包含含有编码DNA或RNA的载体。

[0020] 在各种实施方案中,本发明涉及以NET的存在或积聚为特征的疾病或疾患的治疗。此类疾病或疾患包括但不限于与以下相关的疾病:慢性中性粒细胞增多症(例如,中性粒细胞数目增加)、中性粒细胞聚集和白细胞淤滞、血栓形成和血管闭塞(例如,镰状细胞病)、缺血-再灌注损伤(例如,中肠扭转、睾丸扭转、肢体缺血再灌注、重要器官缺血再灌注、器官移植)、手术和创伤性组织损伤、急性或慢性炎性响应或疾病、自身免疫性疾病(例如,全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、脉管炎、全身性硬化症)、心血管疾病(例如,心肌梗塞、中风、动脉粥样硬化、静脉血栓栓塞症,包括溶血栓疗法)、代谢性疾病(例如,糖尿病)、全身炎症(例如,全身炎性响应综合征(SIRS)、脓毒症、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和血栓形成性微血管病(TMA))、呼吸道炎性疾病(例如,囊肿性纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性肺损伤(ALI)、烟致肺损伤、输血诱发的肺损伤(TRALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和哮喘、肺膨胀不全、支气管炎、积脓)、肾脏炎性疾病(急性和慢性肾病,包括急性肾损伤(AKI)和慢性肾脏病(CKD))、与移植组织相关的炎性疾病(例如,移植物抗宿主病)和癌症(例如,白血病、肿瘤转移和实体瘤)。

[0021] 在一些实施方案中,所述受试者在导管系统中患有导管闭塞或处于所述导管闭塞的风险中。导管系统或含有导管系统的器官或组织的非限制性实例包括胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。因而,本发明可用于治疗患有胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病的受试者。

[0022] 在其他实施方案中,所述受试者在内皮表面(例如,手术粘连)、皮肤(例如,创伤/瘢痕、溃疡)上,或在滑膜关节(例如,痛风、关节炎)中具有NET积聚或处于NET积聚风险中。例如,NET可造成手术粘连,例如在侵入性医疗程序之后。本发明可以在手术期间施用以预防或抑制手术粘连的形成。在一些情况下,本文概述的D1、D1L3(包括其变体)或D1和D1L3(或其变体)的组合可以局部施用于皮肤以预防或治疗创伤和/或瘢痕。在其他情况下,可以将本文概述的D1、D1L3或其变体或其组合施用于滑膜关节以预防或治疗痛风和关节炎。

[0023] 在一些实施方案中,受试者患有包含NET的血管闭塞或处于所述血管闭塞的风险中。

[0024] 在各种实施方案中,本发明涉及可用DNA酶酶(包括D1和链道酶)治疗的疾病的治疗。此类疾病或疾患包括血栓形成、中风、脓毒症、肺损伤、动脉粥样硬化、病毒感染、镰状细胞病、心肌梗塞、耳部感染、创伤愈合、肝损伤、心内膜炎、肝脏感染、胰腺炎、原发性移植功能障碍、肢体缺血再灌注、肾脏损伤、凝血、明矾诱发的炎症、肝肾损伤、胸膜渗出物、血胸、胆道内血块、后气动贫血、溃疡、耳鼻喉科疾患、口腔感染、轻伤、鼻窦炎、术后鼻整形、不育、膀胱导管、创伤清洁、皮肤反应测试、肺炎球菌性脑膜炎、痛风、腿部溃疡、囊性纤维化、卡塔格内综合征、哮喘、肺叶膨胀不全、慢性支气管炎、支气管扩张、狼疮、原发性纤毛运动障碍、细支气管炎、脓胸、胸膜感染、癌症、干眼病、下呼吸道感染、慢性血肿、阿尔茨海默氏

病和阻塞性肺病。

[0025] 在其他实施方案中,本发明提供了使用非哺乳动物表达系统诸如巴斯德毕赤酵母重组产生D1或D1L3或其变体的方法。在一些实施方案中,巴斯德毕赤酵母编码具有天然信号肽的DNA酶酶,天然信号肽允许从宿主细胞中分泌。

[0026] 本发明的其他目的、实施方案和优点在以下的具体实施方式中显而易见。

附图说明

[0027] 图1A-图1F说明了循环中的DNA酶1和DNA酶113降解体外NET,并表征了来自于WT、DNA酶1^{-/-} (D1^{-/-})、DNA酶113^{-/-} (D1L3^{-/-})、DNA酶1/DNA酶113^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}) 小鼠的血清的DNA降解活性。图1A提供了通过酶谱测定DPZ和SRED对DNA酶1 (D1)、DNA酶113 (D1L3) 和总DNA酶活性的检测。图1B提供了图像并且图1C提供了在用来自指定基因型 (N=6) 的血清一起孵育后体外生成的NET的DNA染色的定量。比例尺:50 μ m。图1C示出了来自于稳定表达具有DNA酶1 (D1)、DNA酶113 (D1L3) 的质粒或对照质粒 (Ctrl) 的D1/D1L3^{-/-}小鼠的血清的DPZ和SRED分析。图1E示出了图像并且图1F示出了在用缓冲液或来自于表达D1、D1L3或Ctrl的D1/D1L3^{-/-}小鼠 (N=5) 的血清一起孵育后体外生成的NET的DNA染色的定量。比例尺:50 μ m。图像代表两个或更多个独立实验。统计数据:(图1C和图1F) 单向ANOVA, 然后进行Bonferroni多重比较后检验;与所有其他组相比, $\$P<0.001$ 。

[0028] 图2A-图2I说明DNA酶1或DNA酶113是耐受慢性中性粒细胞增多症所需的。通过注射G-CSF表达质粒 (CSF3) 诱导慢性中性粒细胞增多症。对照接受空质粒 (Ctrl)。图2A示出了2周后WT小鼠和对照 (N=3-6) 的血液中性粒细胞计数。图2B示出了1周后,来自WT小鼠 (N=3) 的血液涂片DNA染色中的NET样结构 (箭头)。比例尺:20 μ m。图2C示出了WT (N=7)、DNA酶1^{-/-} (D1^{-/-}, N=6)、DNA酶113^{-/-} (D1L3^{-/-}, N=6)、DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠 (D1/D1L3^{-/-}, N=6) 和对照 (Ctrl, N=4) 的存活率。图2D示出了共表达CSF3与DNA酶1 (CSF3/D1, N=5)、DNA酶113 (CSF3/D1L3, N=6) 和对照 (CSF3/Ctrl, N=4) 的D1/D1L3^{-/-}小鼠的存活率。图2E-2I表征了慢性中性粒细胞增多症期间的死亡率 (N=4)。图2E示出了外周体温的变化。图2F提供了血浆和尿液的照片。图2G提供了血液中血红蛋白的浓度。图2H提供了血液涂片的图像。箭头指向裂红细胞。比例尺:20 μ m。图2I示出了血浆中的LDH浓度。UT:未处理的小鼠 (N=5-6)。图像代表三只或更多只小鼠。统计数据:(图2A、2H、2I) 单向和 (图2E) 双向ANOVA, 然后进行Bonferroni多重比较后检验, (图2B) 学生t检验, (图2C、2D) 对数秩检验;与所有其他组或基线 (BL) 相比, $\#P<0.01$, $\$P<0.001$ 。

[0029] 图3A-图3G说明DNA酶1和DNA酶113预防慢性中性粒细胞增多症期间由NET凝块引起的血管闭塞。对共表达CSF3与DNA酶1 (CSF3/D1, N=4)、DNA酶113 (CSF3/D1L3, N=4) 或对照质粒 (CSF3/Ctrl, N=4) 的DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠 (D1/D1L3^{-/-}) 的组织学分析提供了肺部的苏木精和伊红染色 (H&E)。比例尺:500 μ m (概观)、25 μ m (细节)。图3B示出了肺部中每个视野 (FOV) 中苏木精阳性凝块所闭塞的血管的定量。未经处理的WT小鼠 (UTWT, N=4)、未经处理的D1/D1L3^{-/-}小鼠 (UT; N=4)。图3C示出了闭塞血管针对中性粒细胞标志物髓过氧化物酶 (MPO) 和染色质的免疫染色。图3D和3E示出了对冯维勒布兰德因子 (vWF)、纤维蛋白和DNA的免疫染色。检测到三种类型的NET凝块 (α , vWF+/纤维蛋白-; β , vWF+/纤维蛋白+; γ , vWF-/纤维蛋白-)。图3F提供了NET凝块中vWF和纤维蛋白的定量。数据示为平均值 $\pm$ SD, n=

108。图3G示出了用IgG (N=4)、抗血小板-IgG (N=5) 和比加群酯 (N=5) 处理的表达CSF3的D1/D1L3-/-小鼠的存活率。比例尺:50 μ m。图像代表三只或更多只小鼠。(图3C、3D、3E) 虚线表示血管壁。统计数据:(图3B) 单向ANOVA, 然后是Bonferroni多重比较后检验;与所有其他组相比, $\$P<0.001$, (图3G) 对数秩检验;抗血小板IgG或达比加群相比于IgG, $P>0.05$ 。

[0030] 图4A-图4I说明DNA酶1和DNA酶113防御败血病中的宿主损伤。将WT小鼠 (N=5) 和具有DNA酶1和DNA酶113组合缺陷 (D1/D1L3-/-) 的表达DNA酶1 (D1, N=7)、DNA酶113 (D1L3, N=8) 或对照质粒 (Ctrl, N=11) 的小鼠用脂多糖和热灭活大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 进行处理以诱发败血病。图4A示出了败血病小鼠的存活时间。图4B示出了血液中血红蛋白的浓度。图4C示出了血浆和尿液的照片。图4D提供了血浆中的LDH浓度。图4E示出了血液中每个视野 (FOV) 的裂红细胞的定量。图4F示出了肺部每个FOV中闭塞血管的定量。图4G示出了肺部的苏木精和伊红染色 (H&E)。箭头指向闭塞血管。比例尺:500 μ m。图4H和4I示出了部分和完全闭塞的血管的H&E染色。箭头指向覆盖细胞间隙的NET。插图是概观。比例尺:50 μ m。统计数据:(图4A) 对数秩检验;与所有其他组相比, $\#P<0.01$, (图4B-4F) 单向ANOVA, 然后进行Bonferroni多重比较后检验; $\$P<0.001$, $\#P<0.01$ 。

[0031] 图5A-图5E示出了慢性中性粒细胞增多症的鼠类模型。为四周龄的WT小鼠注射CSF3表达质粒 (CSF3) 或空的对照质粒 (Ctrl)。图5A示出了血浆中的G-CSF水平 (N=3-6)。BL: 基线, 注射前; Ctrl: 表达不含CSF3的对照质粒2周的小鼠 (N=4-5)。图5B示出了针对肺部、肾脏和肝脏的中性粒细胞弹性蛋白酶的免疫染色。比例尺:200 μ m。图5C示出了脾脏的照片和重量 (N=5-6)。比例尺:1cm。图5D示出在指定时间的小鼠体重 (N=3-5)。图5E示出了注射后2周全血中的中性粒细胞计数以及ALT、AST、BUN和肌酐的血浆水平。图像代表三只或更多只小鼠。统计数据:(图5A、5C) 单向和 (图5D) 双向ANOVA, 然后进行Bonferroni多重比较后检验, 以及 (图5E) 学生t检验; 相比于 (图5A) BL或 (图5C) UT, $\#P<0.01$, $\$P<0.001$ 。

[0032] 图6A-图6D显示DNA酶1和DNA酶113预防在慢性中性粒细胞增多症期间肝脏和肾脏中NET凝块的形成和器官损伤。分析共表达CSF3对照质粒 (CSF3/Ctrl, N=4) 与DNA酶1 (CSF3/D1, N=4) 或DNA酶113 (CSF3/D1L3, N=4) 的DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠 (D1/D1L3-/-)。对照包括未处理的WT小鼠 (UTWT, N=4) 和未处理的D1/D1L3-/-小鼠 (UT; N=4)。图6A示出了丙氨酸和天冬氨酸氨基转移酶 (ALT、AST) 的血浆水平。图6B示出了血液尿素氮 (BUN) 和肌酐的血浆水平。图6C提供了肝脏每个切片及肾脏每个视野 (FOV) 中富含苏木精的血管内凝块的定量。图6D提供了肝脏和肾脏的H&E染色。比例尺:500 μ m (概观)、50 μ m (细节)。图像代表三只或更多只小鼠。统计数据:(图6A、6B、6C) 单向ANOVA, 然后进行Bonferroni多重比较后检验; 与其他所有组相比, $\#P<0.01$, $\$P<0.001$ 。

[0033] 图7A-图7C显示苏木精阳性凝块由NET组成。图3A-3G中示出了对患有慢性中性粒细胞增多症 (D1/D1L3-/-+CSF3/Ctrl) 的DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠 (D1/D1L3-/-) 小鼠的肺部的分析。图7A提供了针对DNA以及连续肺部切片的染色质的苏木精和伊红 (H&E) 染色。比例尺:200 μ m。图7B提供了闭塞血管针对染色质、CRAMP (cathelin相关抗菌肽) 和DNA的免疫染色。比例尺:50 μ m。图7C提供了闭塞的血管针对染色质、瓜氨酸化组蛋白3 (citH3) 和DNA的免疫染色。比例尺:50 μ m。图像代表三只或更多只小鼠。

[0034] 图8A和图8B显示人NET在体外形成凝块。图8A提供了由PMA活化的人中性粒细胞在体外生成的NET凝块(箭头)的照片。未经处理的中性粒细胞 (UT) 或在重组人DNA酶1 (PMA+

D1)的存在下活化的中性粒细胞用作对照。比例尺:5mm。图8B提供了针对体外生成的NET凝块的染色质和中性粒细胞标志物髓过氧化物酶(MPO)的苏木精和伊红染色(H&E)以及免疫染色。比例尺:200 μ m。图像代表三个或更多个独立实验。

[0035] 图9A和图9B显示NET降解与STEC-HUS中的疾病活性相关。图9A示出了图像,并且图9B示出了在用缓冲液、来自正常健康供体的血浆(N=7)或在11名STEC-HUS患者的急性疾病状态(急性)和缓解期(缓解)收集的血浆一起孵育后,体外生成的NET的DNA染色的定量。比例尺:50 μ m。统计数据:单向ANOVA,然后进行Bonferroni多重比较后检验;与所有其他组相比, $\$P<0.001$ 。

[0036] 图10提供了一份来自检查的各患者的人体组织描述表,诸如患者编号、尸检报告中指出的死亡原因(ARDS,急性呼吸窘迫综合征)。患者的性别和年龄。所分析的组织类型。通过三步程序对组织进行分析:第一,在苏木精和伊红染色中鉴定富含苏木精的凝块/聚集体;第二,通过染色质和髓过氧化物酶(MPO)的免疫染色来鉴定富含苏木精的血块中的NET;第三,鉴定肺部结构内NET凝块的定位。

[0037] 图11A-图11D显示人NET在原位形成凝块。尸检时从两名脓毒症患者(图10中的6号和7号患者)中收集了肺组织。图11A示出了来自6号患者的肺组织中的两个富含苏木精的血管内凝块的H&E染色。图11B示出了连续切片针对图A所示左侧血管的染色质和髓过氧化物酶(MPO)的免疫染色。图11C示出了来自7号患者的肺组织中的血管的H&E染色,示出了富含苏木精的血管内凝块。图11D示出了连续切片针对染色质和MPO的免疫染色。箭头指向NET凝块。比例尺:50 μ m。

[0038] 图12显示败血病小鼠中NET凝块使血管闭塞。败血病DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠中完全闭塞血管的针对DNA、染色质和髓过氧化物酶(MPO)的免疫染色。NET的DNA和染色质染色(箭头)看起来比核染色(星号)暗,并且覆盖了细胞间隙。比例尺:10 μ m。

[0039] 图13A-图13F显示DNA酶1和DNA酶113通过不同的机制降解NET。图13A提供了在用来自WT、DNA酶1-/- (D1-/-)、DNA酶113-/- (D1L3-/-)、DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠(D1/D1L3-/-)的血清一起孵育后体外生成的PFA固定的NET的DNA染色。数据代表 ≥ 3 个独立实验。比例尺:50 μ m。图13B示出了在用来自WT、D1-/-、D1L3-/-和D1/D1L3-/-小鼠的血清一起孵育后,从PFA固定的NET释放的无细胞DNA片段的浓度。图13C示出了在用媒介物、重组鼠DNA酶1(rmD1)或重组鼠DNA酶113(rmD1L3)一起孵育后体外生成的非固定NET的DNA染色。图13D示出了在用媒介物、rmD1或rmD1L3一起孵育后体外生成的非固定NET释放的无细胞DNA片段的浓度。图13E示出了在用媒介物、rmD1或rmD1L3一起孵育后体外生成的PFA固定的NET的DNA染色。图13F示出了在用媒介物、rmD1或rmD1L3孵育后体外生成的PFA固定的NET释放的无细胞DNA片段的浓度。通过单向方差分析,然后进行Bonferroni多重比较后检验进行统计分析; $\$P<0.0001$ 。

[0040] 图14A-图14G提供了人和小鼠循环中的DNA酶1和DNA酶113活性。图14A-图14E示出了通过SRED定量的人和鼠血浆中的DNA酶活性。图14A说明为来自正常健康供体(NHD)的血浆补充抗人DNA酶1的多克隆抗体(α -hDNA酶1),但不补充IgG,会以浓度依赖性方式阻断DNA降解活性(*:相比于IgG, $p<0.05$)。图14B显示补充了200 μ g/ml α -hDNA酶1和肝素(DNA酶113的抑制剂)的血浆会阻断补充了200 μ g/ml α -hDNA酶1的血浆中的残留DNA酶活性(*:相比于NHD, $p<0.05$)。图14C-图14E提供了来自小鼠和NHD的血浆的连续稀释液中的DNA酶活性的比

较。图14C说明WT小鼠的总DNA酶活性是NHD的大约10倍。图14D显示来自DNA酶113^{-/-}小鼠的血浆中的DNA酶1活性是补充了500 μ g/ml肝素的人血浆的大约10倍。(E来自DNA酶1^{-/-}小鼠的血浆中的DNA酶113活性是补充了200 μ g/ml α -hDNA酶1的人血浆的大约10倍。(F、G)在图14F和图14G中说明了体外NET降解。图14F示出了单独用来自NHD的血浆孵育或补充200 μ g/ml α -hDNA酶1,用来自TMA患者的血浆,以及来自WT、DNA酶1^{-/-}和DKO小鼠的血浆一起孵育的活化中性粒细胞(比例尺:200 μ m)。图14G示出了用来自指定来源的血浆一起孵育的活化中性粒细胞上清液中的无细胞DNA(S:相比于NHD, $p < 0.001$)。人血浆的体外NET降解取决于DNA酶1,因为人血浆中的DNA酶113不足以降解NET。

[0041] 图15A-图15C示出了DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠替代品系中慢性中性粒细胞增多症的致死过程。将DNA酶1^{-/-}小鼠替代品系(参见实施例1的方法)与DNA酶113^{-/-}小鼠杂交以产生具有组合缺陷的小鼠。图15A提供了WT(N=9)、DNA酶1^{-/-}(D1^{-/-}, N=5)和DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠(D1/D1L3^{-/-}, N=5)中中性粒细胞增多症的存活曲线。通过注射CSF3表达质粒(CSF3)诱发慢性中性粒细胞增多症。图15B提供了肺部切片的苏木精和伊红染色(H&E)。箭头指向D1/D1L3^{-/-}小鼠中的苏木精阳性凝块。比例尺:500 μ m。图15C提供了共表达CSF3与对照质粒(CSF3/Ctrl, N=6)、DNA酶1(CSF3/D1, N=5)或DNA酶113(CSF3/D1L3, N=6)的D1/D1L3^{-/-}小鼠的存活率。统计数据:对数秩检验; $SP < 0.001$ 。

[0042] 图16A-图16B示出了在体外鉴定DNA酶1和DNA酶1L3的高活性变体的筛选方法。图16A示出了包括野生型DNA酶1L3(I, D1L3)、野生型DNA酶1(II, D1)及其变体的DNA酶文库。D1和D1L3变体是通过将氨基酸从D1L3转移到D1(III, D1^V)和从D1转移到D1L3(IV, D1L3^V)设计的。使用高分子量(HMW)DNA、dsDNA和染色质作为底物进行降解,测试DNA酶活性。在图16B中,酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如D1, 0.0005ng)。D1降解dsDNA的效率是D1L3的大约100倍。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。D1L3降解染色质的效率是D1的大约100倍。以10:1或1:1(m/m)的比率,D1和D1L3在染色质降解中显示出协同作用。

[0043] 图17示出了人DNA酶1(SEQ ID NO:1)和人DNA酶1L3(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列比对。突出显示了信号肽、保守性氨基酸、D1L3可变区中的额外精氨酸和赖氨酸残基以及D1L3的C端尾部。序列尺指示氨基酸位置。

[0044] 图18示出了仅在DNA酶1L3中存在的精氨酸和赖氨酸残基的列表。指出了DNA酶1中的相应氨基酸和DNA酶1中的氨基酸取代。括号中的数字是没有信号肽的成熟蛋白中的氨基酸位置。位于D1L3的C端尾部的精氨酸和赖氨酸残基示于泳道29-37中。本申请测试了37种可能的DNA酶1变体中的22种。

[0045] 图19示出了具有图18中列出的单个精氨酸和赖氨酸氨基酸取代的DNA酶1变体的表征。酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。引起染色质降解活性增加的氨基酸取代以蓝色突出显示。没有此类作用的样品以浅蓝色示出。

[0046] 图20示出了人DNA酶1(SEQ ID NO:1)、小鼠DNA酶1(SEQ ID NO:3)、大鼠DNA酶1(SEQ ID NO:4)和人DNA酶1L3(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列比对。序列尺指示氨基酸位置。

信号肽以灰色突出显示。突出显示了小鼠/大鼠DNA酶1和人DNA酶1L3中存在,但在人DNA酶1中不存在的阳离子氨基酸残基(精氨酸:R,赖氨酸:K)。示出了小鼠DNA酶1中的四个此类R/K残基(Q31R、Q49K、Q79R、W209R)。大鼠DNA酶1包含两个另外的R/K残基(Q177K、G262K)。

[0047] 图21A-图21B示出了鼠和人DNA酶1之间的比较。(图21A)酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。鼠DNA酶1(mD1)和人DNA酶1(D1)示出相似水平的dsDNA降解活性。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。鼠DNA酶1(mD1)显示出比人DNA酶1(D1)更高的染色质降解活性。(图21B)用人DNA酶1进行的基因疗法仅提供对NET致死性血管闭塞的部分保护。伴有血管内NET形成的慢性中性粒细胞增多症是由肝脏表达编码G-CSF的Csf3所诱发的。数据示出了表达Csf3的DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠的存活曲线。为动物注射Csf3和空的对照载体(Ctrl,N=6),以及Csf3和人DNA酶1(hDNA酶1,N=12)的混合物,和Csf3和鼠DNA酶1(mDNA酶1,N=5)。P-值是使用对数秩检验计算的。

[0048] 图22A-图22B示出了体内和体外啮齿动物样人DNA酶1变体的表征。(图20A)用啮齿动物样DNA酶1-变体进行的基因疗法提供了对NET致死性血管闭塞的全面保护。伴有血管内NET形成的慢性中性粒细胞增多症是由肝脏表达编码G-CSF的Csf3所诱发的。数据示出了表达Csf3的DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠的存活曲线。如图21所示,为动物注射Csf3和空的对照载体(Ctrl,N=6),以及Csf3和人DNA酶1(hDNA酶1,N=12)的混合物。第三组DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠接受注射Csf3以及编码鼠样DNA酶1变体的基因,所述变体含有4个氨基酸突变Q31R/Q49K/Q79R/W209R(Q31R/Q49K/Q79R/W209R,N=6)。第四组DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠接受注射Csf3以及编码大鼠样DNA酶1变体的基因,所述变体含有6个氨基酸突变Q31R、Q49K、Q79R、Q177K、W209R和G262K(Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K,N=6)。P-值是使用对数秩检验计算的。(图22B)酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。人DNA酶1的鼠样变体(Q31R/Q49K/Q79R/W209R)和人DNA酶1的大鼠样变体(Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K)与野生型人DNA酶1相比显示出相似的dsDNA,但显示出更高的染色质降解活性。

[0049] 图23示出了人DNA酶1(D1,SEQ ID NO:1)和人DNA酶1L3(D1L3,SEQ ID NO:2)的氨基酸序列比对。序列尺标出了氨基酸位置。突出显示了具有已公布突变的D1氨基酸。人D1L3含有三个与人DNA酶1功能获得相关的突变(Q31R/T227K/A136F)和四个与活性增加无关联的突变。

[0050] 图24A-24B示出了具有突变Q31R、T227K和/或A136F的DNA酶1变体(D1^V)的表征。(图24A)对转染的HEK293细胞的培养上清液进行分析。用野生型DNA酶1(D1)和DNA酶1L3(D1L3)转染的HEK细胞用作对照。酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。特征在于三个氨基酸突变Q31R/T227K/A136F的D1^V与D1和特征在于Q31R、T227K、A136F或Q31R/T227K的D1^V相比具有相似的dsDNA降解活性,但具有更强的降解染色

质的能力。(图24B)用高活性D1^V进行的基因疗法对NET致死性血管闭塞提供了全面部分保护。伴有血管内NET形成的慢性中性粒细胞增多症是由肝脏表达编码G-CSF的Csf3所诱发的。数据示出了表达Csf3的DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠的存活曲线。如图21所示,为动物注射Csf3和空的对照载体(Ctrl,N=6),以及Csf3和人DNA酶1(hDNA酶1,N=12)的混合物。另外,一组DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠接受注射Csf3和编码人DNA酶1变体的基因,所述变体含有三氨基酸突变Q31R/T227K/A136F(Q31R/T227K/A136F,N=6)。P-值是使用对数秩检验计算的。

[0051] 图25示出了野生型DNA酶1(D1)和特征在于突变Q31R/T227K/A136F的DNA酶1变体(D1^V)的比较。以指定的量分析纯化蛋白。酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如0ng)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。特征在于突变Q31R/T227K/A136F的DNA酶1变体降解染色质的效率是野生型DNA酶1的大约10-20倍。

[0052] 图26示出了具有氨基酸突变A164K、A136F和A164K/A136F的DNA酶1变体(D1^V)与野生型DNA酶1(D1)和野生型(D1L3)的比较。分析转染的HEK细胞的培养上清液。酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。特征在于A136F/A164K的DNA酶1变体降解染色质的效率更高。

[0053] 图27A-图27B示出了具有突变A226_T227insK的DNA酶1变体的开发。(图26A)人DNA酶1(SEQ ID NO:1)和人DNA酶1L3(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列比对。序列尺标出了氨基酸位置。突出显示了DNA酶1L3中的关键精氨酸残基。DNA酶1和DNA酶1L3之间的共有氨基酸突出显示,并且用作锚点来以DNA酶1L3的VKKS置换DNA酶1的氨基酸序列ATP。(图26B)酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如对照)。凝胶上样有野生型DNA酶1(D1)、特征在于突变A226_T227insK、T227K和A226_P228delinsVKKS的DNA酶1变体(D1^V)。A226_T227insK,而不是A226_P228delinsVKKS与dsDNA降解活性降低相关。

[0054] 图28示出了人DNA酶1[4AWN]的结构。突出显示的是N端β-折叠和C端β-折叠以及在D1蛋白家族成员中是保守性的基序S272/D273/H274。

[0055] 图29示出了同源蛋白构建嵌段工程的概念。该技术在供体和受体蛋白之间转移单个或多个可变氨基酸,可变氨基酸侧翼是保守性的单个或多个可变氨基酸。

[0056] 图30示出了小鼠(SEQ ID NO:3和34)、大鼠(SEQ ID NO:4和35)、黑猩猩(SEQ ID NO:36和37)和人(SEQ ID NO:1和2)的DNA酶1和DNA酶1L3的氨基酸序列比对。N端信号肽和保守性氨基酸突出显示。可变氨基酸未突出显示,并且用作可从DNA酶1转移到DNA酶1L3(反之亦然)的构建嵌段。缩写:AA,氨基酸。

[0057] 图31A-图31B示出了人DNA酶1(D1)和人DNA酶1L3(D1L3)中的构建嵌段列表。图31A示出了D1和D1L3中保守性的氨基酸,这些氨基酸分别用作N-锚点和C-锚点。构建嵌段是D1和D1L3中的可变氨基酸。示出了将构建嵌段从D1L3转移到D1的突变。图31B示出了D1L3中的N-锚点和C-锚点。列出了将构建嵌段从D1转移到D1L3的突变。AA:氨基酸。

[0058] 图32示出了同源蛋白构建嵌段工程的应用。该应用将构建嵌段簇在同源供体和受

体蛋白之间的转移用作初始筛选步骤。其他任选步骤是转移单个构建嵌段,然后转移单个氨基酸。在最后的步骤(未示出)中,可以将多个氨基酸、构建嵌段和构建嵌段簇组合以使嵌合酶变性。

[0059] 图33示出了特征在于来自DNA酶1L3 (D1L3) 的构建嵌段的DNA酶1变体(D1^V) 的表征。酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。引起染色质降解活性增加的构建嵌段取代以深色阴影突出显示。没有此类作用的样品以浅色阴影示出。特征在于构建嵌段11、12-14、26、41-48和49组合的DNA酶1变体与野生型DNA酶1L3相比具有相似的染色质降解活性。

[0060] 图34A-图34B示出了无野生型DNA酶1L3的C端尾部的DNA酶1L3变体的开发。图34A示出了人DNA酶1 (SEQ ID NO:1) 和人DNA酶1L3 (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列比对。序列尺标出了氨基酸位置。突出显示了DNA酶1L3的C端尾部,并在其核定位信号处加框。指出了DNA酶1和DNA酶1L3之间的共有氨基酸。在DNA酶1和DNA酶1L3之间位于保守性SDH基序之后的氨基酸交换了构建嵌段簇60-62。图34B示出的酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。凝胶上样有野生型DNA酶1 (D1), 制备特征在于来自D1的BB簇60-62的DNA酶1变体(D1^V)、特征在于来自D1的BB簇60-62的DNA酶1L3变体(D1L3^V) 以及具有两个突变(K301A、K303A) 的D1L3^V以使NLS2失活。具有来自D1的BB簇60-62的D1L3^V与野生型D1L3相比,显示出增加的染色质降解活性。

[0061] 图35A-图35B示出了糖基化DNA酶1L3变体(D1L3^V) 的开发。图35A示出了人DNA酶1 (SEQ ID NO:1) 与人DNA酶1L3 (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列比对。序列尺标出了氨基酸位置。突出显示了DNA酶1的糖基化基序N40-X-T42和N128-X-T130。这些位点是构建嵌段(BB) 4和构建嵌段簇(BB) 23-25的一部分。突出显示了DNA酶1和DNA酶1L3之间的相关共有氨基酸。(图35B) 酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如Ctrl)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。凝胶上样有野生型DNA酶1L3 (D1L3)、特征在于来自D1的BB 4的DNA酶1L3变体(D1L3^V) 以及特征在于来自D1的BB簇23-25的DNA酶1L3变体(D1L3^V)。用D1L3抗体产生的蛋白质印迹(WB) 检测到D1L3^V显示出增加量的较大蛋白质。两种糖基化的DNA酶1L3变体(D1L3^V) 均保持其降解染色质的能力。

[0062] 图36A-图36F示出了DNA酶1L3 (SEQ ID NO:2) 及其变体 (SEQ ID NO:17) 对体内NET的治疗作用。图36A示出了在心脏腔室内具有富含苏木精且致密的NET凝块的小鼠心脏的H&E染色。图36B示出了从NET诱导开始,导致NET引起的血管闭塞和死亡的时间线。血尿和体温过低是体内NET凝块的外部体征。(图36C) 实验设计概要:在DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}中表达Csf3以诱导血管NET凝块。显示出血尿和体温过低的小鼠通过注射媒介物(N=3)、阿法链道酶(dornase alpha) (D1,N=3)、纯化DNA酶1L3 (D1L3,N=3) 或纯化DNA酶1L3变体 (SEQ ID NO:17,D1L3^V,N=3) 进行随机分组。30分钟后,收集肺部和血清。用D1L3或D1L3^V而不是盐水

或D1进行的疗法,显著减少了肺部中NET引起的血管闭塞(图36D),并且增加了血清中的DNA水平(图36E)。图36F示出了来自接受D1L3疗法的小鼠的血清中的寡聚核小体。接受D1L3^V的小鼠显示出较小的单核小体和双核小体。来自接受D1疗法的小鼠血清的DNA分离物显示出各种大小的微弱DNA涂片,而无法从注射媒介物的小鼠血清中分离出DNA。

[0063] 图37A-图37C示出了DNA酶1L3变体(SEQ ID NO:17)在缺血再灌注(IR)损伤大鼠模型中的治疗作用。(图37A)实验设计概要:对雄性野生型大鼠的一侧睾丸进行睾丸扭转。该程序会导致缺血性组织损伤。将小鼠随机分组。进行睾丸扭转矫正,然后注射媒介物(N=6)、阿法链道酶(D1,N=6)或纯化DNA酶1L3变体(SEQ ID NO:17,D1L3^V,N=6)。7天后收集未处理的睾丸和缺血性睾丸。图37B显示用D1L3^V而不是盐水或D1进行的疗法显著减少了缺血性睾丸的萎缩。图37C定量了宏观组织损伤。所有未处理的睾丸都呈褐色并且血管化,表明组织健康(Ctrl,评分:0)。睾丸扭转然后再灌注使组织受损,看上去发白(IR,评分:4)。用D1L3^V而不是盐水或D1进行的疗法显著减少组织损伤,而4/6的睾丸未显示出损伤体征。比例尺:1cm。

[0064] 图38A-图38C示出了DNA酶1、DNA酶1L3及其变体的表达水平。(图38A)在生物反应器中培养产生野生型DNA酶1(D1)、其变体(D1^V,SEQ ID NO:7)、野生型D1L3及其变体(D1L3^V,SEQ ID NO:17)的稳定CHO细胞库。定期收集样品并通过蛋白质印迹法进行分析。检测到D1和D1^V的表达,但只有低水平的D1L3和D1L3^V。(图38B)在巴斯德毕赤酵母中获得D1L3和D1L3^V的稳健表达。(图38C)酶谱显示dsDNA降解活性为深色圆圈。dsDNA降解活性与直径相关。没有活性的样品显示上样孔为黑色小点(例如D1L3,0.0005ng)。从消化的染色质分离的DNA的琼脂糖凝胶电泳(AGE)示出从高分子量DNA向较低或低分子量DNA的转变,这种转变与染色质降解活性相关。D1L3^V降解染色质的效率是D1L3的大约10倍。

[0065] 图39说明了根据本公开的某些DNA酶变体。列出了具有信号肽的DNA酶1和DNA酶1L3以及没有信号肽的成熟蛋白中的氨基酸突变。使用构建嵌段工程生成的突变标有“+”,并且在括号中指出了构建嵌段。

具体实施方式

[0066] 本发明提供了工程化DNA酶蛋白,其为DNA酶1蛋白家族的成员(包括DNA酶1样3和DNA酶1),可用于治疗以中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚和/或释放为特征的疾患。在一些方面,本发明提供了用于预防或治疗牵涉NET的血管闭塞的组合物和方法。如本文所证明,NET参与血管闭塞的非规范机制,所述机制不依赖于纤维蛋白或血小板。

[0067] 如本文所用,术语“中性粒细胞胞外诱捕网”或“NET”是指包含由细胞形成的胞外DNA的任何胞外诱捕网(“ET”),所述细胞例如但不限于中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、癌细胞、受损细胞(例如,受损的内皮细胞)等。除非上下文另外指出,否则术语NET和ET在本文中可互换使用。

[0068] 在人和小鼠的循环中发现两种胞外DNA酶酶,即DNA酶1(D1)和DNA酶1样3(D1L3)。这些酶可能在体外和体内降解NET的能力和机理方面存在缺陷,并且发现在人和小鼠中的浓度相对较低。对于重组疗法,尤其是对于全身疗法而言,天然酶类没有理想的物理、酶促和/或药效学特性。

[0069] D1和D1L3以及DNA酶1样1(D1L1)和DNA酶1样2(D1L2)都属于DNA酶1蛋白家族。D1和

D1L3在多种物种中表达,包括人、灵长类动物和啮齿动物。在人和小鼠中,D1和D1L3显示出49-52%的蛋白质相似性。然而,尽管它们具有同源性,但D1和D1L3在细胞来源、对抑制剂的敏感性和底物亲和力方面有所不同。D1优先裂解无蛋白的DNA(例如细菌DNA、质粒DNA),而D1L3靶向染色质(DNA和组蛋白的复合物,通常在真核细胞核中发现)。与单体肌动蛋白结合后,D1活性受到抑制,并且对生理盐浓度敏感。另外,D1在N40(对应于无信号肽的成熟酶中的N18)和N128(N106)处被糖基化,这使得该酶对血清蛋白酶灭活具有抗性。相反,D1L3缺乏糖基化和肌动蛋白结合位点,这分别导致其对几种蛋白酶的敏感性和对肌动蛋白的抗性。

[0070] 在一些方面,本发明提供了经工程化为具有适于治疗,例如适于减少或预防受试者中的NET积聚的药效学和/或酶促特性的D1L3变体。例如。在各种实施方案中,本发明提供了一种重组D1L3蛋白变体,其包含:一个或多个糖基化、一个或多个氨基酸改变,导致底物亲和力增加、核定位信号失活、C端尾部全部或部分缺失、聚乙二醇化以及与载体蛋白或部分融合。在各种实施方案中,与SEQ ID NO:2的野生型D1L3蛋白相比,D1L3变体具有增加的蛋白质稳定性、增加的蛋白酶抗性、增加的生物利用率、增加的循环半衰期和/或基本上相同或更好的DNA和/或染色质和/或NET降解活性、更高的在体外表达系统中(例如中国仓鼠卵巢细胞和/或巴斯德毕赤酵母)中的生产水平。

[0071] 在各种实施方案中,D1L3变体包含与由SEQ ID NO:2的氨基酸序列定义的酶具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,相对于如本文所述的SEQ ID NO:2具有一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,D1L3变体包含与SEQ ID NO:2所定义的DNA酶具有至少90%或至少95%或至少97%或至少98%的序列同一性的氨基酸序列。

[0072] 如本文所用,当提及与野生型DNA酶酶的序列同一性时,除非另有说明,否则序列是指缺乏信号肽的成熟酶。此外,为清楚起见,除非另有说明,否则氨基酸位置是相对于完整翻译的DNA酶序列(包括信号肽)进行编号的。因此,例如,提及与SEQ ID NO:2的酶的序列同一性是指与N端具有M21的成熟酶的百分比同一性。类似地,提及与SEQ ID NO:1的酶(人D1)的序列同一性是指与N端具有L23的成熟酶的百分比同一性。

[0073] 核苷酸和氨基酸序列的相似性,即序列同一性的百分比,可以通过本领域已知的序列比对来测定。此类比对可以用几种本领域已知的算法进行,例如用Karlin和Altschul的数学算法(Karlin&Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877),用hmmalign(HMMER包,<http://hmmerr.wustl.edu/>)或用CLUSTAL算法(Thompson,J.D., Higgins,D.G.&Gibson,T.J.(1994)Nucleic Acids Res.22,4673-80)。示例性算法并入Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410的BLASTN和BLASTP程序中。利用BLAST程序时,使用各个程序的默认参数。

[0074] 在一些实施方案中,重组D1L3蛋白变体包含一个或多个糖基化共有序列,例如NX(T/S)。人野生型酶(SEQ ID NO:2)不含共有糖基化序列。然而,将糖基化共有序列工程化到D1L3中可以提供糖基化(和蛋白酶抗性),而对酶促活性没有实质性影响。在一些实施方案中,糖基化共有序列包括来自野生型序列(例如,SEQ ID NO:2)的D38N取代和N40T或N40S取代,和/或A127N取代和V129T或V129S取代。在一些实施方案中,重组D1L3酶具有一个、两个、三个或四个糖基化位点。共有序列可以引入蛋白质中不影响其酶促活性的位置处,并且在一些实施方案中,位于对维持酶结构很重要的酶部分附近(例如,在氨基酸25至289内,并且在一些实施方案中,在氨基酸24至150内)。

[0075] 在一些实施方案中,本发明提供了DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:2所定义的酶的氨基酸序列至少80%同一的氨基酸序列,其中该酶在于SEQ ID NO:2的位置38和/或位置127相对应的位置具有天冬酰胺取代,并且N38和/或N127被糖基化。在一些实施方案中,如本文所述,由SEQ ID NO:1通过构建嵌段取代在位置38和/或127处产生取代。

[0076] 在各种实施方案中,与野生型D1L3蛋白 (SEQ ID NO:2) 相比,具有一个或多个糖基化的D1L3变体表现出对血清蛋白酶降解的抗性增加和/或血清半衰期增加。

[0077] 在一些实施方案中,D1L3蛋白变体包含核定位信号 (NLS) 的失活。D1L3的特征在于两个核定位位点 (NLS1、NLS2), 这两个位点在凋亡期间使酶靶向细胞核。实际上,D1L3是体内凋亡细胞和坏死细胞中核DNA片段化所需的。NLS1位于N端附近 (相对于SEQ ID NO:2大约在氨基酸位置80至96处)。NLS2 (相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置291至304) 嵌入D1L3特有的而在D1中不存在于的C端尾部 (相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置283至305) 中。C端尾部被认为是D1L3降解胞外DNA不同底物 (即脂质包封DNA和凋亡小体中的染色质) 所需的。在转染期间脂质包封DNA。简言之,cDNA,无蛋白DNA和阳离子脂质形成可穿透靶细胞质膜的复合物。D1L3会干扰转染,而C端尾部对于这种功能至关重要。D1L3的生理底物是凋亡小体,填充有来自凋亡细胞的染色质的胞外脂质囊泡。C端尾部使D1L3能够穿透凋亡小体的脂质膜并降低染色质负载。C端尾部也被认为是D1L3降解无脂质的胞外染色质所需的。因此,C端尾部,D1L3独有的分子特征,似乎是产生D1和D1L3不同底物亲和力的原因。

[0078] 一种或多种NLS的失活增强了循环中酶的可用性和/或活性。在一些实施方案中,NLS失活因NLS1和/或NLS2全部或部分缺失而引起。在一些实施方案中,NLS因NLS1和/或NLS2内氨基酸的取代和/或缺失而失活。在一些实施方案中,NLS2整体或部分缺失。在一些实施方案中,D1L3蛋白变体包含C端尾部的全部或部分缺失,和/或C端尾部中一个或多个氨基酸的取代。

[0079] 在某些实施方案中,D1L3变体在NLS1结构域中含有一个或多个,例如1、2、3、4、5个或多个氨基酸取代、添加 (例如,插入) 或缺失。NLS2结构域或其一部分可以缺失。在某些实施方案中,D1L3蛋白变体在C端尾部结构域中含有一个或多个,例如1、2、3、4、5个或更多个氨基酸取代、添加或缺失。C端尾部结构域或其一部分可以缺失。在各种实施方案中,D1L3蛋白变体在位于C端尾部结构域中的NLS2结构域中含有一个或多个,例如1、2、3、4、5个或更多个氨基酸取代、添加或缺失。在D1L3蛋白变体中NLS2结构域或其一部分可以缺失。

[0080] 在各个方面,本发明提供了一种蛋白质工程技术,该技术基于蛋白家族的两个成员 (诸如DNA酶1-蛋白家族成员) 之间的单个氨基酸或多个相邻氨基酸 (称为“构建嵌段”) 的转移以生成DNA酶1蛋白家族成员的酶促活性变体 (包括D1和D1L3变体)。“构建嵌段”由在DNA酶1蛋白家族的两个或更多个成员之间可变的氨基酸定义。这些可变氨基酸的侧翼是在DNA酶1蛋白家族的两个或更多个成员之间保守性的氨基酸 (“锚点”)。可变的单个氨基酸或多个连续氨基酸 (“构建嵌段”) 可以通过将它们植入保守性的单个氨基酸或多个连续氨基酸 (“锚点”) 之间,在DNA酶1蛋白家族的成员之间进行交换。

[0081] 该方法在本文中称为“构建嵌段蛋白工程”。在转移三个或更多个氨基酸的情况下,可进一步取代多达1/3的氨基酸。例如,在将三个或六个氨基酸作为构建嵌段进行转移的情况下,可分别进一步取代一个或多达两个残基。在一些实施方案中,转移四个或更多个氨基酸作为构建嵌段取代,并且进一步取代多达25%的转移的氨基酸,例如保守或非保守

性氨基酸修饰。例如,在转移四个、八个或十二个氨基酸的情况下,可以在构建嵌段取代中进一步取代一个、两个或三个氨基酸。

[0082] 在各个方面(包括结合上述实施方案),D1L3变体包含至少一个来自D1的构建嵌段取代。图31说明了D1和D1L3之间的62个构建嵌段取代。

[0083] 来自D1的示例性构建嵌段取代包括以下的一种或多种:

[0084] 来自SEQ ID NO:1的1-22(MRGMKLLGALLALAALLQGAVS)取代SEQ ID NO:2的1-20(MSRELAPLLLLLLLSIHSALA);来自SEQ ID NO:1的23-27(LKIAA)取代SEQ ID NO:2的21-25(MRICS);来自SEQ ID NO:1的30-32(IQT)取代SEQ ID NO:2的28-30(VRS) of SEQ ID NO:2;来自SEQ ID NO:1的35-36(ET)取代SEQ ID NO:2的33-34(ES);来自SEQ ID NO:1的38-47(MSNATLVSYI)取代SEQ ID NO:2的36-45(QEDKNAMDVI);来自SEQ ID NO:1的49-53(QILS)取代SEQ ID NO:2的47-51(KVIK);来自SEQ ID NO:1的54(Y)取代SEQ ID NO:2的52(C);来自SEQ ID NO:1的56-60(IALVQ)取代SEQ ID NO:2的54-58(IILVM);来自SEQ ID NO:1的62-63(VR)取代SEQ ID NO:2的60-61(IK);来自SEQ ID NO:1的65-72(SHLTAVGK)取代SEQ ID NO:2的63-70(SNNRICPI);来自SEQ ID NO:1的74-76(LDN)取代SEQ ID NO:2的72-74(MEK);

[0085] 来自SEQ ID NO:1的79-84(QDAPDT)取代SEQ ID NO:2的77-84(RNSRRGIT);来自SEQ ID NO:1的86(H)取代SEQ ID NO:2的86(N);来自SEQ ID NO:1的88-89(VV)取代SEQ ID NO:2的88-89(VI);来自SEQ ID NO:1的91-92(EP)取代SEQ ID NO:2的91-92(SR);来自SEQ ID NO:1的96-97(NS)取代SEQ ID NO:2的96-97(NT);来自SEQ ID NO:1的101(R)取代SEQ ID NO:2的101(Q);来自SEQ ID NO:1的103(L)取代SEQ ID NO:2的103(A);来自SEQ ID NO:1的105(V)取代SEQ ID NO:2的105(L);来自SEQ ID NO:1的107-110(RPDQ)取代SEQ ID NO:2的107-110(KEKL);来自SEQ ID NO:1的113-116(AVDS)取代SEQ ID NO:2的113-116(VKRS);来自SEQ ID NO:1的118(Y)取代SEQ ID NO:2的118(H);来自SEQ ID NO:1的120(D)取代SEQ ID NO:2的120(H);来自SEQ ID NO:1的122-128(GCEPCGN)取代SEQ ID NO:2的122-127(YQDGDA);来自SEQ ID NO:1的130(T)取代SEQ ID NO:2的129(V);来自SEQ ID NO:1的132(N)取代SEQ ID NO:2的131(S);来自SEQ ID NO:1136-137(AIV)的取代SEQ ID NO:2的135-136(FV);来自SEQ ID NO:1的139(R)取代SEQ ID NO:2的138(W);来自SEQ ID NO:1的141-144(FSRF)取代SEQ ID NO:2的140-143(QSPH);来自SEQ ID NO:1的146-149(EVRE)取代SEQ ID NO:2的145-148(AVKD);来自SEQ ID NO:1的151(A)取代SEQ ID NO:2的150(V);来自SEQ ID NO:1的153(V)取代SEQ ID NO:2的152(I);来自SEQ ID NO:1的157-158(AA)取代SEQ ID NO:2的156-157(TT);来自SEQ ID NO:1的160-162(GDA)取代SEQ ID NO:2的159-161(ETS);来自SEQ ID NO:1的164(A)取代SEQ ID NO:2的163(K);来自SEQ ID NO:1的168(A)取代SEQ ID NO:2的167(E);来自SEQ ID NO:1的170-171(YD)取代SEQ ID NO:2的169-170(VE);来自SEQ ID NO:1的174(L)取代SEQ ID NO:2的173(T);

[0086] 来自SEQ ID NO:1的177-179(QEK)取代SEQ ID NO:2的176-178(KHR);来自SEQ ID NO:1的181-182(GL)取代SEQ ID NO:2的180-181(KA);来自SEQ ID NO:1的184-187(DVML)取代SEQ ID NO:2的183-186(NFIF);来自SEQ ID NO:1的199-202(RPSQ)取代SEQ ID NO:2的198-201(PKKA);来自SEQ ID NO:1的204-205(SS)取代SEQ ID NO:2的203-204(KN);来自SEQ ID NO:1的209(W)取代SEQ ID NO:2的208(R);来自SEQ ID NO:1的211(S)取代SEQ ID NO:2的210(D);来自SEQ ID NO:1的213(T)取代SEQ ID NO:2的212(R);来自SEQ ID NO:1的

215(Q)取代SEQ ID NO:2的214(V);来自SEQ ID NO:1的219(P)取代SEQ ID NO:2的218(G);来自SEQ ID NO:1的221-222(SA)取代SEQ ID NO:2的220-221(QE);来自SEQ ID NO:1的226-228(ATP)取代SEQ ID NO:2的225-228(VKKS);来自SEQ ID NO:1的230(H)取代SEQ ID NO:2的230(N);来自SEQ ID NO:1的238-240(VAG)取代SEQ ID NO:2的238-240(LRG);来自SEQ ID NO:1的241-246(MLLRGA)取代SEQ ID NO:2的241-246(QEIVSS);来自SEQ ID NO:1的250(D)取代SEQ ID NO:2的250(K);来自SEQ ID NO:1的252-254(ALP)取代SEQ ID NO:2的252-254(NSV);来自SEQ ID NO:1的256(N)取代SEQ ID NO:2的256(D);来自SEQ ID NO:1的259-260(AA)取代SEQ ID NO:2的259-260(KA);来自SEQ ID NO:1的262(G)取代SEQ ID NO:2的262(K);来自SEQ ID NO:1的264-267(SDQL)取代SEQ ID NO:2的264-267(TEEE);来自SEQ ID NO:1的269-271(QAI)取代SEQ ID NO:2的269-271(LDV);来自SEQ ID NO:1的275(Y)取代SEQ ID NO:2的275(F);来自SEQ ID NO:1的279-280(VM)取代SEQ ID NO:2的279-280(FK);以及

[0087] 来自SEQ ID NO:1的282(K)取代SEQ ID NO:2的282-305(QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)。

[0088] 这些来自D1的构建嵌段取代产生D1L3的变体,这些变体的特征在于以下的一个或多个突变:M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS、M21_S25delinsLKIAA、V28_S30delinsIQT、E33_S34delinsET、Q36_I45delinsMSNATLVSYI、K47_K50delinsQILS、C52Y、I54_M58delinsIALVQ、I60_K61delinsVR、S63_I70delinsSHLTAVGK、M72_K74delinsLDN、R77_T84delinsQDAPDT、N86H、V88_I89delinsVV、S91_R92delinsEP、N96_T97delinsNS、Q101R、A103L、L105V、K107_L110delinsRPDQ、V113_S116delinsAVDS、H118Y、H120D、Y122_A127delinsGCEPCGN、V129T、S131N、I35F、I36VdelinsAI、W138R、Q140_H143delinsFSRF、A145_D148delinsAVKD、V150A、I152A、T156_T157delinsAA、E159_S161delinsGDA、K163A、E167A、V169_E170delinsYD、T173L、K176_R178delinsQEK、K180_A181delinsGL、N183_F186delinsDVML、P198_A201delinsRPSQ、K203_N204delinsSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220_E221delinsSA、V225_S228delinsATP、N230H、L238_R239delinsVA、Q241_S246delinsMLLRGA、K250D、N252_V254delinsALP、D256N、K259_A260delinsAA、K262G、T264_E267delinsSDQL、L269_V271delinsQAI、F275Y、F279_K280delinsVM、Q282_S305delinsK。

[0089] 术语“delins”是指在两个所示氨基酸之间并且包括两个所示氨基酸在内的缺失,并且在缺失位点插入了一个氨基酸或氨基酸序列。例如,符号E91_P92delinsSR意指从E91到P92的氨基酸缺失,并且氨基酸SR插入该缺失位点(例如,所得氨基酸序列将具有S91和R92)。

[0090] 术语“ins”是指在两个所示氨基酸之间插入氨基酸。例如,符号E91_P92insSR意指氨基酸SR插入E91和P92之间,从而产生序列E91、S92、R93和P94。

[0091] 一种酶中的多个突变用“/”分隔开,例如T227K/A136F或R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE。

[0092] 在一些实施方案中,D1L3变体包含一个或多个相邻的构建嵌段取代。例如,D1L3变体可以相对于SEQ ID NO:2包含突变F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK(SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,D1L3变体可以相对于SEQ ID NO:2包含突变Q36_I45delinsMSNATLVSYI(SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,D1L3变体可以相对于SEQ ID

NO:2包含突变Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N(SEQ ID NO:20)。

[0093] 在一个示例性的实施方案中,D1L3变体包含2个或3个选自相对于SEQ ID NO:2的突变的取代:Q36_I45delinsMSNATLVSYI、Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N、F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK。

[0094] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:2所定义的酶的氨基酸序列至少80%同一的氨基酸序列,并且包含至少一个来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的构建嵌段取代。图31中说明了SEQ ID NO:1和2之间的构建嵌段取代并对其进行了编号。例如,在一些实施方案中,该酶包含突变F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK,并且任选地包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,该酶包含突变Q36_I45delinsMSNATLVSYI、Y122_A127delinsGCEPCGN、V129T或S131N,并且任选地具有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0095] 示例性的D1L3变体包括那些包含SEQ ID No:17至20的氨基酸序列的变体。在一些实施方案中,本发明包括相对于SEQ ID NO:17至20中的任何一个具有1至10个(例如1至5个)氨基酸插入、缺失或取代的衍生物。在一些实施方案中,D1L3变体包含来自同源DNA酶(例如,来自D1)的一个或多个其他嵌段氨基酸取代。此类嵌段取代可以置换至少2个、至少3个、至少4个或至少5个氨基酸。在一些实施方案中,嵌段取代用来自同源DNA酶的同构构建嵌段置换2至20个氨基酸,诸如3至15个氨基酸,或3至10个氨基酸。

[0096] D1L3蛋白的工程化变体可以在人D1L3(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列中包含一个或多个其他氨基酸取代、添加(插入)、缺失或截短。氨基酸取代可包括保守性和/或非保守性取代。

[0097] 例如,“保守性取代”可以例如基于所涉氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来产生。这20种天然存在的氨基酸可以分为以下六个标准氨基酸类别:(1) 疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3) 酸性:Asp、Glu;(4) 碱性:His、Lys、Arg;(5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;和(6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。“保守性取代”定义为一种氨基酸被以上所示六个标准氨基酸类别的同一类中列出的另一种氨基酸交换。例如,Asp被Glu交换在这样修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,甘氨酸和脯氨酸基于其破坏 α -螺旋的能力,可以彼此取代。如本文所用,“非保守性取代”定义为一种氨基酸被以上所示六个标准氨基酸类别(1)至(6)的不同类别中列出的另一种氨基酸交换。

[0098] 在一些实施方案中,D1L3蛋白变体包含N-端或C-端与半衰期延长部分(诸如白蛋白、转铁蛋白、Fc或弹性蛋白样蛋白)的融合。参见US 9,458,218,其特此通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,D1L3通过免疫球蛋白铰链区二聚化。例如,本文所述的工程化酶也可包括Fc融合结构域(例如免疫球蛋白的铰链及CH2结构域和CH3结构域)。在其他情况下,工程化D1L3蛋白与白蛋白,例如人白蛋白或其片段融合。参见WO 2015/066550;US 9,221,896,其特此通过引用整体并入本文。白蛋白可以接合在工程化D1蛋白的N-端或C-端,并且可以任选地包含氨基酸接头。在一些实施方案中,D1L3和D1一起通过Fc铰链区二聚,产生具有降解NET的协同功能特性的二聚体分子。

[0099] 在一些实施方案中,重组D1L3蛋白变体包含一个或多个聚乙二醇(PEG)部分,其可以缀合在一个或多个位置或C端。在一些实施方案中,该位置的天然氨基酸被具有适合与亲

水性部分交联的侧链的氨基酸取代,以促进亲水性部分与肽的连接。在其他实施方案中,将经修饰为包含亲水基团的氨基酸添加至肽的C端。PEG链的分子量可以在约500至约40,000道尔顿的范围内。在一些实施方案中,PEG链的分子量在约500至约5,000道尔顿的范围内。在一些实施方案中,PEG链的分子量为约10,000至约20,000道尔顿。

[0100] 在各种实施方案中,与野生型D1L3蛋白相比,D1L3蛋白变体具有增加的蛋白稳定性、增加的血清利用率以及基本上相同或更好的NET降解活性(如在体外或体内测定的)。在各种实施方案中,相对于野生型D1L3,D1L3变体包含以下一种或多种特性:更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性、相同或基本上相同(例如,至少50%)的染色体DNA降解活性、蛋白酶抗性、增加的半衰期和在体外表达系统(例如中国仓鼠卵巢细胞和/或巴斯德毕赤酵母)中更高的生产水平。

[0101] 可以使用本领域技术人员已知的方法,诸如凝胶电泳和DNA酶活性测定法来测量DNA片段化。定量NET、NET降解和DNA片段化活性的方法在例如Hakkim等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,2010,107(21):9813-9818;Napirei等人,Biochem J,2005,389:355-364.Fuchs等人,J Cell Biol,2007,176(2):231-241,Sisirak等人Cell,2016,166:88-101,以及Jiménez-Alcázar等人J Thromb Haemost,2015,13,732-742中进行了描述。

[0102] 在一些方面,本发明提供了经工程化为具有更适于治疗,例如减少或预防受试者中的NET积聚的物理、药效学和/或酶促特性的DNA酶1(D1)变体。在一些实施方案中,变体更适合重组表达,从而提供了相当大的制造优势。在各种实施方案中,工程化D1变体包含与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列定义的成熟酶至少80%同一的氨基酸序列,具有一个或多个氨基酸取代、添加或缺失,产生以下的一种或多种:突变的DNA结合位点、染色质结合位点添加、突变的肌动蛋白结合位点、糖基化位点突变、核定位信号(例如,与D1L3的NLS1或NLS2具有相似性或同一性)的添加和/或与D1L3的C端尾部相似的C端结构域。D1变体包含与SEQ ID NO:1所定义的酶的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,相对于如本文所述的SEQ ID NO:1具有一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,D1L3变体包含与SEQ ID NO:1的酶具有至少90%或至少95%或至少97%或至少98%同一性的氨基酸序列。

[0103] 在各个实施方案中,D1变体在人D1(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列中包含一个或多个氨基酸取代、添加、缺失或截短。在一些实施方案中,氨基酸取代,并且可以包括所述的保守性和/或非保守性取代。例如,相对于SEQ ID NO:1的酶,D1变体可具有1至20个(或1至10个,或1至5个)氨基酸取代、缺失或插入。

[0104] 在一些实施方案中,D1变体包含一个或多个来自同源DNA酶(例如,来自D1L3)的其他嵌段氨基酸取代。此类嵌段取代可各自置换来自同源DNA酶的1至24个氨基酸,诸如3至15个氨基酸,或3至10个氨基酸。在一些实施方案中,D1变体包含2至5个来自同源DNA酶(例如,D1L3)的嵌段取代。在一些实施方案中,转移2个或3个连续的构建嵌段取代。

[0105] 在各种实施方案中,将D1变体工程化为相对于野生型酶包括以下一种或多种特征:基本上相同或更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性(如,至少50%或更多)、更高的染色体DNA降解活性、相似或提高的蛋白酶抗性、肌动蛋白抗性、增加的血清半衰期、提高的从血液向尿液或胆汁的渗透或此类特性的组合。

[0106] 在一些实施方案中,工程化的D1酶包含与野生型D1L3蛋白的C端结构域(例如SEQ ID NO:2的氨基酸283至305)有至少50%(或至少70%、80%、90%)的序列同一性的氨基酸

序列。

[0107] 在一些实施方案中,D1酶包含与野生型D1L3的NLS1 (SEQ ID NO:2的氨基酸35至51) 具有至少50%或至少75%的序列同一性的氨基酸序列,与野生型D1L3蛋白的NLS2 (SEQ ID NO:2的氨基酸296至304) 具有大幅序列同一性的核定位信号2 (NLS2)。

[0108] 在各个方面,重组D1变体包含选自以下的一种或多种构建嵌段取代:来自SEQ ID NO:2的1-20 (MSRELAPLLL LLLSIHSALA) 取代来自SEQ ID NO:1的1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS);来自SEQ ID NO:2的21-25 (MRICS) 取代来自SEQ ID NO:1的23-27 (LKIAA);来自SEQ ID NO:2的28-30 (VRS) 取代来自SEQ ID NO:1的30-32 (IQT);来自SEQ ID NO:2的33-34 (ES) 取代来自SEQ ID NO:1的35-36 (ET);来自SEQ ID NO:2的36-45 (QEDKNAMDVI) 取代来自SEQ ID NO:1的38-47 (MSNATLVSYI);来自SEQ ID NO:2的47-50 (KVIK) 取代来自SEQ ID NO:1的49-52 (QILS);来自SEQ ID NO:2的52 (C) 取代来自SEQ ID NO:1的54 (Y);来自SEQ ID NO:2的54-58 (IILVM) 取代来自SEQ ID NO:1的56-60 (IALVQ);来自SEQ ID NO:2的60-61 (IK) 取代来自SEQ ID NO:1的62-63 (VR);来自SEQ ID NO:2的63-70 (SNNRICPI) 取代来自SEQ ID NO:1的65-72 (SHLTAVGK);来自SEQ ID NO:2的72-74 (MEK) 取代来自SEQ ID NO:1的74-76 (LDN);来自SEQ ID NO:2的77-84 (RNSRRGIT) 取代来自SEQ ID NO:1的79-84 (QDAPDT);来自SEQ ID NO:2的86 (N) 取代来自SEQ ID NO:1的86 (H);来自SEQ ID NO:2的88-89 (VI) 取代来自SEQ ID NO:1的88-89 (VV);来自SEQ ID NO:2的91-92 (SR) 取代来自SEQ ID NO:1的91-92 (EP);来自SEQ ID NO:2的96-97 (NT) 取代来自SEQ ID NO:1的96-97 (NS);来自SEQ ID NO:2的101 (Q) 取代来自SEQ ID NO:1的101 (R);来自SEQ ID NO:2的103 (A) 取代来自SEQ ID NO:1的103 (L);来自SEQ ID NO:2的105 (L) 取代来自SEQ ID NO:1的105 (V);来自SEQ ID NO:2的107-110 (KEKL) 取代来自SEQ ID NO:1的107-110 (RPDQ);来自SEQ ID NO:2的113-116 (VKRS) 取代来自SEQ ID NO:1的113-116 (AVDS);来自SEQ ID NO:2的118 (H) 取代来自SEQ ID NO:1的118 (Y);来自SEQ ID NO:2的120 (H) 取代来自SEQ ID NO:1的120 (D);来自SEQ ID NO:2的122-127 (YQDGDA) 取代来自SEQ ID NO:1的122-128 (GCEPCGN);来自SEQ ID NO:2的129 (V) 取代来自SEQ ID NO:1的130 (TF);来自SEQ ID NO:2的131 (S) 取代来自SEQ ID NO:1的132 (N);来自SEQ ID NO:2的135-136 (FV) 取代来自SEQ ID NO:1的136-137 (AI);来自SEQ ID NO:2的138 (W) 取代来自SEQ ID NO:1的139 (R);来自SEQ ID NO:2的140-143 (QSPH) 取代来自SEQ ID NO:1的141-144 (FSRF);来自SEQ ID NO:2的145-148 (AVKD) 取代来自SEQ ID NO:1的146-149 (EVRE);来自SEQ ID NO:2的150 (V) 取代来自SEQ ID NO:1的151 (A);来自SEQ ID NO:2的152 (I) 取代来自SEQ ID NO:1的153 (V);来自SEQ ID NO:2的156-157 (TT) 取代来自SEQ ID NO:1的157-158 (AA);来自SEQ ID NO:2的159-161 (ETS) 取代来自SEQ ID NO:1的160-162 (GDA);来自SEQ ID NO:2的163 (K) 取代来自SEQ ID NO:1的164 (A);来自SEQ ID NO:2的167 (E) 取代来自SEQ ID NO:1的168 (A);来自SEQ ID NO:2的169-171 (VE) 取代来自SEQ ID NO:1的170-171 (YD);来自SEQ ID NO:2的173 (T) 取代来自SEQ ID NO:1的174 (L);来自SEQ ID NO:2的176-178 (KHR) 取代来自SEQ ID NO:1的177-179 (QEK);来自SEQ ID NO:2的180-181 (KA) 取代来自SEQ ID NO:1的181-182 (GL);来自SEQ ID NO:2的183-187 (NFIF) 取代来自SEQ ID NO:1的184-187 (DVML);来自SEQ ID NO:2的198-201 (PKKA) 取代来自SEQ ID NO:1的199-202 (RPSQ);来自SEQ ID NO:2的203-204 (KN) 取代来自SEQ ID NO:1的204-205 (SS);来自SEQ ID NO:2的208 (R) 取代来自

SEQ ID NO:1的209(W);来自SEQ ID NO:2的210(D)取代来自SEQ ID NO:1的211(S);来自SEQ ID NO:2的212(R)取代来自SEQ ID NO:1的213(T);来自SEQ ID NO:2的214(V)取代来自SEQ ID NO:1的215(Q);来自SEQ ID NO:2的218(G)取代来自SEQ ID NO:1的219(P);来自SEQ ID NO:2的220-221(QE)取代来自SEQ ID NO:1的221-222(SA);来自SEQ ID NO:2的225-228(VKKS)取代来自SEQ ID NO:1的226-228(ATP);来自SEQ ID NO:2的230(N)取代来自SEQ ID NO:1的230(H);来自SEQ ID NO:2的238-239(LR)取代来自SEQ ID NO:1的238-239(VA);来自SEQ ID NO:2的241-246(QEIVSS)取代来自SEQ ID NO:1的241-246(MLLRGA);来自SEQ ID NO:2的250-251(K)取代来自SEQ ID NO:1的250-251(D);来自SEQ ID NO:2的252-254(NSV)取代来自SEQ ID NO:1的252-254(ALP);来自SEQ ID NO:2的256(D)取代来自SEQ ID NO:1的256(N);来自SEQ ID NO:2259-260(KA)的取代来自SEQ ID NO:1的259-260(AA);来自SEQ ID NO:2的262(K)取代来自SEQ ID NO:1的262(G);来自SEQ ID NO:2的264-267(TEEE)取代来自SEQ ID NO:1的264-267(SDQ);来自SEQ ID NO:2的269-271(LDV)取代来自SEQ ID NO:1的269-271(QAI);来自SEQ ID NO:2的275(F)取代来自SEQ ID NO:1的275(Y);来自SEQ ID NO:2的279-280(FK)取代来自SEQ ID NO:1的279-280(VM);以及来自SEQ ID NO:2的282-305(QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS)取代来自SEQ ID NO:1的282(K)。

[0109] 这些来自D1L3的构建嵌段取代产生D1的变体,这些变体的特征在于以下的一个或多个突变:1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA、L23_A27delinsMRICS、I30_T32delinsVRS、E35_T36delinsES、M38_I47delinsQEDKNAMDVI、Q49_S52delinsKVIK、Y54C、I56_Q60delinsIILVM、V62_R63delinsIK、S65_K72delinsSNNRICPI、L74_N76delinsMEK、Q79_T84delinsRNSRRGIT、H86N、V88_V89delinsVI、E91_P92delinsSR、N96_S97delinsNT、R101Q、L103A、V105L、R107_Q110delinsKEKL、A113_S116delinsVKRS、Y118H、D120H、G122_N128delinsYQDGDA、T130S、N132S、A136_I137delinsFV、R139W、F141_F144delinsQSPH、E146_E149delinsAVKD、A151V、V153I、A157_A158delinsTT、G160_A162delinsETS、A164K、A168E、Y170_D171delinsVE、L174T、Q177_K179delinsKHR、G181_L182delinsKA、D184_L187delinsNFIF、R199_Q202delinsPKKA、S204_S205delinsKN、W209R、S211D、T213R、Q215V、P219G、S221_A222delinsQE、A226_P228delinsVKKS、H230N、V238_A239delinsLR、M241_A246delinsQEIVSS、D250K、A252_P254delinsNSV、N256D、A259_A260delinsKA、G262K、S264_L267delinsTEEE、Q269_I271delinsLDV、Y275F、V279_M280delinsFK、K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS。

[0110] 在一些实施方案中,重组D1变体相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:Y275F、V279_M280delinsFK和K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO:16)。此类变体包含C端尾部,并且对DNA-脂质复合物展示出更高的亲和力。

[0111] 在一些实施方案中,重组D1变体相对于SEQ ID NO:1包含以下氨基酸修饰:SEQ ID NO:1:Q79_T84delinsRNSRRGIT (例如,SEQ ID NO:10);H86N,和/或V88_V89delinsVI,和/或E91_P92delinsSR (例如,SEQ ID NO:11,其包括全部三个修饰);A136_I137delinsFV (例如,SEQ ID NO:12);R199_Q202delinsPKKA,和/或S204_S205delinsKN,和/或W209R,和/或S211D,和/或T213R,和/或Q215V,和/或P219G,和/或S221_A222delinsQE (例如,SEQ ID NO:13,其包括全部八个修饰);以及A226_P228delinsVKKS (例如,SEQ ID NO:14)。

[0112] 在一些实施方案中,在D1变体包含取代H86N的情况下,该变体包含至少一个其他

修饰,诸如构建嵌段取代或本文所述的其他点突变(诸如阳离子氨基酸的添加或产生肌动蛋白抗性的取代)。

[0113] 在一些实施方案中,D1变体包含至少两个相邻的、连续的构建嵌段取代,其产生相对于SEQ ID NO:1的突变:H86N/V88_V89delinsVI(例如,SEQ ID NO:11);R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE(例如,SEQ ID NO:13);Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSK KSVTLRKKTKSKRS(SEQ ID NO:16)。

[0114] 在一些实施方案中,本发明提供了一种DNA酶酶,其包含与SEQ ID NO:1定义的酶的氨基酸序列至少80%同一的氨基酸序列,并且包含至少一个来自SEQ ID NO:2氨基酸序列的构建嵌段取代,其中该DNA酶酶与SEQ ID NO:1的DNA酶酶相比具有增加的染色质降解活性。在一些实施方案中,该酶包含来自SEQ ID NO:2的至少两个相邻的构建嵌段取代。图31中说明了D1(SEQ ID NO:1)和D1L3(SEQ ID NO:2)之间的构建嵌段取代。

[0115] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:Q79_T84delinsRNSRRGIT,并且任选地包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR,并且任选地包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:A136_I137delinsFV,并且任选地包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下的两个或更多个修饰:R199_Q202delinsPKKA,和/或S204_S205delinsKN,和/或W209R,和/或S211D,和/或T213R,和/或Q215V,和/或P219G,和/或S221_A222delinsQE,并且任选地包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列(包含全部八个修饰)。

[0119] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下修饰:A226_P228delinsVKKS,并且任选地包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0120] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下的两个或更多个修饰:Q79_T84delinsRNSRRGIT,和/或H86N,和/或V88_V89delinsVI,和/或E91_P92delinsSR,和/或A136_I137delinsFV,和/或R199_Q202delinsPKKA,和/或S204_S205delinsKN,和/或W209R,和/或S211D,和/或T213R,和/或Q215V,和/或P219G,和/或S221_A222delinsQE,和/或A226_P228delinsVKKS,并且任选地包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0121] 在一些实施方案中,该酶相对于SEQ ID NO:1包含以下的两个或更多个修饰:Y275F,和/或V279_M280delinsFK,和/或K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS,并且任选地包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0122] 示例性的D1变体包括那些包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的变体。在一些实施方案中,本发明包括相对于SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16中的任何一个具有1至10个(例如1至5个)氨基酸插入、缺失或取代的衍生物。在一些实施方案中,D1变体包含来自同源DNA酶(例如,来自D1L3)的一个或多个其他嵌段氨基酸取代。此类嵌段取代可以用来自同源DNA酶(例如,D1L3,SEQ ID NO:2)的构建嵌段氨基酸置换D1变体的2至20个氨基酸,诸如3至15个

氨基酸,或3至10个氨基酸。图31中说明了D1和D1L3之间的构建嵌段取代。在一些实施方案中,DNA酶酶包含与SEQ ID NO:15至少95%或至少97%同一的氨基酸序列。

[0123] 在各种实施方案中,该酶表现出一种或多种选自以下的特性:与SEQ ID NO:1的酶相比,对无蛋白DNA相似或更高的亲和力;与SEQ ID NO:1的酶相比更高的染色质降解活性;与SEQ ID NO:1的酶相比,抗肌动蛋白抑制的酶促活性;及其组合。

[0124] 在一些实施方案中,如同针对D1L3所述的,D1变体包含N-端或C-端与半衰期延长部分(诸如白蛋白、转铁蛋白、Fc或弹性蛋白样蛋白)的融合。在一些实施方案中,D1酶通过免疫球蛋白铰链区二聚化。

[0125] 在各种实施方案中,D1变体表现出一种或多种选自以下的特性:相同或更高的无蛋白DNA(裸DNA)降解活性、更高的染色体DNA(染色质)降解活性、相似或提高的蛋白酶抗性、肌动蛋白抗性、相似或提高的从血液向尿液和/或胆汁的渗透,以及更高的在体外表达系统(例如中国仓鼠卵巢细胞和/或巴斯德毕赤酵母)中的生产水平,及其组合。

[0126] 在各种实施方案中,DNA酶酶包含与SEQ ID NO:1定义的酶的氨基酸序列至少80%同一的氨基酸序列,并且包含一个或多个精氨酸和/或赖氨酸残基的取代、插入或添加,其中DNA酶酶与SEQ ID NO:1的酶相比具有增加的染色质降解活性。在一些实施方案中,所述一个或多个精氨酸和/或赖氨酸残基是氨基酸取代,其选自与SEQ ID NO:1的位置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和280相对应的位置的取代。这些位置的示例性修饰包括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和K280M。在各种实施方案中,该酶包含至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个精氨酸和/或赖氨酸残基的取代和/或插入。在一些实施方案中,DNA酶酶在与SEQ ID NO:1的位置31、49、76、79、92、109、164、177、200、201、204、209、213和262相对应的一个或多个位置包含精氨酸或赖氨酸,所述位置任选地选自Q31R、Q49R、N76K、Q79R、P92R、D109K、A164K、Q177K、P200K、S201K、S204R、W209R、T213R、W209R和G262K。这些位置/取代可以独立提供更好的活性,包括降解染色质的活性。

[0127] 在各种实施方案中,如果酶包含Q31R或T227K取代,则该酶包含至少两个选自以下的氨基酸修饰: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和K280M。在一些实施方案中,氨基酸取代包括相对于SEQ ID NO:1的Q31R和T227K。

[0128] 在一些实施方案中,DNA酶酶在与SEQ ID NO:1的位置31、49、79和209相对应的位置具有精氨酸或赖氨酸,并且可以任选地包含以下氨基酸取代:Q31R、Q49K、Q79R和W209R。在鼠类D1中这些位置带有精氨酸或赖氨酸,但在野生型人D1中没有,可以将染色质降解活性转移给人D1。

[0129] 在一些实施方案中,DNA酶酶在与SEQ ID NO:1的位置31、49、79、177、209和262相对应的位置具有精氨酸或赖氨酸,并且可以任选地包含氨基酸取代Q31R、Q49K、Q79R、A136F、Q177K、W209R、G262K。在大鼠D1中这些位置中的四个具有精氨酸或赖氨酸,但在野生型人D1中没有,并且可以将染色质降解活性转移给人D1。

[0130] 在一些实施方案中,DNA酶酶在与SEQ ID NO:1的位置31和227相对应的位置具有赖氨酸或精氨酸残基。

[0131] 在一些实施方案中,DNA酶酶在与SEQ ID NO:1的位置164相对应的位置具有赖氨酸或精氨酸,其任选地是赖氨酸(A164K)。

[0132] 在各种实施方案中,工程化D1蛋白在肌动蛋白结合位点包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、添加和缺失)(例如,A136的取代,诸如A136F),从而阻碍或阻止肌动蛋白结合。因而,工程化D1蛋白可以是抗肌动蛋白的或基本上抗肌动蛋白的。参见Ulmer等人,PNAS USA第93卷,第8225-8229页(1996)。因此,在各种实施方案中,DNA酶酶相对于SEQ ID NO:1在位置136处包含氨基酸取代,并且该取代任选地是A136F。提供肌动蛋白抗性的D1突变,诸如位置136的突变(例如A136F,或该位置上另一大体积、疏水性、环状或芳族氨基酸的取代),可以与本文所述的任何其他突变组合,包括添加阳离子残基或构建嵌段取代。

[0133] 在一些实施方案中,D1变体对肌动蛋白抑制具有抗性并且能够降解染色质。例如,D1变体相对于SEQ ID NO:1可以包含以下氨基酸取代:Q31R、T227K和A136F。在一些实施方案中,DNA酶酶包括以下氨基酸取代:A164K和A136F。

[0134] 在一些实施方案中,DNA酶酶包含糖基化共有序列,其相对于SEQ ID NO:1包含N40S取代和/或N128S取代。例如,在一些实施方案中,所述酶相对于SEQ ID NO:1包含氨基酸取代:Q31R、N40S、A136F、N128S和T227K。

[0135] 在各种实施方案中,D1变体在糖基化位点中包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、添加、插入和缺失),从而增加了对脂质包封的DNA的亲和力。因而,工程化D1蛋白可以在转染反应中降解脂质包封的DNA。参见Wilber等人,Mol Ther 6,35-42(2002)。

[0136] 在各种实施方案中,D1变体是糖基化的,或者可以是非糖基化的,特别是在不需要长循环半衰期的情况下。本文所述的氨基酸改变可在糖基化或非糖基化变体的背景下产生。

[0137] 在一些实施方案中,D1变体对肌动蛋白抑制具有抗性并且能够降解脂质囊泡中的染色质。示例性的D1变体包含一个或多个选自以下的氨基酸修饰:Q31R、T227K、A136F、N40D或N40A和N128D或N128S,其氨基酸根据SEQ ID NO:1编号。此类变体可能缺乏糖基化位点,这从制造的角度来说是有益的。

[0138] 在一些实施方案中,D1变体对肌动蛋白抑制具有抗性并且能够降解脂质囊泡中的染色质,并且相对于SEQ ID NO:1包含氨基酸修饰Q31R、T227K、A136F、N40D和N128D。

[0139] 对D1的其他修饰可以如Pan等人J Biol Chem,1998,273,11701-11708和US 2014/0199329所述,其全部公开内容通过引用整体并入本文。

[0140] 与野生型D1蛋白(SEQ ID NO:1)相比,工程化D1变体可以具有增加或延长的血清半衰期。在一些实施方案中,工程化D1包含Fc融合结构域(例如,免疫球蛋白的铰链区和/或CH2结构域和CH3结构域)。在一些实施方案中,工程化D1与白蛋白,例如人白蛋白或其片段融合。白蛋白可以任选地通过氨基酸接头与工程化D1酶的N端或C端连接。

[0141] 在一些方面,本发明提供了药物组合物,其包含重组D1L3和/或D1变体,或编码所述变体的多核苷酸或载体,以及药学上可接受的载剂。在各种实施方案中,将重组D1L3蛋白变体配制用于肠胃外或肺部施用。在一些实施方案中,将组合物配制用于静脉内、动脉内、腹膜内、关节内、肌内、局部或皮下,或本文所述的其他途径施用。在一些实施方案中,所述

组合物包含D1L3和D1两者,其各自任选地是本文所述的工程化变体。在一些实施方案中,将重组D1L3变体和重组D1变体配制用于肠胃外或肺部施用。

[0142] 术语“药学上可接受的载剂”包括但不限于不干扰成分的生物学活性的有效性并且对所施用的患者无毒的任何载剂。合适的药物载剂的实例是本领域公知的,包括磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(诸如油/水乳液)、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。此类载剂可以通过常规方法配制,并且可以以合适的剂量施用给受试者。优选地,组合物是无菌的。这些组合物也可以含有佐剂,诸如防腐剂、乳化剂和分散剂。可以通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂来确保对微生物作用的防御。

[0143] 施用途包括例如:皮内、肌内、腹膜内、关节内、静脉内、皮下、动脉内、经口、舌下、肺部或透皮。在一些实施方案中,所述施用通过经口或通过肠胃外注射或输注来实现。在一些实施方案中,施用途是局部的,包括作为滴眼剂或漱口水。

[0144] 在其他方面,本发明提供了制备用于减少或预防中性粒细胞胞外诱捕网(NET)积聚的药物组合物的方法。在这些实施方案中,本发明采用在D1和D1L3活性以及G-CSF多核苷酸的异源表达(例如,在肝细胞中)或诱导持续的内源性G-CSF表达(例如,通过重复施用微生物化合物)方面有缺陷的遗传修饰小鼠。该小鼠模型积聚NET,并迅速发展NET相关的血管闭塞。在这些实施方案中,本发明包括向遗传修饰小鼠施用候选NET抑制剂或候选DNA酶酶(包括根据本公开的D1L3或D1变体),并选择减少NET积聚的NET抑制剂或DNA酶酶。配制选定的抑制剂或酶(如上所述)向人类患者施用。

[0145] 本领域技术人员认识到产生双敲除DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠的标准方法。详细描述可以在例如欧洲申请号EP 17152528.0中找到。

[0146] 在一些方面,本发明提供了一种用于治疗需要中性粒细胞胞外诱捕网(NET)降解的受试者的方法。根据本公开,该方法包括施用治疗有效量的本文所述的D1L3和/或D1(其可以包括本文所述的变体,或在一些实施方案中,包括一种或多种野生型酶,包括用于D1L3和D1组合疗法)。D1L3或D1可以作为包含重组蛋白,或在一些实施方案中包含编码DNA或RNA或包含其的载体的药物组合物施用。

[0147] 在一些实施方案中,该方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体和D1或其变体。D1L3或其变体,以及D1或其变体,可以以单一药物组合物或单独的药物组合物的形式施用。在一些实施方案中,D1L3或其变体与D1或其变体的比率在按质量计100:1至1:100,或按质量计10:1至1:10的范围内,并且任选地为约1:1。

[0148] 在一些实施方案中,受试者表现出受损的NET降解和/或表现出病理性NET积聚。在一些实施方案中,受试者患有慢性或急性炎症病症。在一些实施方案中,受试者患有急性或慢性感染。

[0149] 在各种实施方案中,本发明涉及以NET的存在或积聚为特征的疾病或疾患的治疗。此类疾病或疾患包括但不限于与以下相关的疾病:慢性中性粒细胞增多症(例如,中性粒细胞数目增加)、中性粒细胞聚集和白细胞淤滞、血栓形成和血管闭塞(例如,镰状细胞病)、缺血-再灌注损伤(例如,中肠扭转、睾丸扭转、肢体缺血再灌注、重要器官缺血再灌注、器官移植)、手术和创伤性组织损伤、急性或慢性炎症响应或疾病、自身免疫性疾病(例如,全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、脉管炎、全身性硬化症)、心血管疾病(例如,心肌梗塞、中风、动脉粥样硬化、静脉血栓栓塞症,包括溶血栓疗法)、代谢性疾病(例如,糖

尿病)、全身炎症(例如,全身炎症响应综合征(SIRS)、脓毒症、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和血栓形成性微血管病(TMA))、呼吸道炎症性疾病(例如,囊肿性纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性肺损伤(ALI)、烟致肺损伤、输血诱发的肺损伤(TRALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和哮喘、肺膨胀不全、支气管炎、积脓)、肾脏炎症性疾病(急性和慢性肾病,包括急性肾损伤(AKI)和慢性肾脏病(CKD))、与移植组织相关的炎症性疾病(例如,移植物抗宿主病)和癌症(例如,白血病、肿瘤转移和实体瘤)。

[0150] 在一些实施方案中,所述受试者具有闭塞导管系统的NET或处于该风险中。本发明可以施用于受试者以治疗胰腺炎、胆管炎、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。在此类实施方案中,该方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体和/或治疗有效量的D1或其变体。例如,可以向受试者施用包含与SEQ ID NO:2所定义的酶具有80%或更高的序列同一性的氨基酸序列的酶,以及包含与SEQ ID NO:1所定义的酶具有80%或更高的序列同一性的氨基酸序列的酶。在一些实施方案中,所述酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序列和由SEQ ID NO:1定义的酶的氨基酸序列。

[0151] 在一些实施方案中,所述导管系统是胆管、泪管、输乳管、胆囊管、肝管、射精管、腮腺管、下颌下腺管、舌下腺大管、巴多林氏管、大脑导水管、胰腺、乳腺、输精管、输尿管、膀胱、胆囊和肝脏。例如,受试者可以患有胰腺炎、胆管炎(例如原发性硬化性胆管炎)、结膜炎、乳腺炎、干眼病、输精管阻塞或肾病。在一些实施方案中,DNA酶通过静脉内、动脉内或腹膜内施用来施用。在各种实施方案中,当例如静脉内施用时,DNA酶将以酶促活性形式存在于各种导管系统中,例如存在于胆汁中。

[0152] 在一些实施方案中,受试者在内皮表面(例如手术粘连)、皮肤(例如创伤/瘢痕)上,或在滑膜关节(例如痛风和关节炎)中具有NET积聚或处于NET积聚风险中。本发明可以施用于受试者以治疗以内皮表面上NET积聚为特征的疾患,诸如但不限于手术粘连。在各种实施方案中,本发明可以施用于受试者以治疗以皮肤上NET积聚为特征的疾患,诸如但不限于创伤和瘢痕。在某些实施方案中,本发明可以施用于受试者以治疗以滑膜关节中NET积聚为特征的疾患,诸如但不限于痛风和关节炎。

[0153] 在一些实施方案中,受试者患有包含NET的血管闭塞或处于血管闭塞的风险中。在此类实施方案中,该方法包括施用治疗有效量的D1L3或其变体,和/或治疗有效量的D1或其变体。例如,可以向受试者施用包含与SEQ ID NO:2定义的酶具有80%或更高的序列同一性的氨基酸序列的酶。在一些实施方案中,该酶包含由SEQ ID NO:2定义的酶的氨基酸序列。在一些实施方案中,进一步向受试者施用包含与SEQ ID NO:1定义的酶具有80%或更高的序列同一性的氨基酸序列的酶,诸如SEQ ID NO:1定义的酶。

[0154] 在一些实施方案中,受试者患有与NET有关的疾患,如W02016/118476和US 9,642,822中所述,其特此通过引用整体并入本文。

[0155] 在各种实施方案中,所述受试者患有有用或已经用野生型DNA酶(包括D1和链道酶)治疗的疾病。此类疾病或疾患包括血栓形成、中风、脓毒症、肺损伤、动脉粥样硬化、病毒感染、镰状细胞病、心肌梗塞、耳部感染、创伤愈合、肝损伤、心内膜炎、肝脏感染、胰腺炎、原发性移植物功能障碍、肢体缺血再灌注、肾脏损伤、凝血、明矾诱发的炎症、肝肾损伤、胸膜渗出物、血胸、胆道内血块、后气动贫血、溃疡、耳鼻喉科疾患、口腔感染、轻伤、鼻窦炎、术后鼻整形、不育、膀胱导管、创伤清洁、皮肤反应测试、肺炎球菌性脑膜炎、痛风、腿部溃疡、囊性

纤维化、卡塔格内综合征、哮喘、肺叶膨胀不全、慢性支气管炎、支气管扩张、狼疮、原发性纤毛运动障碍、细支气管炎、脓胸、胸膜感染、癌症、干眼病、下呼吸道感染、慢性血肿、阿尔茨海默氏病和阻塞性肺病。

[0156] 在某些实施方案中，本发明涉及以D1缺陷、D1L3缺陷以及D1和D1L3缺陷为特征的疾病或疾患的治疗。在一些情况下，受试者在DNA酶1和/或DNA酶113基因中具有突变。此类受试者还可以患有自身免疫性疾病(例如，SLE、全身性硬化症)或炎性疾病。在一些情况下，受试者具有获得性的D1抑制剂(例如，抗DNA酶1抗体和肌动蛋白)和/或D1L3抑制剂(例如，抗DNA酶113抗体)。此类受试者还可以患有自身免疫性疾病(例如，SLE、全身性硬化症)或炎性疾病(例如，脓毒症和局部缺血再灌注损伤)。

[0157] 在一些实施方案中，受试者患有囊性纤维化，并且所述DNA酶组合物通过肺部递送进行施用。

[0158] 在各种实施方案中，例如，在受试者处于NET相关的血管闭塞的风险中或表现出NET相关的血管闭塞的症状的情况下，蛋白质或组合物(例如，包含D1L3、D1，或D1L3或D1的变体，包括本文所述的变体)可以静脉内、肌内、皮下或动脉内施用。

[0159] 在各种实施方案中，监测受试者的血液、血浆或血清的NET降解活性。例如，可以对受试者进行约一周至约周的监测，以降低NET引起的血管或导管闭塞或与NET相关的器官损伤的风险。在一些实施方案中，根据需要，受试者可以在一周至一个月(或1-2周)的过程中接受1-4次施用，以预防或减少急性感染或炎症事件期间的血管内NET积聚(包括NET相关的血管内闭塞)。在其他实施方案中，受试者可以在一小时至一个月(或1-2周)的过程中接受连续输注。在一些情况下，在重大疾病如脓毒症、中风或心肌梗塞的情况下，受试者可以每天接受至少一次，例如(但不限于)1、2、3、4次或更多次输注。

[0160] 与NET有关的疾病或疾患的治疗可涉及D1变体、D1L3变体或包含D1变体和D1L3变体的组合的施用。在一些实施方案中，施用本文所述的D1蛋白的两种或更多种变体。在一些实施方案中，施用本文所述的D1L3蛋白的两种或更多种变体。

[0161] 本发明的D1蛋白变体和D1L3蛋白变体可以作为预防性疗法，诸如在疾病或疾患的一种或多种症状发作之前施用。

[0162] 如本文所用，“治疗(treatment/treating/treated)”是指治疗性治疗，其中目的是减缓(减轻)不期望的生理疾患、病症或疾病，或获得有益的或期望的临床结果。有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的缓解；所述疾患、病症或疾病程度的减弱；所述疾患、病症或疾病状态的稳定(即，不恶化)；所述疾患、病症或疾病发作的延迟或进展的减缓；所述疾患、病症或疾病状态的转佳；和所述疾患、病症或疾病的缓解(部分或全部)(可检测的或不可检测的)，或增强或改善。治疗包括引发临床上显著的响应，而无过度水平的副作用。在其他实施方案中，“治疗”是指预防措施，其中目的是延迟不期望的生理疾患、病症或疾病的发作或减轻其严重程度，例如是易感疾病的人(例如，携带疾病如狼疮的遗传标志物的个体)。

[0163] 在本发明的方法中，疗法用于提供针对疾病或疾患的积极治疗响应。“积极治疗响应”是指疾病或疾患的改善和/或与疾病或疾患相关的症状的改善。例如，积极治疗响应是指该疾病的以下一种或多种改善：(1)中性粒细胞胞外诱捕网减少；(2)血管内凝块减少；(3)导管凝块减少；(4)滑膜关节中NET的积聚减少；(5)中性粒细胞胞外诱捕网的降解增加；

(6) 胞外无蛋白DNA的降解增加; (7) 胞外染色体DNA或蛋白质结合的DNA的降解增加; (8) 在自身抗体的存在下中性粒细胞胞外诱捕网的降解增加; (9) 组织/器官炎症减少; (10) 组织/器官损伤减少; (11) 组织/器官萎缩减少; (12) 患者存活率增加; 以及 (13) 与所述疾病或疾患相关的一种或多种症状的减轻。

[0164] 可以通过对所述疾病或疾患有特异性的标准化响应标准来确定任何指定疾病或疾患中的积极治疗响应。可以使用筛查技术 (诸如磁共振成像 (MRI) 扫描、超声扫描、组织学方法和循环中的NET计数) 来评估临床响应的血管闭塞变化及NET的存在。除了这些积极治疗响应外, 接受治疗的受试者可体验到与该疾病相关的症状改善的有益效果。

[0165] 调整剂量方案以提供最佳的期望响应 (例如, 治疗响应)。例如, 可以施用单一大剂量, 可以随时间推移施用若干分剂量, 或者可移按治疗情形的紧急程度所示, 按比例减少或增加剂量。肠胃外组合物可以配制成剂量单位形式以便于施用和剂量的均一性。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的物理离散单位; 每个单位含有经计算会产生所需治疗效果的预定量的活性化合物及所需的药物载体。

[0166] 在各种实施方案中, 本发明提供了包含编码本文所述的野生型或D1L3或D1变体的核酸的表达载体, 其可用于基因疗法。基因疗法可用于慢性疾病, 诸如D1L3和/或D1的遗传缺陷 (诸如有害突变)。在各种实施方案中, 表达载体包含DNA或RNA。在各种实施方案中, 表达载体是哺乳动物表达载体。

[0167] 在一些实施方案中, 表达载体包含编码蛋白质变体的核酸, 其与在宿主细胞 (例如原核、真核或哺乳动物细胞) 中具有功能性的表达控制区或其补体可操作地连接。表达控制区能够驱动可操作地连接的编码阻断剂和/或刺激剂的核酸的表达, 使得在经该表达载体转化的人细胞中产生阻断剂和/或刺激剂。

[0168] 表达控制区是影响可操作地连接的核酸的表达的调节性多核苷酸 (有时在本文中称为元件), 诸如启动子和增强子。本发明表达载体的表达控制区能够在人细胞中表达可操作地连接的编码核酸。在一个实施方案中, 表达控制区赋予可操作地连接的核酸可调节的表达。信号 (有时称为刺激) 可以增加或减少与此类表达控制区可操作地连接的核酸的表达。此类响应于信号而增加表达的表达式控制区通常被称为诱导型。此类响应于信号而降低表达的表达式控制区通常称为抑制型。通常, 此类元件赋予的增加或减少的量与存在的信号的量成正比。信号量越大, 表达的增加或减少越大。

[0169] 在人细胞中具有功能性的表达系统是本领域众所周知的, 并且包括病毒系统。通常, 在人细胞中具有功能性的启动子是能够结合哺乳动物RNA聚合酶并启动编码序列的下游 (3') 转录成mRNA的任何DNA序列。启动子将具有转录起始区, 其通常位于编码序列的5'末端附近, 并且通常是位于转录起始位点上游25-30个碱基对的TATA框。TATA框被认为可以指导RNA聚合酶II在正确的位置开始RNA合成。启动子通常还将含有上游启动子元件 (增强子元件), 其通常位于TATA框上游100至200个碱基对以内。上游启动子元件决定转录起始的速率, 并且可以在任一方向上起作用。作为启动子特别有用的是来自哺乳动物病毒基因的启动子, 因为病毒基因常常高度表达并且具有广泛的宿主范围。实例包括SV40早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子、单纯疱疹病毒启动子和CMV启动子。

[0170] 在适当的情况下, 也可以采用基因递送剂, 诸如整合序列。许多整合序列是本领域已知的 (参见, 例如, Nunes-Duby等人, *Nucleic Acids Res.* 26:391-406, 1998; Sadwoski,

J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122 (3):322-325, 2005; Plasterk 等人, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra 等人, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)。这些包括重组酶和转座酶。实例包括 Cre (Sternberg 和 Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981)、lambda (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974)、Flp (Broach 等人, Cell, 29:227-234, 1982)、R (Matsuzaki 等人, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990)、cpC31 (参见, 例如, Groth 等人, J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004)、睡美人 (sleeping beauty)、水手家族的转座酶 (Plasterk 等人, 同上) 以及用于整合具有提供病毒整合的组件的病毒 (诸如 AAV、逆转录病毒和抗病毒) 的组件 (诸如逆转录病毒或慢病毒的 LTR 序列和 AAV 的 ITR 序列) (Kootstra 等人, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)。另外, 直接和靶向遗传整合策略可用于插入编码嵌合融合蛋白的核酸序列, 包括 CRISPR/CAS9、锌指、TALEN 和大范围核酸酶基因编辑技术。

[0171] 引用的所有参考文献明确地通过引用整体并入。

[0172] 实施例

[0173] 实施例 1: 宿主 DNA 酶预防中性粒细胞胞外诱捕网引起的血管闭塞

[0174] 在止血和血栓形成中血小板和纤维蛋白凝块会使血管闭塞。在这里, 我们报告了基于中性粒细胞胞外诱捕网 (NET), 由活化的中性粒细胞释放的抗微生物 DNA 纤维的非经典血管闭塞机制。我们证实两种 DNA 酶, 即 DNA 酶 1 和 DNA 酶 1 样 3, 在鼠类炎症发作期间会降解循环中的 NET。在两种 DNA 酶均不存在的情况下, 血管内 NET 会形成凝块, 凝块会闭塞血管并造成器官损伤。患有严重细菌感染的患者中血管闭塞与离体 NET 降解的缺陷和血管内 NET 凝块的形成相关。DNA 酶 1 和 DNA 酶 1 样 3 独立表达, 并从而提供针对炎症中的 NET 有害作用的双重宿主保护。

[0175] 炎症是控制入侵微生物和治愈受损组织必不可少的宿主响应 (1)。在多种炎症病症中不受控制的且持续性炎症会导致组织损伤。中性粒细胞是急性炎症中的主要白细胞。在感染期间, 中性粒细胞会产生胞外诱捕网 (NET), 即装饰有毒性组蛋白及固定并中和细菌的酶的 DNA 细丝网 (2)。NET 在宿主防御中的相关性通过以下事实得以说明: 胞外 DNA 酶在几种致病细菌中充当毒力因子 (3, 4)。然而, 释放不当的 NET 可能因其细胞毒性、促炎性和促血栓形成活性而损害宿主细胞 (5-7)。实际上, NET 经常与炎性或缺血性器官损伤相关, 并且在各种动物模型中 DNA 酶的治疗性输注限制了宿主损伤 (8, 9)。

[0176] 对于宿主如何降解体内的 NET 以限制炎症发作期间的组织损伤知之甚少。早期研究已证实血清中的 DNA 酶 1 会消化体外 NET 的 DNA 骨架 (10)。我们通过酶谱法分析了野生型小鼠的血清, 并检测到两种酶促活性的 DNA 酶, 即 DNA 酶 1 和 DNA 酶 1 样 3 [DNA 酶 113] (图 1A)。两种酶都是 DNA 酶 1 蛋白家族的成员, 但是它们的来源和底物亲和力不同。DNA 酶 1 由非造血组织表达, 并优先裂解无蛋白 DNA (11, 12)。DNA 酶 113, 也称为 DNA 酶 γ , 是由免疫细胞分泌的并且靶向 DNA-蛋白复合物, 诸如核小体 (11, 13)。我们产生了由于 DNA 酶 1 和 DNA 酶 113 的组合缺陷而在血清中缺乏 DNA 降解活性的小鼠 (图 1A)。暴露于 DNA 酶 1/DNA 酶 113^{-/-}血清后, 体外产生的 NET 保持完整, 而来自野生型、DNA 酶 1^{-/-}和 DNA 酶 113^{-/-}小鼠的血清降解 NET (图 1B 和图 1C)。我们将肝细胞特异性表达质粒连同流体动力学基因递送一起使用, 以在 DNA 酶 1/DNA 酶 113^{-/-}小鼠的肝脏中稳定地表达 DNA 酶 1 或 DNA 酶 113 的 cDNA。考虑到两种酶均含有分泌蛋白信号序列 (11), 则该方法恢复了循环中 DNA 酶 1 或 DNA 酶 113 的活性 (图 1D) 以及来自 DNA 酶 1/

DNA酶113^{-/-}小鼠的血清降解NET的能力(图1E和图1F)。总的来说,这些数据表明两种独立表达的宿主酶DNA酶1和DNA酶113降解体外的NET。

[0177] 为了测试体内NET降解对DNA酶1和DNA酶113的需求,我们旨在用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)长期刺激野生型、DNA酶1^{-/-}、DNA酶113^{-/-}和DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠。G-CSF触发中性粒细胞增多症,这是急性炎症的标志,并且刺激中性粒细胞亚群离体自发释放NET(14)。我们将编码G-CSF的CSF3的cDNA克隆到肝细胞特异性表达质粒中。为野生型小鼠流体力学注射CSF3质粒导致血浆中G-CSF的水平长期升高(图5A)。因此,中性粒细胞血细胞计数稳定增加,并且在血液涂片中检测到自发形成的NET(图2A和图2B)。我们进一步观察到重要器官中的常驻型中性粒细胞的数量增加和脾大(图5B和图5C)。重要的是,注射CSF3的野生型小鼠正常生长,未发展器官损伤,并且没有表现出窘迫或异常行为的宏观体征(图5D和图5E)。总体而言,这些数据表明在野生型小鼠中,伴有NET形成的慢性中性粒细胞增多症耐受良好。

[0178] 接下来,我们在DNA酶1^{-/-}、DNA酶113^{-/-}和DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠的肝脏中稳定表达CSF3。具有DNA酶1或DNA酶113单一缺陷的小鼠未显示出窘迫体征(未示出),而具有组合缺陷的所有小鼠在注射CSF3后的6天内死亡(图2C)。接受缺乏CSF3的对照质粒的DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠存活,未显示出任何异常(图2C,未示出)。我们使DNA酶1或DNA酶113与CSF3在DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠中共表达,以诱导中性粒细胞增多症和NET,并同时恢复循环中的DNA酶1或DNA酶113。任一DNA酶的表达都足以使DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠存活而不显示出任何窘迫体征(图2D)。共表达CSF3与缺少DNA酶1和DNA酶113的对照质粒的DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠在基因递送后的5天内死亡(图2D)。在这些小鼠中的死亡之前快速进展体温过低,这被证明是在死亡前8小时内外周体温剧烈降低(图2E)。体温过低伴有通过红色血浆和尿液的溶血性贫血及血液血红蛋白减少(图2F和图2G)。血液涂片中丰富的裂红细胞表明溶血性贫血是由红细胞片段化引起的(图2H)。此外,我们检测到乳酸脱氢酶(LDH)、肝转氨酶和肾损伤标志物即血尿素氮和肌酐的血浆水平升高,这表明存在多器官损伤(图2I、图6A和图6B)。DNA酶1或DNA酶113与CSF3的共表达维持体温以及红细胞和器官的完整性(图2E至图2I;图6A和图6B)。总之,这些数据表明,DNA酶1或DNA酶113是预防慢性中性粒细胞增多症期间的宿主损伤所需的。

[0179] 患有慢性中性粒细胞增多症的DNA酶1/DNA酶113^{-/-}小鼠的组织学分析显示,带有捕获的红细胞的血管内苏木精阳性凝块完全或部分闭塞了肺部、肝脏和肾脏中的血管(图3A和图3B;图6C和图6D)。循环中的DNA酶1或DNA酶113的表达预防了这些血管闭塞。苏木精阳性凝块显示出丰富的浅紫色染色图案,其零星地点缀着单个白细胞核的深紫色染色,表明去凝聚的DNA是主要的凝块组分(图3A)。鉴于紧密堆积的染色质的核分解和去折叠是NET形成的标志(15),我们对苏木精阳性凝块的NET标志物进行染色。我们用荧光双链DNA嵌入染料和抗染色质的抗体观察到稳健染色(图7A)。去凝聚的染色质与中性粒细胞颗粒来源的酶即髓过氧化物酶、抗微生物抗菌肽(cathelicidin)和NET替代标志物即瓜氨酸化组蛋白的共定位证实凝块由NET组成(图3C、图7B和图7C)。为了确定典型血栓的组分,我们对NET凝块中的纤维蛋白和冯维勒布兰德因子(vWF)进行了染色,冯维勒布兰德因子是储存在血小板和血管内皮的分泌囊泡中的蛋白质。NET凝块的vWF和纤维蛋白含量非常不均一(图3D和图3E)。NET凝块的横截面平均被46%的vWF覆盖,而9%的NET凝块没有vWF染色(图3E和图

3F)。很大程度上不存在纤维蛋白,并且在少于23%的闭塞血管中检测到了纤维蛋白(图3E)。这些数据与在体外NET用作非纤维蛋白依赖性支架以固定血小板和红细胞的发现相符(6)。在一些凝块中不存在vWF和纤维蛋白表明NET可能足以闭塞血管。为了确证这一观点,我们旨在从体外的纯中性粒细胞中产生NET凝块。我们从血液中分离出中性粒细胞并诱导NET形成,同时将细胞暴露于剪切力以模拟血流。在这种设置中,我们观察到宏观上可见且对DNA酶敏感的凝块(图8A),其类似于鼠脉管系统中NET凝块的外观(图8B)。现在,我们耗竭来自循环的血小板,并在药理学上抑制凝血酶以阻断表达CSF3的DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠中的纤维蛋白形成。与DNA酶1-或DNA酶113-的表达不同,抗血栓治疗都不能预防这些动物中的死亡(图3H)。总体而言,数据表明在DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠的慢性中性粒细胞增多症期间,NET凝块足以闭塞血管。

[0180] DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠中NET凝块的形成与患者中感染诱发的血栓形成性微血管病(TMA)和弥漫性血管内凝血的特征(包括裂红细胞、溶血性贫血和由于血管闭塞引起的器官衰竭)相关。我们分析了由于感染产生志贺毒素的大肠埃希氏菌而患有溶血尿毒综合征的TMA患者的血浆[STEC-HUS, (16)]。脓毒症和脓毒性休克是这些患者中的常见并发症(17)。体外生成的NET在暴露于在急性疾病状态下收集的患者血浆后仍保持完整,而来自缓解中患者的血浆降解NET(图9A和图9B)。数据指示了NET降解中的获得性和暂时性缺陷,从而扩展了先前的报告(18,19)。值得注意的是,STEC-HUS患者用包括输注来自健康供体的血浆的方案得到有效治疗(17),健康供体血浆是可能会恢复NET降解的DNA酶的来源。

[0181] 据报道大的NET聚集体形成于患者的滑液和胰管中(21,22),但尚未在其他组织中有描述。因此,我们旨在鉴定严重炎症性疾病患者的血管内NET聚集体。我们筛选了在尸检时从急性呼吸窘迫综合征和/或脓毒症患者中收集的肺组织(图10)。我们在两名脓毒症患者的血管中检测到苏木精阳性凝块(图11A和图11C)。在两种情况下,凝块均由染色质和MPO组成(图11B和图11D),表明在人脓毒症中NET可以形成血管内凝块。

[0182] 败血病是小鼠中血管内NET形成的有效且迅速的触发因素(7)。因此,我们假设NET降解缺陷可加重疾病。实际上,我们观察到具有DNA酶1和DNA酶113组合缺陷的小鼠(而非野生型小鼠)对低剂量的脂多糖和热灭活的大肠埃希氏菌高度易感(图4A)。与嗜中性DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠类似,败血性DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠的血液分析显示出溶血性贫血和血尿(图4B和图4C),以及血液涂片中血浆LDH和裂红细胞的水平增加(图4D和图4E)。此外,我们在肺部检测到丰富的部分或完全闭塞的血管(图4F和图4G)。对部分闭塞的血管的详细分析揭示血管腔内有NET凝块(图4H)。在完全闭塞的血管中,NET凝块充满被捕获的红细胞和白细胞(图4I;图12A和图12B)。重要的是,DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠中肝脏表达DNA酶1或DNA酶113预防了血管闭塞并且恢复了野生型表型。总的来说,这些数据表明循环的DNA酶1或DNA酶113防止败血病中NET凝块的形成和宿主损伤。

[0183] 总之,虽然血小板和纤维蛋白会形成止血凝块和病理性血栓(23),但是我们的数据将NET凝块作为炎症状态下血管闭塞的非经典机制进行介绍。与纤维蛋白链相似,NET是超大且稳定的分子(6)。在高浓度下,诸如在慢性中性粒细胞增多症或败血病中发现的那样,血管内NET可以形成凝块,凝块的大小足以闭塞血管并从而对红细胞和器官造成损害。为了在炎症期间维持血液和组织的完整性,宿主独立表达DNA酶1和DNA酶113作为对血管内NET的双重保护系统。然而,这些宿主因素中的获得性和遗传性缺陷可延迟NET的降解,并从

而突然引发疾病。获得性缺陷可能涉及受损组织外部化的单体肌动蛋白引起的DNA酶1抑制和血清蛋白酶引起的DNA酶113失活(11)。已在患者中鉴定出DNA酶1和DNA酶113中的突变,并且与全身性红斑狼疮(SLE)(一种全身性自身免疫疾病)相关(24,25)。有趣的是,DNA酶1和DNA酶113缺陷小鼠随着年龄的增长会自发地发展SLE样疾病(13,26)。NET由主要的自身抗原组成,并且来自SLE患者的中性粒细胞释放NET的能力增强(27)。清除能力降低可能增加NET半衰期,并从而促进自身免疫疾病(10,27)。总之,宿主DNA酶的缺陷可导致NET在多种炎症性疾病中的有害作用。

[0184] 因此,DNA酶1-和DNA酶113-介导的NET降解为患有炎症疾患的患者提供了诱人的治疗机会。为了测试DNA酶1和DNA酶113是通过相同的还是不同的机制降解NET,我们使用固定剂使NET中的蛋白质交联。固定的NET被DNA酶113-/-血清有效地降解,但是对DNA酶1-/-血清的降解具有抗性(图13A和图13B)。与这些结果一致,将NET暴露于重组DNA酶1或DNA酶113显示两种DNA酶均降解未进行实验的NET(图13C和图13D),而固定的NET对DNA酶113活性具有抗性(图13E和图13F)。总的来说,这些体外数据表明DNA酶1和DNA酶113通过不同的机制降解NET。

[0185] 最后,我们比较了DNA酶1和DNA酶113在小鼠向人类循环中的活性。为了区分DNA酶1和DNA酶113活性,我们生成了针对人DNA酶1(α -hDNA酶1)的抗体,该抗体阻断了正常健康供体(NHD)血浆中的DNA酶1活性(图14A)。肝素是DNA酶113的已知抑制剂,并用于阻断DNA酶113的DNA降解活性(图14B)。鼠血浆显示出为人血浆的大约10倍的总DNA酶活性(图14C)、DNA酶1活性(图14D)和DNA酶113活性(图14E)。此外,鼠血浆中而不是人血浆中的DNA酶113有效地降解NET(图14F和图14G)。数据表明,人体循环中的DNA酶113浓度不足以降解NET。因此,使得患者中DNA酶113介导的NET降解成为一种新型且有前景的炎症性疾病治疗策略。

[0186] 材料和方法

[0187] 患者血浆

[0188] 在2011年德国STEC-HUS爆发期间,从患者中获得了柠檬酸盐化的血浆样品(16)。纳入我们研究的标准是对STEC/肠出血性大肠埃希氏菌或血性腹泻的鉴定为阳性,血小板计数 $\leq 150 \times 10^9/L$ 或在1周内下降 $\geq 25\%$,有溶血体征(LDH高于正常限值,触珠蛋白低于正常限值,或存在裂红细胞)和急性肾损伤期 ≥ 1 。

[0189] 人体组织

[0190] 将人体组织在室温下于5%磷酸盐缓冲的福尔马林中固定过夜。所有组织均在尸检时收集,并最初出于诊断的目的提交给我们,并根据国家伦理原则进行研究。患者的死亡原因在图10中示出。

[0191] 小鼠

[0192] 所有小鼠都具有C57BL/6遗传背景。我们使先前描述的DNA酶1-/-和DNA酶1样3-/-小鼠杂交(26,28)以产生DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠。最近有报道称这种DNA酶1-/-小鼠品系在编码线粒体伴侣的DNA酶1重叠基因Trap1/Hsp75中含有脱靶突变(29)。因此,我们纳入替代性的DNA酶1-/-品系(30)以产生DNA酶1/DNA酶113-/-小鼠用于对照实验(图15A-图15C)

[0193] 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳酶谱法(DPZ)检测DNA酶1

[0194] 如前所述在有修改的情况下,我们进行了DPZ(19)。简言之,十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶是用4%(v/v)不含DNA的积层凝胶和10%(v/v)含有200 μ g/ml鲑鱼

睾丸DNA的分离凝胶(Sigma-Aldrich,Germany)制备的。为了检测DNA酶1,将0.5 μ l鼠血清与14.5 μ l水和5 μ l SDS凝胶上样缓冲液(BioRad,Germany)混合。将混合物煮沸5分钟,并上样到凝胶上。在120V下使用Tris/甘氨酸电泳缓冲液(25mM Tris、192mM甘氨酸、0.1% (w/v) SDS,pH 8.7)进行电泳。电泳后,通过将凝胶在37 $^{\circ}$ C下于再折叠缓冲液中孵育过夜而使蛋白质再折叠,再折叠缓冲液含有5% (w/v) 奶粉、10mM Tris/HCl pH 7.8、3mM CaCl₂、3mM MgCl₂、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素。将凝胶转移至不含奶粉的再折叠缓冲液,并在37 $^{\circ}$ C下再孵育24小时。用1x SYBR Safe(Thermo Scientific,Germany)对DNA进行荧光标记,并使用荧光扫描仪(Molecular Imager FX,BioRad,Germany)记录凝胶的荧光图像。

[0195] 通过DPZ检测DNA酶113

[0196] 为了检测DNA酶113,将2 μ l血清与12 μ l水、5 μ l SDS凝胶上样缓冲液和1 μ l β -巯基乙醇(BME,Sigma-Aldrich)混合。BME还原DNA酶1的二硫桥,导致其失活(11)。将混合物煮沸5分钟,并上样到凝胶上。如对于DNA酶1所述进行电泳。通过在50 $^{\circ}$ C下用10mM Tris/HCl pH 7.8两次洗涤凝胶30分钟,来去除SDS。通过将凝胶在37 $^{\circ}$ C下在含有10mM Tris/HCl pH 7.8、1mM BME、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的再折叠缓冲液中孵育48小时来使蛋白质再折叠。然后将凝胶在37 $^{\circ}$ C下在补充有3mM CaCl₂和3mM MnCl₂的再折叠缓冲液中再孵育48小时。Mn²⁺的添加是使DNA酶113能够有效降解无蛋白DNA所需的(11)。如对于DNA酶1所述那样对DNA进行标记并成像。

[0197] 通过单径向酶扩散(SRED)测定法检测总DNA酶活性

[0198] 为了测量总DNA酶活性,我们将来自鲑鱼睾丸的55 μ g/ml DNA溶解在含有Mn²⁺的缓冲液(20mM Tris-HCl pH 7.8、10mM MnCl₂、2mM CaCl₂和2x SYBR Safe)中。将DNA溶液在50 $^{\circ}$ C下加热10分钟,并与等体积的2%超纯琼脂糖(Thermo Scientific)混合。将混合物倒入塑料托盘中,并在室温下储存直至固化。将2 μ l鼠血清上样到直径为1.0mm的孔中。将凝胶在湿度箱中于37 $^{\circ}$ C孵育4小时。用荧光扫描仪记录凝胶的DNA荧光。

[0199] 体外NET降解测定

[0200] 如前所述分析NET降解(19)。将无血清DMEM中纯化的人中性粒细胞以每孔5x 10⁴个细胞的浓度接种到涂有0.001%聚赖氨酸(Sigma)的无菌96孔板(Falcon,BD Technologies,Germany)。为了诱导NET形成,中性粒细胞用100nM佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA;Sigma-Aldrich)在37 $^{\circ}$ C及5%CO₂和湿度下活化4小时。我们添加了磷酸盐缓冲盐水(PBS),并将96孔板在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。将NET用PBS洗涤,用含有0.5%Triton X-100的PBS处理5分钟,并再次用PBS洗涤。将NET与补充有10 μ M PPACK(Santa Cruz,Heidelberg,Germany)的10%鼠血清或10%柠檬酸化的人血浆一起在含二价阳离子的HBSS(HBSS+;Thermo Scientific)中孵育。使NET在37 $^{\circ}$ C及5%CO₂和湿度下降解3小时。我们丢弃上清液,并通过在PBS中添加2%PFA,在室温下保持1小时来终止NET降解。丢弃PFA,并通过在PBS中添加2 μ M荧光DNA染料SytoxGreen(Thermo Scientific)来对未降解的NET进行荧光标记。用倒置荧光显微镜(Axiovert 200M,Zeiss,Germany)获得荧光染色的NET的图像。我们通过用读板仪(激发:485nm;发射:535nm)记录荧光强度或通过使用ImageJ软件(NIH,USA)测量显微术照片中NET的面积覆盖率来定量未降解的NET。

[0201] 体内表达载体的制备

[0202] 我们使用pLIVE质粒(Mirus Bio,USA)在小鼠中表达蛋白质。该载体使得蛋白质能

够持久性和肝细胞特异性表达。我们用鼠DNA酶1、DNA酶113和CSF3产生了pLIVE质粒。对于鼠DNA酶1,我们使用一对含有SalI和XhoI限制位点的引物DNA酶1-F 5'-GTCGACATGCGGTACACAGG (SEQ ID NO:27) 和DNA酶1-R 5'-CTCGAGTCAGATTTTCTGAGTGTCA (SEQ ID NO:28) 进行cDNA (Genbank登录号NM010061) 的PCR。对于DNA酶113,使用一对含有BamHI和SacI限制位点的引物DNA酶113-F 5'-GAAGTCCCAGGAATTCAAAGATGT (SEQ ID NO:29) 和DNA酶113-R 5'-GCGTGATACCCGGGAGCGATTG (SEQ ID NO:30) 进行cDNA (Genbank登录号AF047355) 的PCR。使用T4连接酶 (New England Biolabs, Germany) 将两种cDNA克隆到已用适当的酶预先消化的pLIVE载体的多克隆位点 (MCS) 中。用一对引物mutDNA酶113-F 5'-AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA (SEQ ID NO:31) 及其互补的mutDNA酶113-R 5'-TGCAGGGACATGGTGGCCGGGAGTCGACT (SEQ ID NO:32) 使含有DNA酶113的pLIVE载体进行定点诱变以便匹配共有Kozak序列并优化蛋白质表达。含有CSF3的cDNA的pLIVE载体的产生是外包的 (Eurofins Genomics, Germany)。将CSF3的cDNA (Genbank登录号BC120761) 插入MCS的限制位点SalI和XhoI之间。通过双链DNA测序确认产生的所有载体的序列。我们使用无其他插入片段的亲本pLIVE质粒作为对照。使用PureLink HiPure Plasmid Maxiprep试剂盒纯化所有质粒,并使用高容量内毒素去除离心柱 (均为Thermo Scientific) 去除潜在的内毒素污染。

[0203] 鼠DNA酶1和DNA酶113的体外表达

[0204] 用Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific), 在具有补充有10% 敲除血清替代品 (Thermo Scientific) 的DMEM培养基 (Thermo Scientific) 的无血清条件下, 将含有DNA酶1或DNA酶113的cDNA的质粒 (在别处有描述) 转染到人胚肾 (HEK) 细胞中。72小时后, 收集上清液, 以500xg离心10分钟, 无菌过滤, 并用3K柱 (Amicon Ultra, Millipore, Darmstadt, Germany) 通过超速离心进行浓缩。

[0205] 体内基因表达

[0206] 通过流体力学尾静脉注射, 将含有DNA酶1、DNA酶113、CSF3或空的对照质粒的pLIVE质粒施用给小鼠。简言之, 将50μg质粒稀释于0.9%的盐水中, 其体积相当于小鼠体重的10%。用异氟烷麻醉小鼠, 然后通过尾静脉在5至8秒内静脉注射质粒溶液。在极少数情况下, 小鼠在前24小时内未完全从注射中恢复过来, 并将这些动物排除在研究范围之外。对于共表达研究, 将50μg的CSF3-质粒与50μg的空对照质粒或含有DNA酶1和DNA酶113的质粒混合。通过流体力学尾静脉注射来施用含有两种质粒的溶液。

[0207] 慢性中性粒细胞增多症

[0208] 为4周龄或8-12周龄的雌性小鼠注射50μg含CSF3的pLIVE质粒以诱导G-CSF过度表达和中性粒细胞增多症。在注射后的第一周期间及之后的每天, 每8小时监测一次小鼠。用非接触式红外测温仪 (Etekcity, Germany) 测量肛周区域的温度。为了进行存活研究, 对小鼠实施安乐死, 并且如果动物表现出窘迫体征 (无自发运动、闭眼、偶尔喘气), 则将其评分为“不可存活的”。在所有情况下, 这些窘迫体征都伴有快速进展且严重的体温过低和血尿, 体温过低定义为与质粒注射前的体温相比体温下降 $\geq 4^{\circ}\text{C}$ 。非体温过低小鼠并未显示出任何窘迫体征, 并在实验结束时实施安乐死。对于器官、血液和尿液的收集, 我们分析了四组各三只D1/D1L3-/-小鼠。每组小鼠都注射了CSF3与空血浆、DNA酶1或DNA酶113的混合物。当每组的第一只动物显示出窘迫、严重的体温过低和血尿的体征时, 对该组小鼠实施安乐死

以收集生物样品。该时间点被定义为“死亡”并且出现在注射后3至6天内。

[0209] 血小板耗竭

[0210] 小鼠接受腹膜内注射2 μ g/g的血小板耗竭抗体或同种型对照抗体(均来自Emfret, Germany)。这种治疗耗竭来自循环中的>95%血小板。在注射CSF3后24小时开始治疗并且每48小时重复,直到实验完成。

[0211] 凝血酶抑制

[0212] 将粉末状达比加群酯(Pradaxa,Boehringer Ingelheim,Germany)与正常食物粉末(Altromin,Germany)以40mg/g的剂量混合。通过将粉末与蒸馏水混合来制备球粒并使其在室温下干燥。在CSF3注射后24小时开始喂食达比加群。与接受不含达比加群的正常食物的小鼠相比时,喂食达比加群饮食1天的WT小鼠显示出增加 6.48 ± 1.19 倍(平均值 $\pm$ SD,N=4)的活化部分凝血酶原激酶时间(学生t检验; $P < 0.001$)。

[0213] 败血病细菌的制备

[0214] 使大肠埃希氏菌(XEN 14,Perkin Elmer)在含有50 μ g/ml卡那霉素(kanamycin)的溶源性肉汤培养基中生长过夜。通过以4000x g离心10分钟使细菌沉淀,用PBS洗涤并重悬于PBS中。将 1.5×10^9 个细胞/ml的等分试样在70 $^{\circ}$ C下孵育15分钟以热灭活细菌。等分试样储存在-20 $^{\circ}$ C下直至进一步使用。

[0215] 败血病

[0216] 8-15周龄的雄性小鼠每天接受三次腹膜内注射在0.9%盐水中的1 μ g/g来自鼠伤寒血清型肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* serotype thyphimurium)的LPS(Sigma-Aldrich)。伴随第三次LPS注射,小鼠接受静脉注射 1.5×10^7 个热灭活的大肠埃希氏菌/g。显示的存活时间表示注射大肠埃希氏菌后的时间。在安乐死时收集血液和器官。从两只动物(1x D1/D1L3-/-+Ctrl,1x D1/D1L3-/-+D1L3)获得的生物样品不足以进行图4A-图4I所示的完整分析。如果动物显示出严重的窘迫体征(对触摸无响应),则对小鼠实施安乐死并且评分为“不可存活的”。所有不可存活的小鼠均显示出血尿和四肢苍白。在静脉内注射热灭活的大肠埃希氏菌后24小时,对所有存活小鼠实施安乐死并且评分为“存活的”。

[0217] 鼠血液、血浆和组织收集

[0218] 通过下颌下穿刺或眶后窦收集血液。将血液收集到200 μ l血清管(Monovette; Sarstedt,Germany)和200 μ l EDTA管(GK 150,KABE labortechnik,Germany)中。通过在以3000x g离心15分钟后收集血液的上清液来获得血浆。通过使血液在室温下凝结1小时,然后以3000x g离心15分钟来获得血清。将血清和血浆样品等分储存在-20 $^{\circ}$ C下直至进一步使用。为了进行器官分析,通过心内输注PBS对小鼠进行灌注。收集器官并在4 $^{\circ}$ C下于4%PFA中固定24小时。将固定的器官包埋在石蜡中。

[0219] 血液和血浆分析

[0220] 使用标准化试剂盒(Biotron Diagnostics,CA,USA),按照制造商的说明书来定量血浆中的LDH、AST、ALT、肌酐和BUN。用Quantikine ELISA试剂盒(R&D,United Kingdom)对小鼠G-CSF进行定量。用自动血细胞计数器(Idexx ProCyte Dx Hematology Analyzer, Netherlands)对EDTA血液中的血红蛋白进行定量。为了通过FACS定量中性粒细胞,将全血与0.2 μ g藻红蛋白标记的抗小鼠CD11b(M1/70,Biolegend,Germany)和0.5 μ g的Alexa Fluor 488抗小鼠Ly6G(1AB,Biolegend,Germany)在冰上孵育15分钟。然后将血液用0.5ml PBS稀

释,并用FACSCalibur (BD Bioscience,USA) 进行分析。在涂有聚赖氨酸的载玻片 (Hecht Assistant,Germany) 上制备EDTA抗凝血的血液涂片。风干后,在补充有1 μ M SytoxGreen的甲醇中于干冰上孵育1分钟,或使用商业试剂盒 (In Vitro Diagnostikum,Germany) 用Giemsa染色。

[0221] 免疫荧光染色

[0222] 将石蜡包埋的切片脱蜡、再水化,并在100℃下于柠檬酸盐缓冲液 (10mM柠檬酸钠、0.1%吐温 (Tween), pH 6) 中进行抗原修复25分钟。此后,将切片用2.5%正常山羊血清 (Vector,United Kingdom) 封闭30分钟,然后与小鼠对小鼠封闭试剂盒 (Vector) 一起孵育1小时。然后将切片与2 μ g/ml的针对MPO的一抗 (A0398,Agilent,Germany)、CRAMP (PA-CRLP-100,Innovagen,Sweden)、瓜氨酸化组蛋白3 (ab5103,Abcam,United Kingdom)、纤维蛋白 [克隆59D8],或组蛋白H2A、H2B与DNA的复合物一起在4℃下孵育过夜以检测染色质 (2)。将切片和与AlexaFluor488或AlexaFluor555 (全来自Thermo Scientific) 缀合的抗兔和抗小鼠IgG抗体一起孵育1小时。洗涤后,用1 μ g/ml DAPI标记DNA 2分钟。通过与苏丹黑 (0.1%于70%乙醇中) 孵育25分钟来猝灭自发荧光,并用Fluoromount G (Southern Biotech,USA) 封固切片。用倒置荧光显微镜 (Axiovert 200M,Zeiss,Germany) 或共聚焦显微镜 (TCS SP5, Leica,Germany) 获取荧光标记切片的图像。使用软件 (ImageJ) 对NET凝块的图像进行定量。少于3%的NET凝块的vWF或纤维蛋白染色区域被认为是阴性。

[0223] 免疫组织化学

[0224] 抗原修复后,用2.5%的正常马血清 (Vector) 封闭脱蜡切片30分钟。将切片与2 μ g/ml的抗中性粒细胞弹性蛋白酶的一抗 (ab68672,Abcam) 一起在4℃下孵育过夜。洗涤后,使用抗兔IgG-AP试剂盒 (ImmPRESS,Vector) 根据制造商的说明书对切片染色。将切片用矾紫 (hemalum) (Merck,Germany) 复染,并用Neo-Mount介质 (Merck) 封固。用倒置显微镜 (Axiovert 200M,Zeiss) 获得染色切片的图像。

[0225] 体外NET凝块的产生

[0226] 将纯化的人中性粒细胞以3x 10⁷个细胞/ml接种到组织培养板的补充有2%BSA的DMEM中。在37℃、5%CO₂与湿润和旋转条件 (300rpm) 下,用0.1 μ M PMA活化细胞4小时。我们使用未刺激的中性粒细胞和在10U/ml重组人DNA酶1 (阿法链道酶,Roche,Germany) 的存在下用PMA活化的中性粒细胞作为对照。在4℃下用2%PFA固定NET凝块过夜。将固定的NET凝块包埋在石蜡中,并如上所述,对切片进行NET染色。

[0227] 统计学评价

[0228] 数据显示为平均值±标准偏差。使用Prism软件 (GraphPad,USA) 进行统计分析,并且包括学生t检验、单向和双向ANOVA,然后进行Bonferroni多重比较检验和对数秩检验。P<0.05时,认为结果显著。

[0229] 影像

[0230] 慢性中性粒细胞增多症在野生型小鼠中耐受。生成的影像显示在注射CSF3表达质粒 (CSF3) 或缺乏CSF3的对照质粒 (Ctrl) 后一周的野生型小鼠。两只动物都显示出正常的行为,并且没有窘迫体征。

[0231] 慢性中性粒细胞增多症在缺乏DNA酶1和DNA酶113的小鼠中引起窘迫。影像显示了共表达CSF3与对照质粒 (CSF3/Ctrl)、DNA酶1 (CSF3/D1) 或DNA酶113 (CSF3/D1L3) 的DNA酶1/

DNA酶113-/-小鼠。表达循环DNA酶,即DNA酶1或DNA酶113的小鼠显示出正常行为。缺乏循环DNA酶(CSF3/Ctrl)的小鼠显示出窘迫体征(无自发运动、闭眼、偶尔喘气)。

[0232] 参考文献

[0233] 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.

[0234] 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) .

[0235] 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) .

[0236] 4.V.Thammavongsa,D.M.Missiakas,O.Schneewind,Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death.Science.342,863-866 (2013) .

[0237] 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.Deviunney,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) .

[0238] 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.Acad.Sci.U.S.A.107,15880-15885 (2010) .

[0239] 7.A.Wamatsch,M.Ioannou,Q.Wang, V.Papayannopoulos,Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis.Science 349,316-320 (2015) .

[0240] 8.B.Engelmann,S.Massberg,Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity.Nat.Rev.Immunol.13,34-45 (2013) .

[0241] 9.S.K.Joreh.P.kubes,An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease.Nat.Med.23,279-287 (2017) .

[0242] 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) .

[0243] 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 (DNase 113).FEBS J.276,1059-1073 (2009) .

[0244] 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) .

[0245] 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,Digeshon of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity.Cell 166,88–101 (2016) .

[0246] 14.M.Demers,D.S.Krause,D.Sehatzberg,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) .

[0247] 15.T.A.Fuchs,U.Abed,C.Goosmann,R.Hurwitz,l.Schulze,V.Wahn,Y.Weinrauch,V.Brinkmann,A.Zychlinsky,Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.J.Cell Biol.176,231–241 (2007) .

[0248] 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) .

[0249] 17.S.A.Braune,D.Wichmann,M.C.voin 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) .

[0250] 18.M.Jimenez-Alcazar,M.Napirei,R.Panda,E.C.Kohler,J.A.Kremer Hovinga,H.G.Mannierz,S.Peine,T.Renne,B.Lammle,T.A.Fuchs,Impaired DNase 1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies.J.Thromb.Haemost.13,732–742 (2015) .

[0251] 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) .

[0252] 20.M.Lepkes,C.Maueroder,S.Hirt,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.Lereh,G.Schett,S.Wirtz,M.F.Neurah,M.Herrmann,C.Becker,Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis.Nat.Commun.7,10973 (2016) .

[0253] 21.C.Schauer,C.Janko,L.E.Munoz,Y.Zhao,D.Kienhofer,B.Frey,M.Lell,B.Manger,J.Rech,E.Naschberger,R.Holmdahl,V.Krenn,T.Harrer,I.Jeremic,R.Bilyy,G.Schett,M.Hoffmann,M.Herrmann, Aggregated neutrophil extracellular traps

limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* 20, 511–517 (2014) .

[0254] 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.

[0255] 23. M. Al-Mayouf, A. Sunker, R. Abdwani, S. A. Abrawi, F. Almurshedi, N. Alhashmi, A. Al Sonbul, W. Sewairi, A. Qari, E. Abdallah, E., M. Al-Owain, S. Al Motywee, H. Al-Rayes, M. Hashem, H. Khalak, L. Al-Jebali, F. S. Alkuraya. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 43, 1186–1188 (2011) .

[0256] 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) .

[0257] 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) .

[0258] 26. S. Gupta, M. J. Kaplan, The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 402–413 (2016) .

[0259] 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) .

[0260] 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) .

[0261] 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. Rossaint, P. Ruiz Noppinger, E. Rvder, 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) .

[0262] 实施例2:用于疗法的DNA酶1L3及变体的开发和用途

[0263] 引言

[0264] 不受控制的炎症会导致多种疾患(1)。中性粒细胞胞外诱捕网(NET)是装饰有毒性蛋白的DNA细丝(2)。NET防止微生物感染,但是过量的NET形成触发并加剧炎性和自身免疫性疾病(3)。DNA酶1(D1),是一种在血液中发现的DNA降解酶,已被广泛用于解除体外和体内NET。实际上,输注重组人D1(一种FDA批准的用于囊性纤维化(CF)的药物(阿法链道酶))防止了NET在各种疾病模型中的病理作用(3),表明了D1对于预防性疗法的用途。

[0265] DNA酶1样3是NET相关疾病的新型候选药物

[0266] 在实施例1中,我们发现除D1外,DNA酶1样3(D1L3)也会降解NET。两种酶在炎症响应期间均能维持血液和组织内平衡。简言之,我们证实在无菌及感染条件下,在中性粒细胞增多症(炎症的标志)期间血管内产生了NET。D1和D1L3裂解NET,从而防止NET的DNA细丝聚集成血管凝块。在不存在D1和D1L3的情况下,NET凝块闭塞血流并导致器官损害和死亡。NET凝块独立于血小板或纤维蛋白形成,并因此对常规的抗血栓形成疗法具有抗性。因此,我们揭示NET凝块是血管闭塞的新机制,而D1L3是针对NET的新的预防性疗法(参见实施例1)。

[0267] D1和D1L3与DNA酶1样1(D1L1)和DNA酶1样2(D1L2)一起属于DNA酶1蛋白家族(4)。D1和D1L3在多种物种中表达,包括人、灵长类动物和啮齿动物。D1主要在胃肠道和外分泌腺中表达(5),而造血细胞(即巨噬细胞和树突状细胞)产生D1L3(6,7)。我们在小鼠和人的血清中发现了低浓度的DNA酶(实施例1,图14),但循环中D1和D1L3的起源未知(7,8)。D1优先裂解无蛋白DNA(例如细菌DNA、质粒DNA),而D1L3靶向染色质,染色质是DNA和组蛋白的复合物,通常发现于真核细胞核中发现(7,9,10)。D1与单体肌动蛋白结合后活性受到抑制,并且对生理盐浓度敏感(11-13)。另外,D1在N40(与无信号肽的成熟酶中的N18相对应)和N128(N106)处被糖基化,这使得该酶对血清蛋白酶的灭活具有抗性(9)。相反,D1L3缺乏糖基化和肌动蛋白结合位点,分别导致其对几种蛋白酶易感和对肌动蛋白有抗性(9)。

[0268] D1首先是在胃肠道体液和尿液中发现的,参与了食物摄入中DNA的消化。我们在本公开的过程中观察到,全身施用的DNA酶1(例如通过腹膜内或静脉内注射)在循环中具有相对较短的半衰期,并且以酶促活性形式分泌到尿液中,并且意外地分泌到胆汁中。其分泌到胆汁中开启了通过全身性DNA酶1疗法靶向胆管中的胞外DNA和/或NET的机会。

[0269] D1L3首先是在程序性细胞死亡的背景下描述的(14)。D1L3的特征在于两个核定位位点(NLS1、NLS2)。NLS2嵌入D1L3特有的C端尾部中,而在D1中不存在。两个NLS均使该酶在凋亡期间靶向细胞核(14)。实际上,胞内D1L3是体内凋亡细胞和坏死细胞内的核DNA片段化所需的(15)。D1L3需要其C端尾部来降解胞外DNA,即脂质包封的DNA(诸如在转染中发现的)和凋亡小体中的染色质(7,10)。在转染中,cDNA和阳离子脂质形成穿过靶细胞质膜的复合物。D1L3干扰转染,而C端尾部对这种功能至关重要(10)。凋亡小体,即充满来自凋亡细胞的染色质的脂质囊泡,是D1L3的生理底物(7)。在这里,C端尾部使D1L3能够穿过凋亡小体的脂质膜并降解染色质负载。重要的是,C端尾部也是D1L3降解无脂质的胞外染色质所需的(7)。据信,C端尾部对于胞外间隙中D1L3的功能至关重要。

[0270] 虽然hD1在动物模型(主要是小鼠)中有效靶向NET,但在CF(16)和肺气肿(17)的临床试验中分别显示出有限的治疗效果或没有治疗效果。NET是在CF中形成的(18),表明野生型hD1不是靶向患者中的NET最佳的。已经产生了高活性变体来规避D1的治疗局限性,但是

它们的临床生产具有挑战性(12)。值得注意的是,NET-DNA含有组蛋白,并且结构组织类似染色质(2)。因此,我们推测对NET的最佳疗法需要有效降解染色质。

[0271] 已经描述了hD1与组织纤溶酶原活化剂(tPA,阿替普酶(alteplase))对肺气肿患者的组合疗法(17)。数据与我们的假设相符,因为tPA使D1能够在体外降解染色质(19)。特此通过引用并入的US9,642,822进一步公开了tPA和D1用于NET治疗靶向的组合疗法(20)。然而,由于tPA的纤溶活性,用tPA治疗通常与增加的出血风险相关(17)。D1L3可以提供更安全的靶向NET的策略,而不会使患者处于出血的风险中,但是尚未探索使用D1L3蛋白的疗法。

[0272] 通过氨基酸转移来工程化DNA酶1和DNA酶1样3变体

[0273] 在本实施例中,我们产生了D1和D1L3的变体,将这些变体进行工程化用于针对胞外染色质的治疗(包括NET)。为了设计变体,我们假设人D1L3降解染色质的能力由人D1中不存在的单个氨基酸和/或氨基酸序列编码。此外,我们推测将这些单个氨基酸和/或氨基酸序列从人D1L3转移到D1会产生染色质降解活性增加的高活性D1变体。类似地,酶促性质(例如糖基化)可以从D1转移到D1L3。为了检验我们的假设,我们采用常规的氨基酸突变并开发了一种新型的构建嵌段(BB)技术,以工程化来自DNA酶1蛋白家族的DNA酶变体。

[0274] 为了产生D1和D1L3的变体,我们使用了体外表达系统[例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾(HEK)细胞、巴斯德毕赤酵母]。使用高分子量(HMW)-DNA降解作为读出来表征酶促活性(图16)。我们选择了两种类型的HMW-DNA:(a)从鲑鱼睾丸中分离出的双链DNA(dsDNA)。通过酶谱法分析HMW-dsDNA的降解;(b)从HEK293细胞纯化的细胞核的染色质。为了分析其降解,首先将HMW-染色质与DNA酶变体一起孵育,然后通过琼脂糖凝胶电泳(AGE)进行DNA分离和可视化。通过低分子量(LMW)-DNA检测染色质降解。在这种设置中,野生型人D1(SEQ ID NO:1)降解dsDNA的活性是野生型D1L3(SEQ ID NO:2)的大约100倍,而野生型D1L3降解染色质的效率是野生型D1的大约100倍(图16)。我们发现D1和D1L3在降解染色质而不是dsDNA方面具有协同作用。如果D1和D1L3以10:1或1:1的比率混合,我们观察到与每种单独的D1或D1L3相比染色质降解增加(图16)。因此,我们筛选了显示出染色质和/或dsDNA降解活性增加的D1和/或D1L3变体。

[0275] 使用D1蛋白家族成员的体内表达系统,进一步测试选定的D1和D1L3变体降解血管内NET。参见PCT/EP2018/051444,其特此通过引用整体并入。该系统基于两个组分:(a)表达质粒,其使得在受体小鼠中能够用D1、D1L3及其变体的cDNA稳定地体内转染肝细胞,以及(b)DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}缺陷小鼠,其特征在于血清中不存在DNA酶活性。简言之,将候选DNA酶的cDNA克隆到肝表达载体中。接下来,使载体与编码粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的鼠Csf3的cDNA一起在DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}缺陷小鼠中共表达。Csf3的表达诱导中性粒细胞增多症并伴有血管内NET形成,继而在DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠中引起血管内未消化的NET聚集并导致死亡。为了鉴定药物候选物,我们筛选了在该模型中有效降解NET并因此预防发病率和死亡率的D1、D1L3及其变体。

[0276] 结果

[0277] 通过常规氨基酸取代来工程化DNA酶1变体

[0278] 我们的中心假设是,人D1L3降解染色质的能力是由D1中不存在的氨基酸介导的。序列比对显示,人D1和人D1L3中44%的氨基酸同一(图17)。我们专门仅使可变氨基酸(56%

非共有氨基酸)突变以生成D1和DL3变体。

[0279] D1L3是等电点为9.35的阳离子蛋白,而D1和其他成员是更基本的蛋白。因此,我们推测D1L3的阳离子性质使酶能够降解染色质。通过序列比对,我们在可变氨基酸中鉴定出37个在D1中不存在的精氨酸或赖氨酸残基(图17)。这些氨基酸残基相对于SEQ ID NO:2位于氨基酸位置29(有信号肽时的位置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)处。

[0280] D1L3中这些额外的精氨酸或赖氨酸残基中的二十六个对应于D1(SEQ ID NO:1)中的以下氨基酸位置:31(有信号肽时的位置9)、41(19)、49(40)、52(30)、68(46)、76(54)、79(57)、81(59)、92(70)、109(87)、114(92)、115(93)、164(142)、177(155)、181(159)、200(178)、201(179)、204(182)、209(187)、213(191)、227(205)、239(217)、250(228)、259(237)、262(240)和280(260)。另外,D1L3的特征在于插入精氨酸或赖氨酸残基的3个位点:R80、K226和C端尾部(在SEQ ID NO:2的氨基酸位置282之后),其特征在于3个精氨酸和6个赖氨酸残基。

[0281] 我们旨在通过将相对于SEQ ID NO:1的以下突变引入野生型D1中,将作为D1L3核心主体的一部分的精氨酸和赖氨酸残基转移至D1(图18):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和K280M,从而产生D1的28种变体。

[0282] 在该实施例中,我们能够产生含有28个氨基酸取代中的23个的D1变体。我们使这些D1变体的cDNA在HEK293细胞中表达,并分析了培养物上清液中的dsDNA和染色质降解活性。我们观察到以下氨基酸修饰部分增加了染色质降解活性,而未观察到dsDNA降解方面的重大差异(图19):Q31R、Q49K、N76K、Q79R、P92R、D109K、A164K、Q177K、P200K、S201K、S204R、T213R。有趣的是,分别具有人D1的79%和78%氨基酸的小鼠和大鼠D1(SEQ ID NO:4)的特征在于几个已分析的氨基酸取代,包括Q31R、Q49K和Q79K(图20)。对表达鼠D1和人D1的HEK293细胞的上清液的分析显示,与人D1相比,鼠D1具有增加的降解染色质活性(图21)。我们为DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠注射Csf3和鼠D1(mDNA酶1,SEQ ID NO:3)、人D1(hDNA酶1,SEQ ID NO:1)或空对照质粒(Ctrl)的混合物。接受对照质粒的小鼠在7天内死亡,而鼠D1的表达提供了至少28天的全面保护(图21)。出乎意料的是,人D1的表达仅显示出部分死亡保护,并且超过一半的动物在14天内死亡(图21),表明人D1在降解血管内NET方面的效率不及鼠D1。现在我们突变人D1中的Q31R、Q49K、Q79R和W209R以产生鼠样D1变体(SEQ ID NO:5)。总共产生了六种突变(Q31R、Q49K、Q79R、Q177K、W209R、G262K)以生成大鼠样D1变体(SEQ ID NO:6)。将两种啮齿动物样D1变体克隆到肝细胞表达载体中,并与Csf3一起递送至DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠中。我们观察到,用鼠样和大鼠样D1变体进行的基因疗法提供了针对NET介导的血管闭塞和死亡的全面保护(图22)。重要的是,啮齿动物样人D1变体的体外表达显示出降解染色质的活性增加(图22)。总的来说,数据说明:(a)人D1在体内降解NET的能力有限;(b)将多种阳离子氨基酸从人D1L3转移至人D1会产生高活性变体。

[0283] 已经进行了几次尝试来生成D1的高活性变体(6,12,13,21-29)。我们发现了184个突变,这些突变改变了野生型人D1的282个氨基酸中的82个(图23)。野生型人D1和人D1L3的氨基酸序列比对揭示了人D1中已经存在于野生型人D1L3中的三个功能获得性突变(图23):Q31R(与不含信号肽的D1中的Q9R相对应)、T227K(T205K)和A136F(A114F)。虽然突变Q31R和T227K可改变hD1的DNA结合特性,从而引起高活性,但A136F赋予了对单体肌动蛋白抑制的抗性(21-24,26,29)。

[0284] 我们设计了一种携带Q31R/T227K/A136F组合的新D1变体(SEQ ID NO:7),并将其酶促活性与野生型D1(SEQ ID NO:1)以及携带Q31R、T227K、A136F单个突变或Q31R和T227K组合突变的D1变体(SEQ ID NO:8)进行了比较。我们表征了转染的HEK293细胞的培养物上清液中的dsDNA和染色质降解活性。我们用携带Q31R和T227K的单个或组合突变的D1变体,在dsDNA降解活性方面未观察到重大差异(图24)。有趣的是,染色质在A136F突变体和Q31R/T227K/A136F的组合突变中分别被部分和完全降解(图24)。接下来,我们测试了D1的Q31R/T227K/A136F变体是否能够预防中性粒细胞增多症DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}中NET介导的致死性血管闭塞。接受不含DNA酶的对照质粒的小鼠全部死亡,而表达D1变体(SEQ ID NO:7)的小鼠全部存活到实验结束,没有显示出窘迫体征(图24)。使用纯化的蛋白质,我们观察到,与野生型D1相比,三氨基酸取代使染色质降解活性增加大约10-20倍,而在dsDNA降解活性上没有可检测的差异(图25)。来自细胞核和NET的染色质含有肌动蛋白(30,31)。数据表明,D1变体降解染色质需要阳离子氨基酸取代以及赋予肌动蛋白抗性的突变-这是野生型D1L3中存在的两个特征。为了进一步确证这一观点,我们产生了一种特征在于突变A164K和A136F的组合的D1变体(SEQ ID NO:9)。实际上,我们观察到具有两种突变的D1变体中染色质降解活性大大增加(图26),这支持了我们的假设。

[0285] DNA酶1-蛋白家族成员构建嵌段工程化的开发

[0286] D1L3特征在于三个含有其他氨基酸的位点:从Q282后开始的C端尾部(NH₂-SSRAFTBSKKS^{SVTLR}KKTKSKRS-COOH)(SEQ ID NO:33),以及在该酶内两个位点S79/R80和K226处(图17)。D1L3的C端尾部的23个氨基酸已附接到D1的C端(10,28)。我们观察到在DNA酶1的位置226处插入精氨酸残基(A226_T227insK)产生了降解dsDNA的酶促活性降低的D1变体,而用取代T227K未观察到此类作用(图27)。因此,插入K/R残基伴随着降低D1功能的风险。带电荷的氨基酸的插入可影响局部蛋白质结构。考虑到D1是包含一条氨基酸链的球状酶[图28,(27)],可以想象此类局部改变可致使整个酶无活性。实际上,整个D1氨基酸序列中的许多非保守性突变都使酶失活(12,25,26)。我们假设通过不仅植入单个精氨酸和赖氨酸残基,而且还植入邻近的氨基酸序列来转移局部蛋白质结构,可降低失活的风险。我们在D1和D1L3中搜索A226_T227insK附近的保守性氨基酸,这些保守性氨基酸可用作插入的锚点。我们确定D1中的D223/T224/T225基序和保守性T229分别是N端和C端锚点(图27)。我们经由电脑模拟将D1中的3个氨基酸(ATP)置换为来自D1L3的4个氨基酸,包括K226(VKKS)。新D1变体(A226_P228delinsVKKS)的cDNA在HEK239细胞中的表达揭示了一种与野生型D1相比具有类似dsDNA降解活性的功能活性酶(图27)。数据表明,保守性氨基酸之间的可变氨基酸在D1和D1L3之间是可互换的。

[0287] 我们构思了一种构建嵌段技术将酶促特性从D1蛋白家族的一个成员转移到另一个成员。以下基本步骤是该技术的特征(图29):

- [0288] (1) 提供供体和受体DNA酶的蛋白质-蛋白质比对
- [0289] (2) 鉴定要转移的可变氨基酸或氨基酸序列(构建嵌段)
- [0290] (3) 鉴定供体和受体DNA酶中分别位于构建嵌段(锚点)的上方和下游的保守性氨基酸。
- [0291] (4) 将受体DNA酶中介于C-锚点和N-锚点之间编码构建嵌段的cDNA置换为供体DNA酶中锚点之间的cDNA。
- [0292] (5) 合成嵌合DNA酶的cDNA,然后在体内/体外表达达到优选有供体和受体DNA酶缺陷的受体生物体(例如CHO细胞或DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠)中。
- [0293] 通过构建嵌段技术来工程化DNA酶1变体
- [0294] 来自人、小鼠、大鼠和黑猩猩的D1和D1L3的多物种比对(图30),显示在这些物种中N-和C-端锚点是保守的。这些锚点氨基酸或氨基酸序列侧翼是62个可变氨基酸和氨基酸序列的构建嵌段,其包括来自上述实验的D1(ATP)和D1L3(VKKS)中的氨基酸序列作为构建嵌段#49(图31)。
- [0295] 将这些构建嵌段从D1L3转移到D1中会生成具有以下突变的D1变体(图31):1M_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA、L23_A27delinsMRICS、I30_T32delinsVRS、E35_T36delinsES、M38_I47delinsQEDKNAMDVI、Q49_S52delinsKVIK、Y54C、I56_Q60delinsIILVM、V62_R63delinsIK、S65_K72delinsSNNRICPI、L74_N76delinsMEK、Q79_T84delinsRNSRRGIT、H86N、V88_V89delinsVI、E91_P92delinsSR、N96_S97delinsNT、R101Q、L103A、V105L、R107_Q110delinsKEKL、A113_S116delinsVKRS、Y118H、D120H、G122_N128delinsYQDGDA、T130S、N132S、A136_I137delinsFV、R139W、F141_F144delinsQSPH、E146_E149delinsAVKD、A151V、V153I、A157_A158delinsTT、G160_A162delinsETS、A164K、A168E、Y170_D171delinsVE、L174T、Q177_K179delinsKHR、G181_L182delinsKA、D184_L187delinsNFIF、R199_Q202delinsPKKA、S204_S205delinsKN、W209R、S211D、T213R、Q215V、P219G、S221_A222delinsQE、A226_P228delinsVKKS、H230N、V238_A239delinsLR、M241_A246delinsQEIVSS、D250K、A252_P254delinsNSV、N256D、A259_A260delinsKA、G262K、S264_L267delinsTEEE、Q269_I271delinsLDV、Y275F、V279_M280delinsFK和K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKTKSKRS。
- [0296] 如果将构建嵌段从D1转移到D1L3,则会生成以下D1L3变体(图31):M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS、M21_S25delinsLKIAA、V28_S30delinsIQT、E33_S34delinsET、Q36_I45delinsMSNATLVSYI、K47_K50delinsQILS、C52Y、I54_M58delinsIALVQ、I60_K61delinsVR、S63_I70delinsSHLTAVGK、M72_K74delinsLDN、R77_T84delinsQDAPDT、N86H、V88_I89delinsVV、S91_R92delinsEP、N96_T97delinsNS、Q101R、A103L、L105V、K107_L110delinsRPDQ、V113_S116delinsAVDS、H118Y、H120D、Y122_A127delinsGCEPCGN、V129T、S131N、I35F、I36VdelinsAI、W138R、Q140_H143delinsFSRF、A145_D148delinsAVKD、V150A、I152A、T156_T157delinsAA、E159_S161delinsGDA、K163A、E167A、V169_E170delinsYD、T173L、K176_R178delinsQEK、K180_A181delinsGL、N183_F186delinsDVML、P198_A201delinsRPSQ、K203_N204delinsSS、R208W、D210S、R212T、V214Q、G218P、Q220_E221delinsSA、V225_S228delinsATP、N230H、L238_R239delinsVA、Q241_S246delinsMLLRGA、K250D、N252_V254delinsALP、D256N、K259_A260delinsAA、K262G、T264_

E267delinsSDQL、L269_V271delinsQAI、F275Y、F279_K280delinsVM和Q282_S305delinsK。

[0297] 接下来,我们构思了一种依序方法来工程化具有D1L3活性的D1变体,该方法从转移多个相邻构建嵌段(簇)开始,继续转移单个构建嵌段,并以将单个氨基酸或多个构建嵌段的组合转移到新的嵌合酶中结束(图32)。这种方法减少了初始筛选中D1-D1L3-嵌合体的数量。

[0298] 为了测试我们的方法,我们设计了总共19种包含来自D1L3的单个构建嵌段或构建嵌段簇的D1变体(图31)。这些D1变体的特征在于以下的氨基酸突变:1M_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA、L23_A27delinsMRICS/I30_T32delinsVRS/E35_T36delinsES、M38_I47delinsQEDKNAMDVI、Q49_S52delinsKVIK/Y54C/I56_Q60delinsIILVM、V62_R63delinsIK/S65_K72delinsSNNRICPI/L74_N76delinsMEK、Q79_T84delinsRNSRRGIT、H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR、N96_S97delinsNT/R101Q/L103A/V105L、R107_Q110delinsKEKL/A113_S116delinsVKRS/Y118H/D120H、G122_N128delinsYQDGDA/T130S/N132S、A136_I137delinsFV、R139W/F141_F144delinsQSPH/E146_E149delinsAVKD/A151V/V153I/A157_A158delinsTT/G160_A162delinsETS/A164K、A168E/Y170_D171delinsVE/L174T、Q177_K179delinsKHR/G181_L182delinsKA/D184_L187delinsNFIF、R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE、A226_P228delinsVKKS、H230N/V238_A239delinsLR/M241_A246delinsQEIVSS/D250K/A252_P254delinsNSV、N256D/A259_A260delinsKA/G262K/S264_L267delinsTEEE/Q269_I271delinsLDV和Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTCSKRS。

[0299] 接下来,我们将cDNA克隆到表达载体中,然后将表达载体转染到HEK293细胞中。细胞上清液的分析显示所有样品均降解了dsDNA(图33)。此外,我们观察到将构建嵌段(BB)11(参见SEQ ID NO:10)、BB 12-14(参见SEQ ID NO:11)、BB 26(参见SEQ ID NO:12)、BB 41-48(参见SEQ ID NO:13)和BB 49(参见SEQ ID NO:14)从D1L3转移到D1产生染色质降解活性增加的酶。与野生型D1相比,所有这些嵌合酶均表现出相同或更高的降解dsDNA底物的活性。来自D1L3的构建嵌段11(SEQ ID NO:2中的RNSRRGI)和49(SEQ ID NO:2中的VKKS)分别含有在D1中不存在的R80/R81和K227。D1L3-BB簇41-48(来自SEQ ID NO:2的PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE)与其在D1中的对应物(SEQ ID NO:1的RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA)相比,特征在于5个额外的精氨酸和赖氨酸残基。这些额外的阳离子氨基酸可负责高活性。D1构建嵌段12-14和26含有SEQ ID NO:1中的氨基酸序列H86至R95和A136至V138,其包括结合D1抑制剂肌动蛋白所需的氨基酸残基。因此,将这些氨基酸序列置换为来自D1L3的不与肌动蛋白相互作用的相应构建嵌段,可能产生D1的抗肌动蛋白变体。现在,我们将BB11、14、26、41-19组合到一个新的D1变体中(SEQ ID NO:15)。我们观察到,这些功能获得性BB的组合使D1变体的染色质降解提高至野生型D1L3的水平(图33)。因此,BB技术提供了一种生成高活性D1变体的稳健方法。

[0300] 通过构建嵌段技术来工程化DNA酶1样3变体

[0301] D1L3的BB簇60至62包含来自其C端尾部的氨基酸(图33)。尾部从L281之后开始(图34)并且包含氨基酸序列QSSRAFTBSKKSVTLRKKTCSKRS(SEQ ID NO:33),其包含二分NLS。D1L3需要C端尾部降解脂质囊泡(包括转染试剂和凋亡小体)中的DNA(7,10,28)。此外,D1L3

降解无脂质和无细胞的染色质也需要C端尾部(7)。两项发现均基于D1L3变体,该变体在Q282之后缺少氨基酸并因此在降解这些底物方面无活性。Wilbert等人将D1L3的C端延伸段附接到D1的C端,从而将降解脂质囊泡中的DNA的能力转移到D1(10,28)。在这里,我们采用BB技术将C端从D1L3转移到D1,反之亦然。我们使用位于D1中的末端 β -折叠前面的保守性S272/D273/H274基序(图28)作为N-锚点,并在D1和D1L3之间交换末端的3个构建嵌段(图34)。这种方法生成了一种D1变体,该变体的特征在于由于突变Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKTKSKRS (SEQ ID NO:16)而导致的D1L3的C端延伸,以及由于突变F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (SEQ ID NO:17)而产生的截短的D1L3变体。我们使变体和野生型酶均在HEK293细胞中表达,并表征了上清液中的DNA酶活性。出乎意料的是,我们观察到带有D1L3的C端的D1变体不会降解染色质,而缺少野生型酶C端的D1L3变体仍然能够裂解染色质(图34)。事实上,我们用这种D1L3变体观察到增加的染色质降解活性。为了确证这一发现,我们测试了在体内并观察到其表达的D1L3的截短变体是否可保护NET介导的中性粒细胞增多症DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}小鼠的死亡(图34)。总之,C端的缺失不会抑制而是会增强D1L3降解无脂质和无细胞染色质的功能。

[0302] 血清蛋白酶,尤其是纤溶酶,降解D1L3,但不降解D1(9)。D1L3对蛋白酶活性的敏感性将限制其在临床实践中的使用。糖基化蛋白对蛋白酶展示出增强的保护作用(32)。使用软件分析,我们无法鉴定人和鼠D1L3中糖基化的已知共有序列。对人D1的软件分析揭示了2个糖基化位点,正如在计算机和在体外观察到的那样(9)。我们假设D1L3的糖基化变体可能由于对血清蛋白酶的抗性提高而增加了循环半衰期。糖基化位点需要N-X-T/S的最小共有序列。D1含有两个已知的N-糖基化位点,即N40(无信号肽的N18)和N128[无信号肽的N106,(9)]。D1-糖基化位点的氨基酸N40-X-T42和N128-X-T130对应于D1L3中的D38-X-N40和A127-X-V129。因此,D1L3的糖基化形式需要以氨基酸突变D38N、N40T、A127N和V129T为特征(参见SEQ ID NO:18)。不使用常规的点突变来插入这些氨基酸取代,我们使用BB技术将位于BB4 (SEQ ID NO:1中的MSNATLVSY)内的D1-糖基化位点N40-X-T42和位于BB簇23-25 (SEQ ID NO:1中的GCEPCGNDTFN)内的N128-X-T130从D1转移到D1L3(图35)。因此,我们生成了两种新的D1L3变体,其分别特征在于突变Q36_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO:19)和Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO:20)。我们使这些D1L3变体以及WT酶在HEK293细胞中表达。接下来,我们使用靶向WT酶C端尾部中的表位的多克隆抗体通过蛋白质印迹法分析上清液,以检测WT酶以及D1L3变体。正如预期的那样,与WT酶相比,D1L3变体显示出较高的分子量的带,可能是由于糖基化产生的(图35)。在N40或N128处糖基化的D1L3变体保留了其染色质降解活性(图35)。总之,数据表明,BB技术可用于将糖基化位点从D1转移到D1L3,从而可产生在患者体内的蛋白酶抗性和半衰期增加的D1L3变体。

[0303] 用DNA酶1样3及其变体进行的疗法

[0304] 最后,我们测试了D1L3在体内的治疗效果。对NET血管凝块的组织学分析显示染色质密集聚集(图36A),表明D1的无组蛋白裂解位点在体内很少见。因此,我们假设用野生型D1L3的急性疗法比野生型D1更有效地降解血管内NET。为了检验我们的假设,我们使Csf3在DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}缺陷小鼠中表达以诱导NET的血管凝块。重要的是,死亡之前,NET引起血管闭塞的小鼠会发展出血尿和体温过低,其可以通过非侵入性方式检测到。因此,动物模型允许鉴定并因此选择已经形成了NET的小鼠,以测试用于针对NET的急性疗法的药物候选

物(图36B)。在这里,我们测试了纯化的野生型人D1(阿法链道酶;SEQ ID NO:1)、野生型人D1L3(SEQ ID NO:2)和高活性D1L3变体[D1L3^V; (SEQ ID NO:17)]用于针对NET的急性疗法。我们将Csf3注入DNA酶1^{-/-}DNA酶113^{-/-}缺陷小鼠体内。72小时后,第一批各个动物开始发展出体温过低和血尿。我们使用体温下降4℃或更多以及存在红色尿液作为纳入标准。将发展出这些表型的小鼠随机分为不同的治疗组。动物通过尾静脉接受单剂量静脉内注射1mg/kg的D1、D1L3或媒介物。30分钟后,对动物实施安乐死以收集生物样品(血液和器官)。肺脉管系统中NET凝块的定量显示,NET阻塞了接受媒介物或D1疗法的小鼠中的血管(图36D)。重要的是,注射了D1L3和D1L3^V的小鼠显示没有或很少的NET凝块(图36D)。在患者中,循环DNA具有单核小体中DNA的大小[180个碱基对,(33)],表明它是染色质中高分子量DNA的降解产物。循环DNA通常用作血管内NET形成的替代标志物,但也可以源自受损和坏死的组织(34)。我们使用荧光DNA探针对血清中的DNA进行定量。我们观察到注射D1L3和D1L3^V,而不是D1或媒介物,导致循环DNA水平大大增加(图36E)。循环DNA的分离和可视化显示出多聚体180个碱基对的片段,表明在接受D1L3疗法的小鼠血清中存在单核小体和寡聚核小体(图36F)。接受D1L3^V的小鼠仅显示出单核小体和双核小体。数据证实D1L3^V在体内的高活性。来自于接受D1疗法的小鼠血清的DNA分离物显示出各种大小的模糊DNA涂片,而无法从注射了媒介物的小鼠的血清中分离出DNA(图36F)。因此,D1L3不仅可以用于预防,而且可以用于与NET相关疾病的急性疗法。

[0305] 我们进一步探讨了D1L3^V在缺血再灌注损伤模型中的治疗应用(图37A)。简言之,如我们先前所描述的,对雄性野生型大鼠的一侧睾丸进行睾丸扭转(35)。该程序会导致缺血性组织损伤。在将睾丸随机分组和扭转矫正之后,大鼠每天接受三次媒介物、阿法链道酶(D1,1mg/kg)或纯化DNA酶1L3变体(SEQ ID NO:17,D1L3^V,1mg/kg)的注射。7天后,收集缺血性睾丸和未处理的睾丸。用D1L3^V而不是盐水或D1进行的疗法显著减少了睾丸萎缩(图37B)。而且,用D1L3^V而不是盐水或D1进行的疗法大大减少组织损伤,而大多数动物未显示出损伤体征(图37C)。总体而言,这些数据鉴定D1L3是一种有效的抗缺血再灌注损伤的疗法。

[0306] DNA酶1变体、DNA酶1样3和变体的药物开发

[0307] 所有蛋白质治疗剂中有近70%是使用中国仓鼠卵巢(CHO)生产的(36)。实际上,野生型DNA酶1(阿法链道酶)是在CHO细胞中产生的。尽管具有显著优势,但是由于可变性程度相当大并且没有可靠的方法用于对细胞生长特征进行预测或建模,CHO中的细胞系开发和大规模生产仍然面临巨大挑战(36)。重要的是,CHO细胞无法稳定地产生D1的高活性变体,从而阻止了其临床制造(12)。D1L3的制造特性未知。因此,我们开发了产生野生型D1(SEQ ID NO:1)、高活性D1变体(SEQ ID NO:7)、野生型D1L3(SEQ ID NO:2)和高活性D1L3变体(SEQ ID NO:17)的稳定CHO细胞系。我们在生物反应器中培养细胞系,并观察到了野生型D1和D1变体的稳定蛋白表达,其中后者的表达水平大大提高(图38),说明在CHO中产生高活性D1变体的可行性。出乎意料的是,我们仅观察到了野生型D1L3和D1L3变体的少量蛋白质水平(图38),指出了临床制造D1L3及其变体的重大挑战。

[0308] 由于大型生物反应器中的高细胞密度,细胞会竞争资源并经受细胞应激,导致细胞死亡增加,称为凋亡,这是多细胞生物体(包括哺乳动物)使用的一种细胞死亡程序(37)。D1L3靶向凋亡小体中的DNA(7)。我们推测低水平的D1L3是由于这些凋亡囊泡清除了该酶。

为了克服这些局限性,我们使用微生物表达系统即巴斯德毕赤酵母(一种确立的、经FDA批准并公认安全(GRAS)的具有蛋白质分泌能力的生物体)测试D1、D1L3及其变体的产生(38, 39)。这种方法的主要局限性在于巴斯德毕赤酵母产生的蛋白质经常被高度糖基化并且可能导致免疫原性增强(40)。D1L3及其变体的组成是非糖基化的并且最适合在巴斯德毕赤酵母中表达。我们使D1及其变体中的糖基化位点分别在N40S和N128S处突变以生成去糖基化的蛋白质(SEQ ID NO:21、23)。巴斯德毕赤酵母中的蛋白表达通常通过将目标蛋白与各种来源的分泌信号肽偶联来实现。我们省略了该步骤以避免生成免疫原性嵌合蛋白。我们推测D1和/或D1L3的天然信号肽以被巴斯德毕赤酵母识别。进行密码子优化后,我们使cDNA在巴斯德毕赤酵母中表达(SEQ ID NO:22、24-26)。我们实现了D1和D1变体的表达(未示出)。重要的是,这种方法还可以使得D1L3和D1L3变体能够表达,后者显示出增加的表达水平(图38)。我们纯化了蛋白质并证实D1L3具有增加的活性(图38)。总之,数据表明使用非哺乳动物表达系统,诸如巴斯德毕赤酵母,使得能够临床制造D1L3及其变体。

[0309] 讨论

[0310] 两种DNA降解酶已在治疗上广泛用于实验模型和患者中。链道酶,一种从链球菌属某些种(*Streptococcus* spp.)分泌的DNA酶,已在皮肤同种移植、膀胱凝块、伤口清创、脑膜炎的疾病模型中进行了测试。DNA酶1(包括胰腺DNA酶1)已在治疗上用于癌症、囊性纤维化、狼疮、血栓形成、中风、脓毒症、肺损伤、动脉粥样硬化、病毒感染、镰状细胞病、心肌梗塞、耳部感染、创伤愈合、肝损伤、心内膜炎、肝脏感染、胰腺炎、原发性移植物功能障碍、肢体缺血再灌注、肾脏损伤、凝血、哮喘、明矾诱发的炎症、肝肾损伤的实验模型中。链道酶也已用于治疗有胸膜渗出物、血胸、胆道内血块、后气动贫血、溃疡、耳鼻喉科疾患、口腔感染、轻伤、鼻窦炎、术后鼻整形、不育、膀胱导管、创伤清洁、皮肤反应测试的患者。重要的是,DNA酶1已在患有肺炎球菌性脑膜炎、痛风、腿部溃疡、囊性纤维化、卡塔格内综合征、哮喘、肺叶膨胀不全、慢性支气管炎、支气管扩张、狼疮、原发性纤毛运动障碍、细支气管炎、脓胸、胸膜感染、癌症、干眼病、下呼吸道感染、慢性血肿、阿尔茨海默氏病和阻塞性肺病的患者中进行了治疗测试。在该实施例中,我们将D1L3及其变体以及D1变体鉴定为DNA酶疗法的新候选物(图39)。

[0311] 方法

[0312] 染色质降解活性的检测

[0313] 为了测量染色质降解活性,我们将样品与从HEK293分离的细胞核(每个反应1, 500,000-3,000,000)、20mM Tris-HCl pH 7.4、2mM MgCl₂、2mM CaCl₂、50mM NaCl和蛋白酶抑制剂混合。将样品在37℃下孵育1小时后,将其加热到65℃,保持10分钟。我们使用QIAamp DNA Blood Mini试剂盒(Qiagen)根据制造商的方案,进行DNA分离。然后将洗脱液上样到琼脂糖凝胶上,并通过凝胶电泳分离DNA片段。用荧光扫描仪记录凝胶的DNA荧光。

[0314] 在实施例1中描述了其他方法。

[0315] 参考文献

[0316] 1.V.Kumar,A.K.Abbas,N.Fausto,J.C.Aster,in Robbins&Cotran Pathologic Basis of Disease.(Elsevier Health Sciences,2009),chap.2.

[0317] 2.V.Brinkmann et al.,Neutrophil extracellular traps kill bacteria.Science(New York,N,Y,) 303,1532-1535(2004) .

- [0318] 3.T.A.Fuchs,A.Hakkim,C.F.Urban,in *Inflammation:Fundamental Mechanisms*,K.Ley,Ed.(World Scientific,2018),chap.6.
- [0319] 4.D.Shiohawa,S.Tanuma,Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis.*Biochemistry* 40, 143-152 (2001) .
- [0320] 5.M.Napirei,A.Ricken,D.Eulitz,H.Knoop,H.G.Mannherz,Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene:lessons from the Dnasel knockout mouse.*Biochem J* 380,929-937 (2004) .
- [0321] 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) .
- [0322] 7.V.Sisirak et al.,Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity.*Cell* 166,88-101 (2016) .
- [0323] 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) .
- [0324] 9.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) .
- [0325] 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) .
- [0326] 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) .
- [0327] 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) .
- [0328] 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) .
- [0329] 14.D.Shiohawa,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) .
- [0330] 15.R.Mizuta et al.,DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis.*PLoS One* 8,e80223 (2013) .
- [0331] 16.H.J.Fuchs et al.,Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis.The Pulmozyme Study Group.*N Engl J Med* 331,637-642 (1994) .
- [0332] 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) .

[0333] 18.V.Papayannopoulos,D.Staab,A.Zychlinsky,Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One* 6,e28526 (2011) .

[0334] 19.M.Napirei,S.Wulf,H.G.Mannherz,Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* 50,1873–1883 (2004) .

[0335] 20.D.D.Wagner et al. (Children's Medical Center Corporation,Boston,MA (US),United States,2017) ,vol.US 9,642,822 B2.

[0336] 21.R.A.Lazarus,C.Q.Pan, (Genentech Inc.,United States,2002) ,vol,US 6,391,607 B1.

[0337] 22.R.A.Lazarus,C.Q.Pan. (Genentech Inc.,2008) ,vol.US 7,407,785 B2.

[0338] 23.R.A.Lazarus,S.Shak,J.S.Ulmer. (Genentech Inc.,2001) ,vol.US 2001/0041360 A1.

[0339] 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) .

[0340] 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) .

[0341] 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) .

[0342] 27.G.Parsieglä,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) .

[0343] 28.M.C,Schneider,A.Wilber, (United States,2004) ,vol,US 2004/0138156,

[0344] 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) .

[0345] 30.B.T.Bettinger,D.M.Gilbert,D.C.Amberg,Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5,410–415 (2004) .

[0346] 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) .

[0347] 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) .

[0348] 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) .

[0349] 34.M.Jimenez-Alcazar,N.Kim,T.A.Fuchs,Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis?Semin Thromb Hemost 43,553-561(2017) .

[0350] 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) .

[0351] 36.A.D.Bandaranayake,S.C.Almo,Recent advances in mammalian protein production.FEBS letters 588,253-260(2014) .

[0352] 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) .

[0353] 38.J.L.Cereghino,J.M.Cregg,Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,FEMS microbiology reviews 24,45-66 (2000) .

[0354] 39.M.Ahmad,M.Hirz,H.Pichler,H.Schwab,Protein expression in *Pichia pastoris*:recent achievements and perspectives for heterologous protein production.Applied microbiology and biotechnology 98,5301-5317(2014) .

[0355] 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:J MR 118,119-138(2005) .

[0356] 野生型DNA酶的序列

[0357] SEQ ID NO:1

[0358] 人DNA酶1(P24855),氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0359] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDMVMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0360] SEQ ID NO:2

[0361] 人DNA酶1L3(Q13609),氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0362] MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICP
ILMEKLNRSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWWFQSPHTAV
KDFVIIPLHTTPETSVEKIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT
TVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKNSVFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
KSKRS

[0363] SEQ ID NO:3

[0364] 鼠DNA酶1(P49183):氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0365] MRYTGLMGTLTLVNLLQLAGTLRIA AFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRDIAV IQEVDRSHLVA

VGKLLDELNRDKPDITYRYVVSEPLGRKSYKEQYLFVYRPDQVSILDSYQYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTE
VQEF AIVPLHAAPTEAVSEIDALYDVYLDVWQKWGLEDMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSAD
TTVTSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDFQAEYGLSNQLAE A ISDHYPVEVTLRKI

[0366] SEQ ID NO:4

[0367] 大鼠DNA酶1 (P21704) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0368] MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRDYIAVVQEVRDTHLVA
VGKLLDELNRDIPDNRYRI I SEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTE
VREF AIVPLHSAPTEAVSEIDALYDVYLDVRQKWGLEDMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSAD
TTATSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDFQAEYRLTNQMAEA ISDHYPVEVTLRKT

[0369] SEQ ID NO:34

[0370] 鼠DNA酶1L3 (055070) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0371] MSLHPASPRLASLLLFILALHDTLALRLCSFNVR SFGASKKENHEAMD I IVK I IKRCDL ILLMEIKDSS
NNICPMLMEKLN GNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHDYQDGD TDVFSREPFV VWFHS
PFTAVKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELVDVYTDVRSQWK TENF IFMGDFNAGCSYV PPKAWQNIRLRTDPKFVWLIG
DQEDTTVKKSTSCAYDRIVLCGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYDLSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVS
LKKRKKGNRS

[0372] SEQ ID NO:35

[0373] 大鼠DNA酶1L3 (089107) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0374] MSLYPASPYLASLLLFILALHGALSRLCSFNVR SFGESKKENHNAMD I IVK I IKRCDL ILLMEIKDSN
NNICPMLMEKLN GNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKAKYLYHDYQDGD TDVFSREPFV VWFQA
PFTA AKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELADVYTDVRRRWKAENF IFMGDFNAGCSYV PPKAWKNIRLRTDPNFVWLIG
DQEDTTVKKSTSCAYDRIVLRGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYELSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSRKSVS
LKKKKKGSRS

[0375] SEQ ID NO:36

[0376] 黑猩猩DNA酶1 (H2QAH1) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0377] MRSMKLLGALLALAALLQGA VSLKIAAFNIQT FGETKMSNATLVSYIVQILSRDYIALVQEVRD SHLTA
VGKLLDNLNQDAPDITYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSY YDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREF AIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDMVMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPA FQWLIPDSAD
TTATPTHCA YDRIVVAGMLLQGA VVPDSALPFNFQAA YGLSDQLAQ A ISDHYPVEVMLK

[0378] SEQ ID NO:37

[0379] 黑猩猩DNA酶1L3 (H2QMU7) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0380] MSRELTPLLLLLSIHSTLALRICSFNVR SFGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDI ILVMEIKDSNNRICP
ILMEKLN RNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV VWFQSPHTAV
KDFVI I PLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENF IFMGDFNAGCSYV PPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT
TVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
KSKRS

[0381] SEQ ID NO:38

[0382] 人DNA酶1样1 (NM_006730) :氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白) :

[0383] MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEVDSSGSAIPLL

LRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSSYVYNDEDDVFAREFVAQFSLPSNVLPVLVLP
LHTTPKAVEKELNALYDVFLEVSQHWQSKDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTH
CTYDRVVLHGERCRSLLHTAAAFDFPTSFQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLLLSLLSPQLCP
AA

[0384] SEQ ID NO:39

[0385] 人DNA酶1样2 (NM_001374):氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0386] MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVS DPACGSIIAKILAGYDLALVQEV RDPDLSAV
SALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVD TYLYPD PEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPL
PSRRALT PPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDV IDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLR
SSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRLKPKSATVHDFQEEFGLDQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

[0387] 人DNA酶1L3的C端尾部

[0388] SEQ ID NO:33

[0389] 氨基酸序列:

[0390] SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

[0391] DNA酶1变体的序列

[0392] SEQ ID NO:5

[0393] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0394] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSR YDIALVQEV RDSHLTA
VGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAI VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0395] SEQ ID NO:6

[0396] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0397] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSR YDIALVQEV RDSHLTA
VGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAI VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVKEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYKLS DQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0398] SEQ ID NO:7

[0399] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0400] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSR YDIALVQEV RDSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFI VRFFSRFTE
VREFAI VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTAKPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0401] SEQ ID NO:8

[0402] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0403] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSR YDIALVQEV RDSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFI VRFFSRFTE
VREFAI VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTAKPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0404] SEQ ID NO:9

[0405] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0406] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVKEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0407] SEQ ID NO:10

[0408] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0409] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNRNSRRGITYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRF
TEVREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDS
ADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0410] SEQ ID NO:11

[0411] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0412] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYNYV ISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0413] SEQ ID NO:12

[0414] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0415] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0416] SEQ ID NO:13

[0417] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0418] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQED
TTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0419] SEQ ID NO:14

[0420] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0421] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTVKKSTHCAYDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0422] SEQ ID NO:15

[0423] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0424] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA

VGKLLDNLNRNSRRGITYNVYISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRF
TEVREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQ
EDTTVKKSTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0425] SEQ ID NO:16

[0426] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0427] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
KSKRS

[0428] DNA酶1L3变体的序列

[0429] SEQ ID NO:17

[0430] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0431] MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRIPC
ILMEKLNRRNSRRGITYNVYISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAV
KDFVVIPLHTTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT
TVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHYPVEVMLK

[0432] SEQ ID NO:18

[0433] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0434] MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQENKTAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRIPC
ILMEKLNRRNSRRGITYNVYISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDNDTFSREPFVWFQSPHTAV
KDFVVIPLHTTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT
TVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
KSKRS

[0435] SEQ ID NO:19

[0436] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0437] MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRIPC
ILMEKLNRRNSRRGITYNVYISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAV
KDFVVIPLHTTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT
TVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
KSKRS

[0438] SEQ ID NO:20

[0439] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0440] MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRIPC
ILMEKLNRRNSRRGITYNVYISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDGCEPCGNDTFNREPFVWFQSPHTA
VKDFVVIPLHTTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQED
TTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKK
TKSKRS

[0441] 巴斯德毕赤酵母中使用的序列

[0442] SEQ ID NO:21

[0443] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0444] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTHYVYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPAIVRFFSRFTE
VREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTATPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0445] SEQ ID NO:22

[0446] SEQ ID NO:21的密码子优化的cDNA(起始密码子,信号肽):

[0447] ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGCTGCCCTCCTGGCTCTCGTCTCTCCTCCAAGGAGCAGTTTCTCTA
AAGATTGCTGCTTTCAATATTCAAACCTTTGGCGAGACTAAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCA
GATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAG
ACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAACTCCTACAAGGAG
AGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTG
TGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCAGCTATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCA
TCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTGGACGTTTCAG
GAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATG
GTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCACTCCCA
CTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCA
TTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTAT
GCTTAAG

[0448] SEQ ID NO:23

[0449] 氨基酸序列(信号肽;成熟蛋白):

[0450] MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRSHLTA
VGKLLDNLNQDAPDTHYVYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPFIVRFFSRFTE
VREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSAD
TTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

[0451] SEQ ID NO:24

[0452] SEQ ID NO:23的密码子优化的cDNA(起始密码子,信号肽):

[0453] ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGCTGCCCTCCTGGCTCTCGTCTCTCCTCCAAGGAGCAGTTTCTCTA
AAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCTTTGGCGAGACTAAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCA
GATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAG
ACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAACTCCTACAAGGAG
AGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTG
TGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCATTATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCA
TCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTGGACGTTTCAG
GAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATG
GTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAAGCCCA
CTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCA
TTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTAT

GCTTAAG

[0454] SEQ ID NO:25

[0455] SEQ ID NO:2的密码子优化的cDNA (起始密码子,信号肽):

[0456] ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAGAATT
TG TAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCAT
TAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGC
TGAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAG
CAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGA
TGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTA
TCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAAATAGATGAACTTGTTGAAGTTTACACCGACGTGAAGCAC
AGATGGAAGGCCGAGAATTTTCATTTTCATGGGTGATTTCACGCCGGATGTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGA
AAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTA
CCAAGTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCAAGTCCGTC
TTTGATTTCCAAAAGGCTTACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCACTTCCCTGTAGAGTTTAA
GCTGCAATCCTCCAGAGCATTCATACTCTAAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCTAAGAGATCG

[0457] SEQ ID NO:26

[0458] SEQ ID NO:17的密码子优化的cDNA (起始密码子,信号肽):

[0459] ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAGAATT
TG TAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCAT
TAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGC
TGAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACACGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAG
CAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGA
TGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTA
TCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAAATAGATGAACTTGTTGAAGTTTACACCGACGTGAAGCAC
AGATGGAAGGCCGAGAATTTTCATTTTCATGGGTGATTTCACGCCGGATGTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGA
AAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTA
CCAAGTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCAAGTCCGTC
TTTGATTTCCAAAAGGCTTACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCACTACCCTGTAGAGGTCAT
GTTGAAG

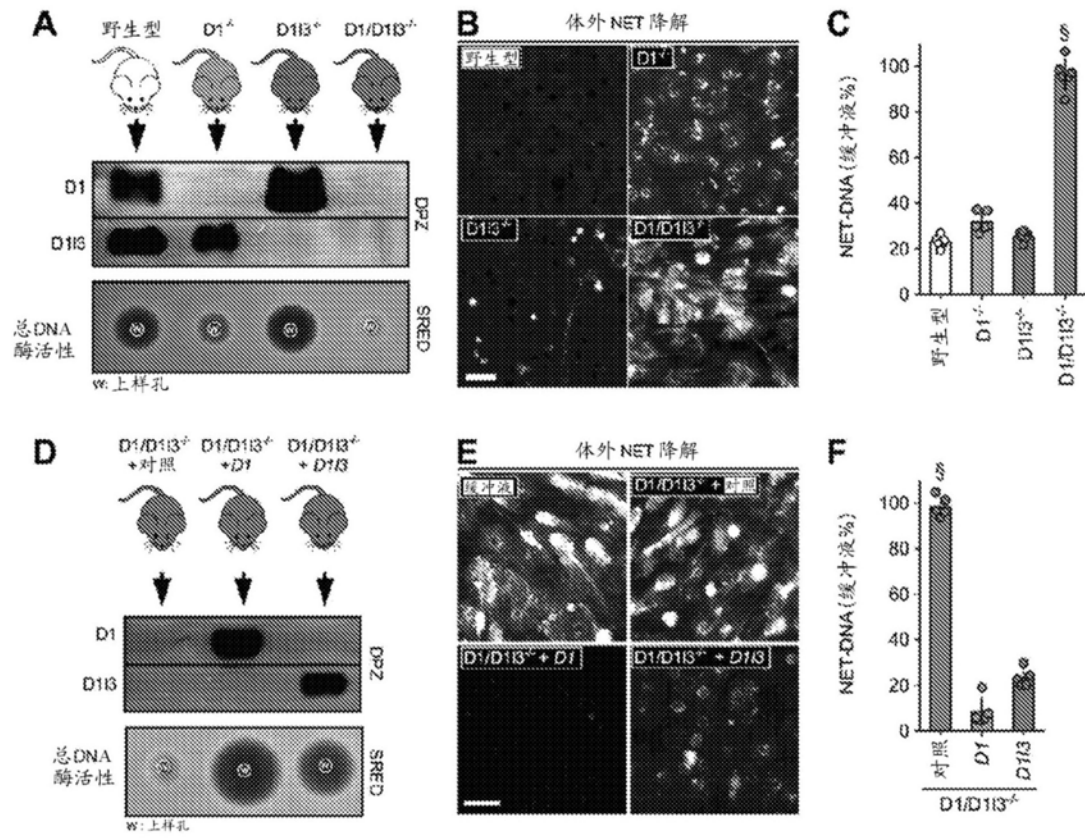


图1A-图1F

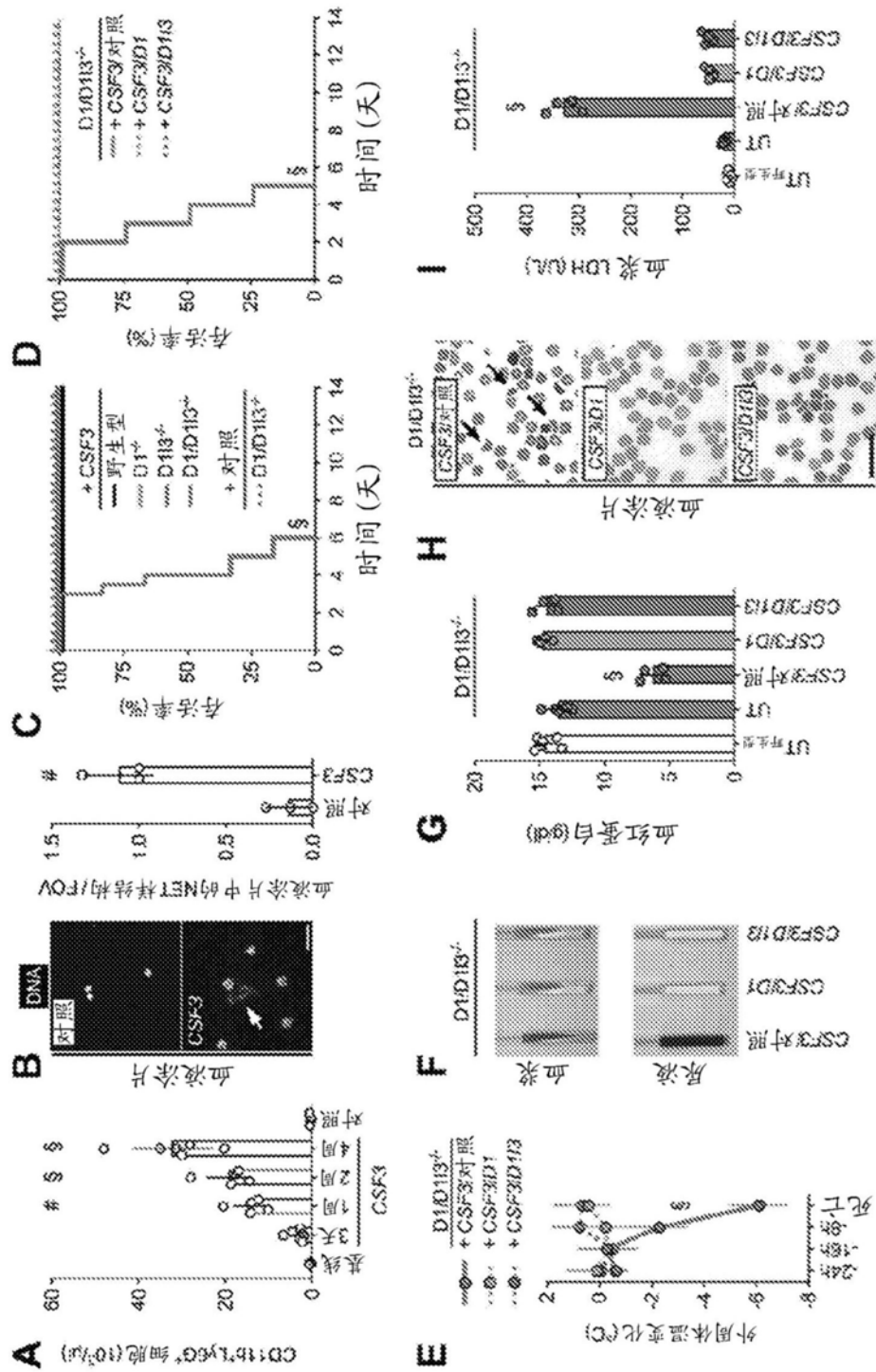


图2A-图2I

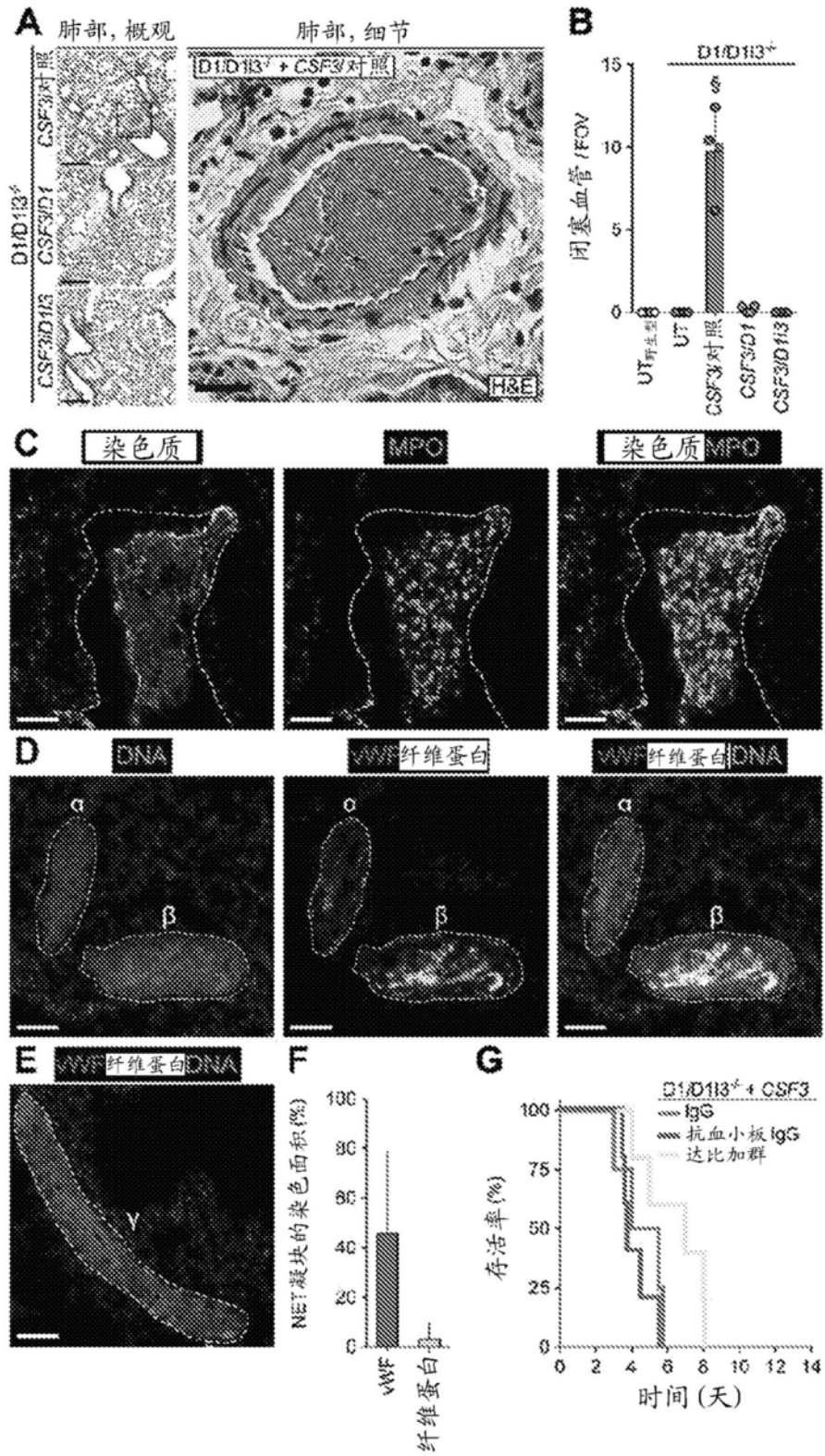


图3A-图3G

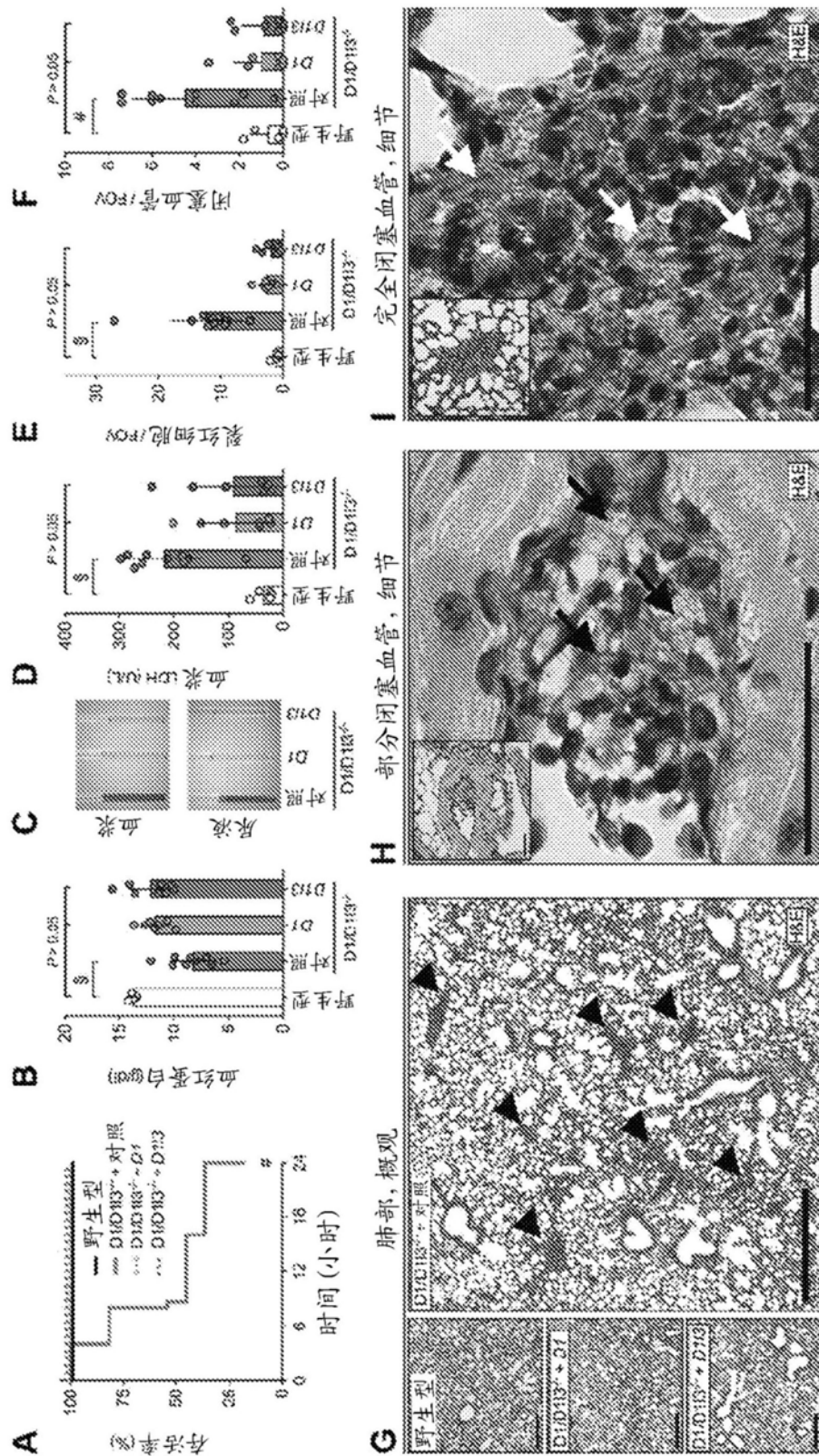


图4A-图4I

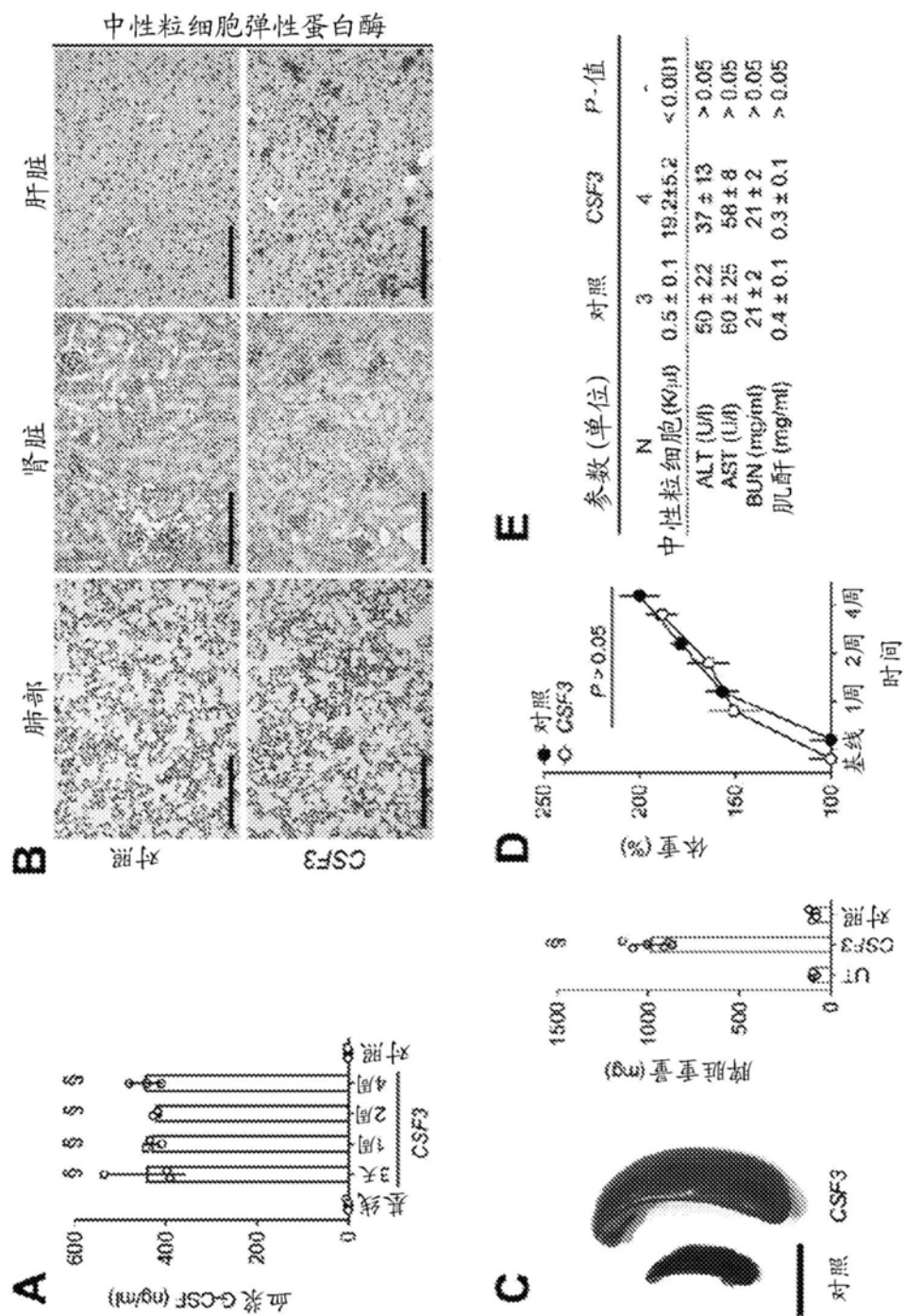


图5A-图5E

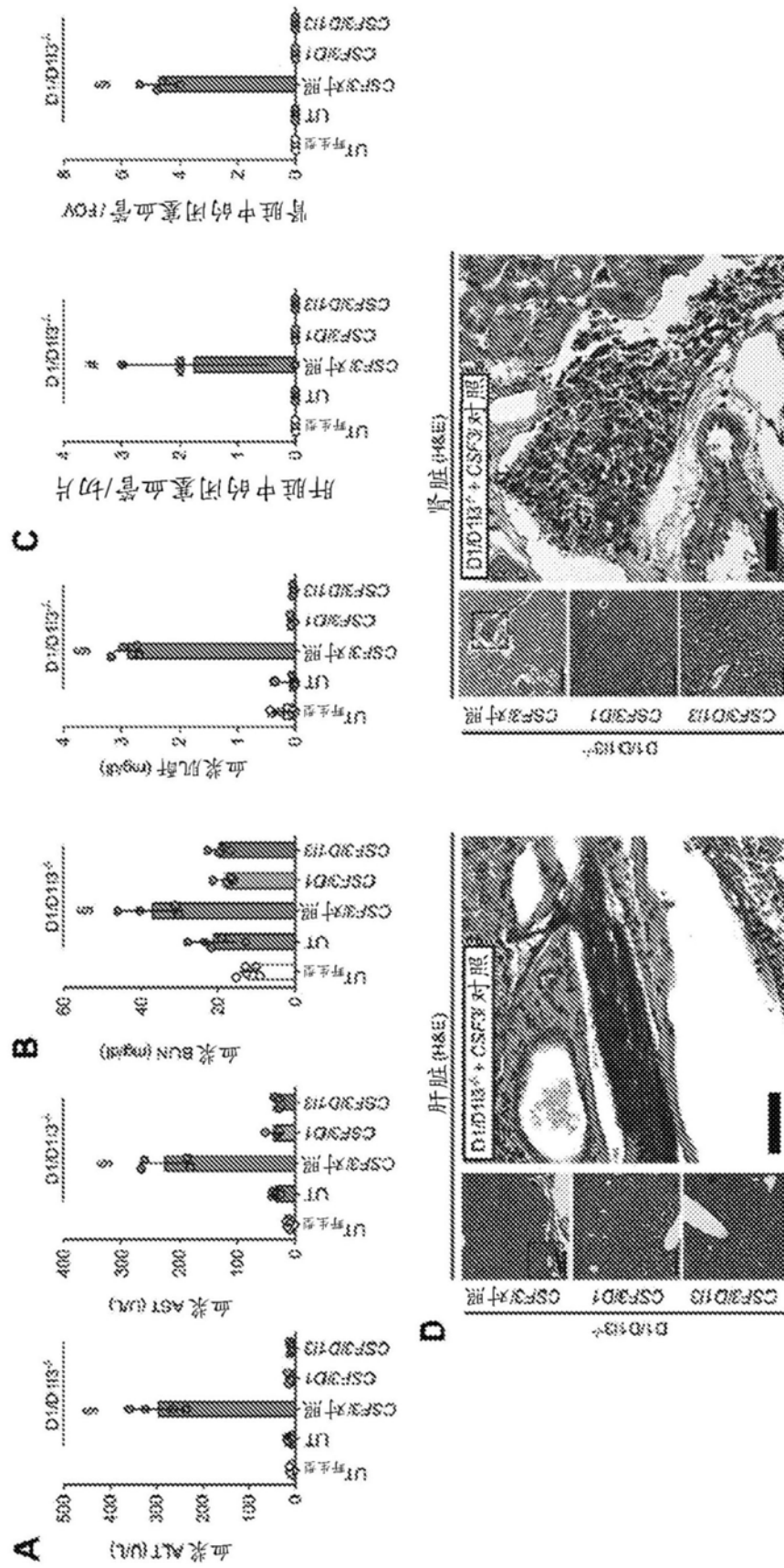


图6A-图6D

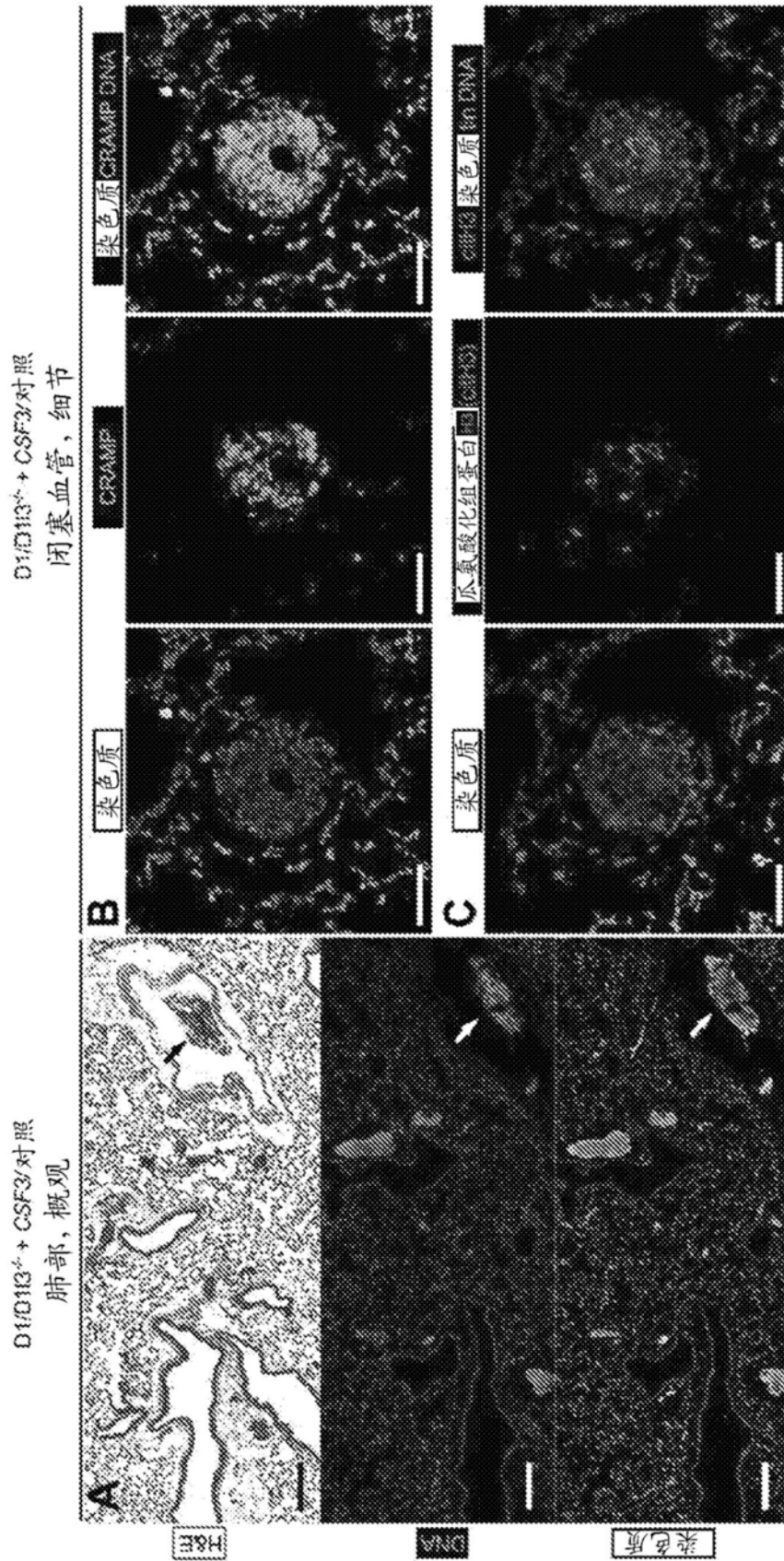


图7A-图7C

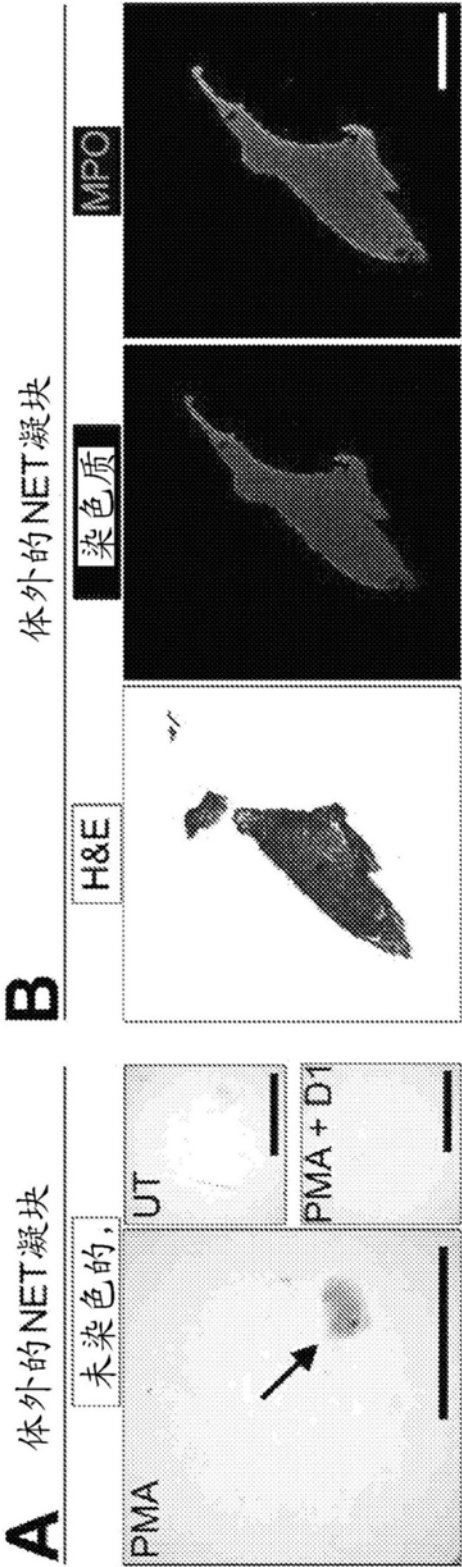


图8A和图8B

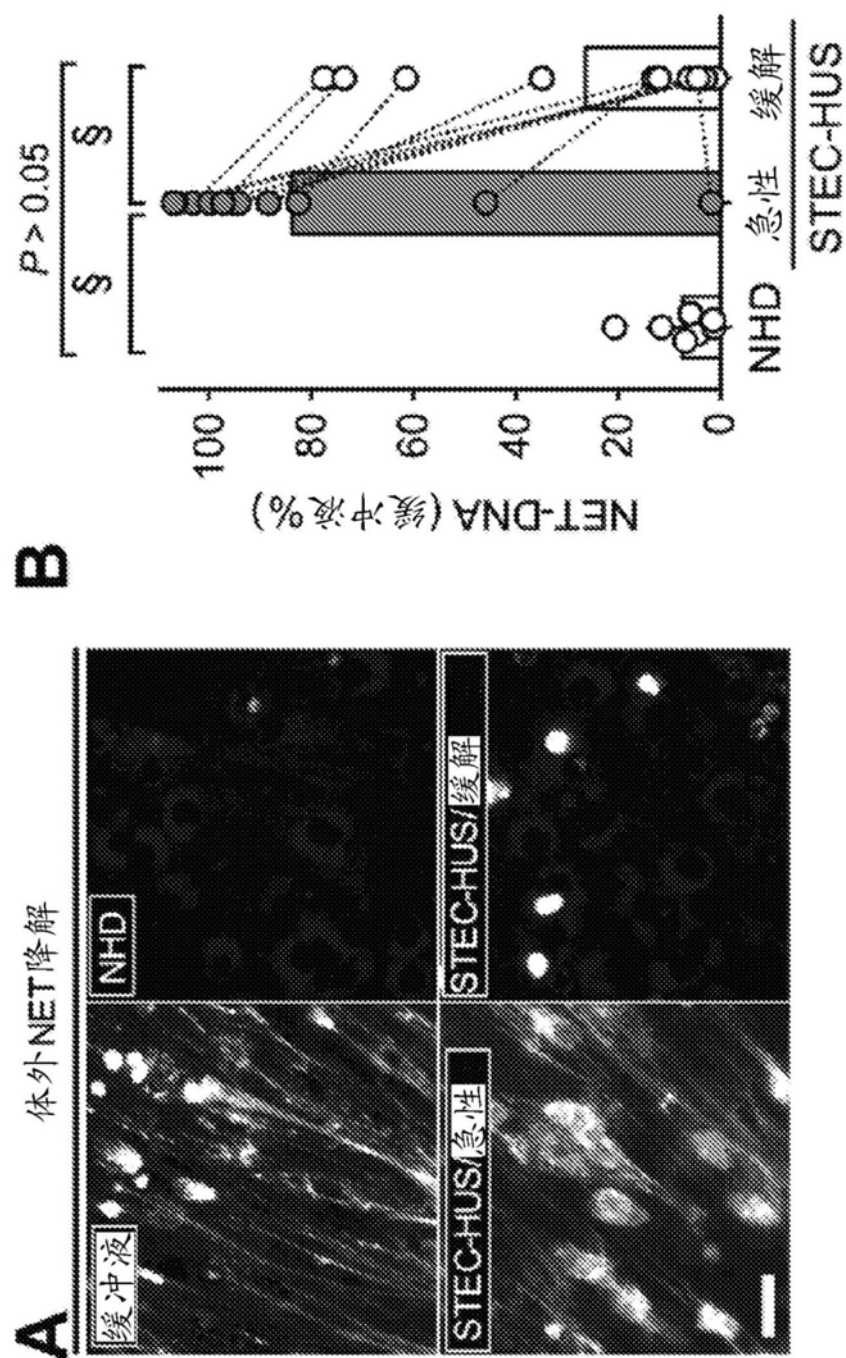


图9A和图9B

#	死亡原因	性别	年龄	组织	富含苏木精的凝块	染色质和MPO阳性	定位
1	ARDS	M	84	肺部	是	是	支气管
2	败血性心血管衰竭+ARDS	F	63	肺部	否	不适用	不适用
3	ARDS	F	67	肺部	否	不适用	不适用
4	败血性多器官衰竭+ARDS	M	72	肺部	是	是	支气管
5	败血性心血管衰竭+ARDS	F	75	肺部	否	不适用	不适用
6	败血性多器官衰竭	M	60	肺部	是	是	血管
7	败血性心血管衰竭	F	76	肺部	是	是	血管
8	ARDS	F	68	肺部	否	不适用	不适用

图10

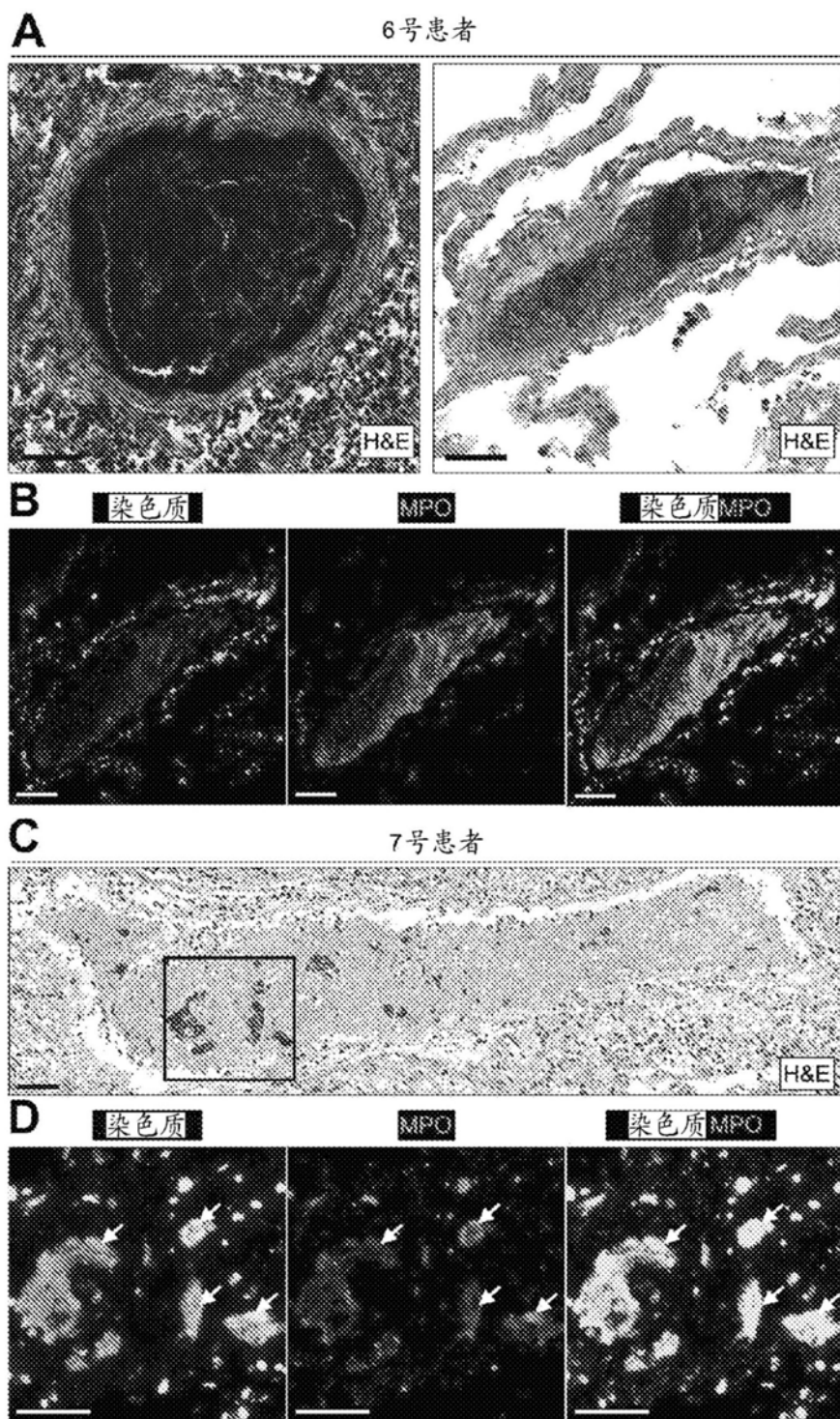


图11A-图11D

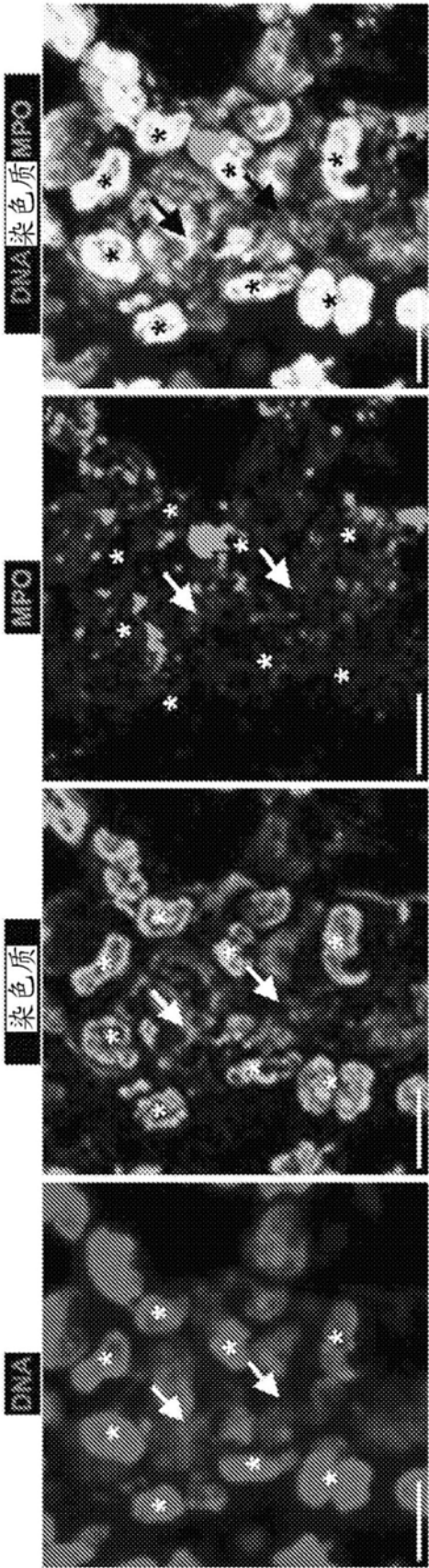


图12

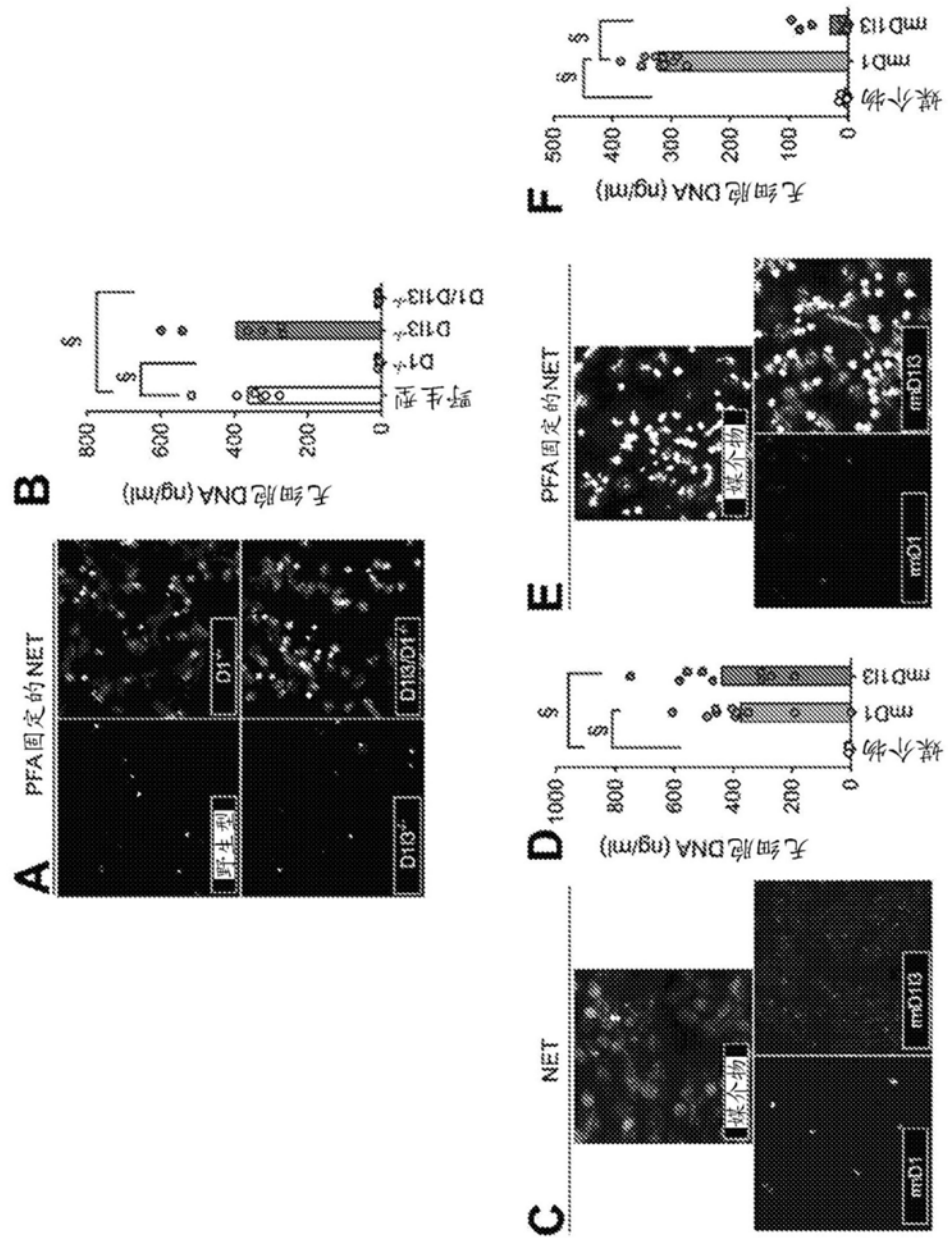


图13A-图13C

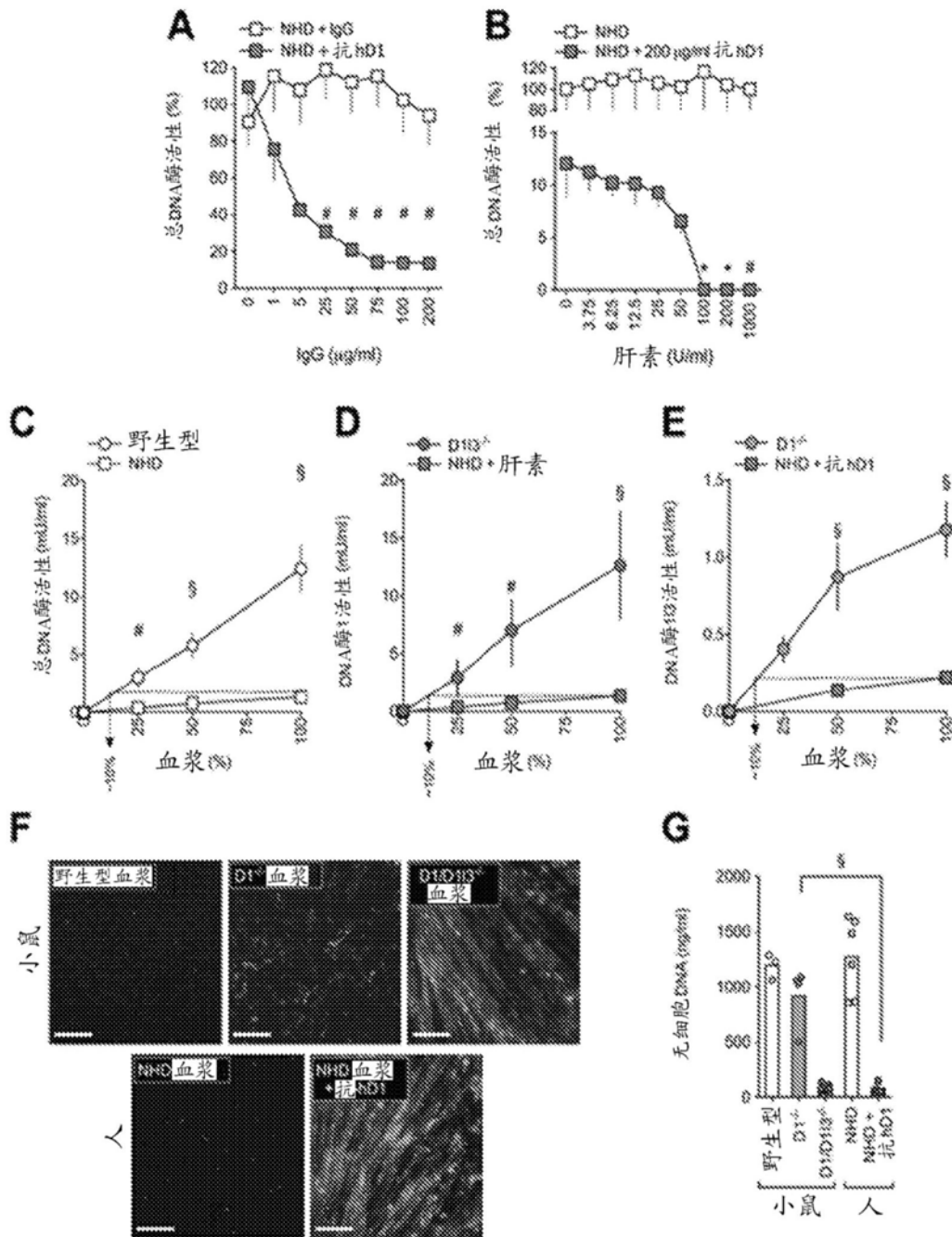


图14A-图14G

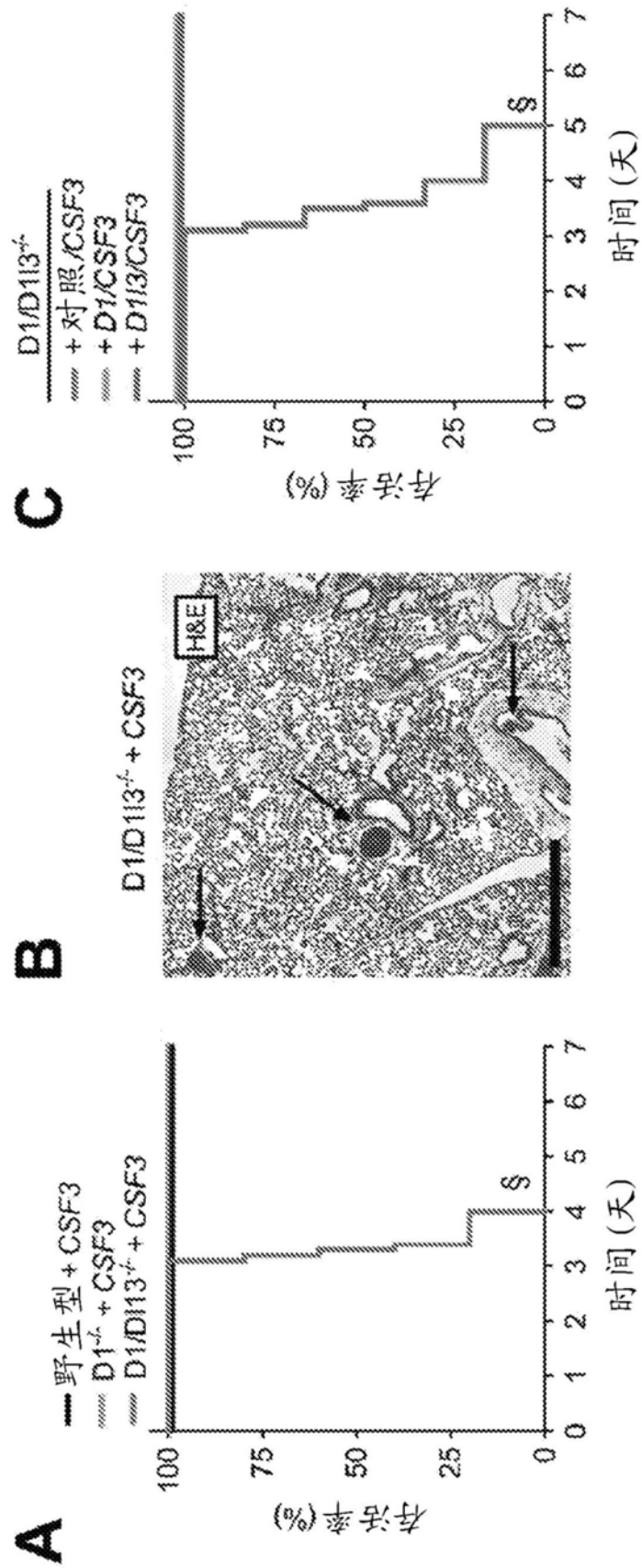


图15A-图15C

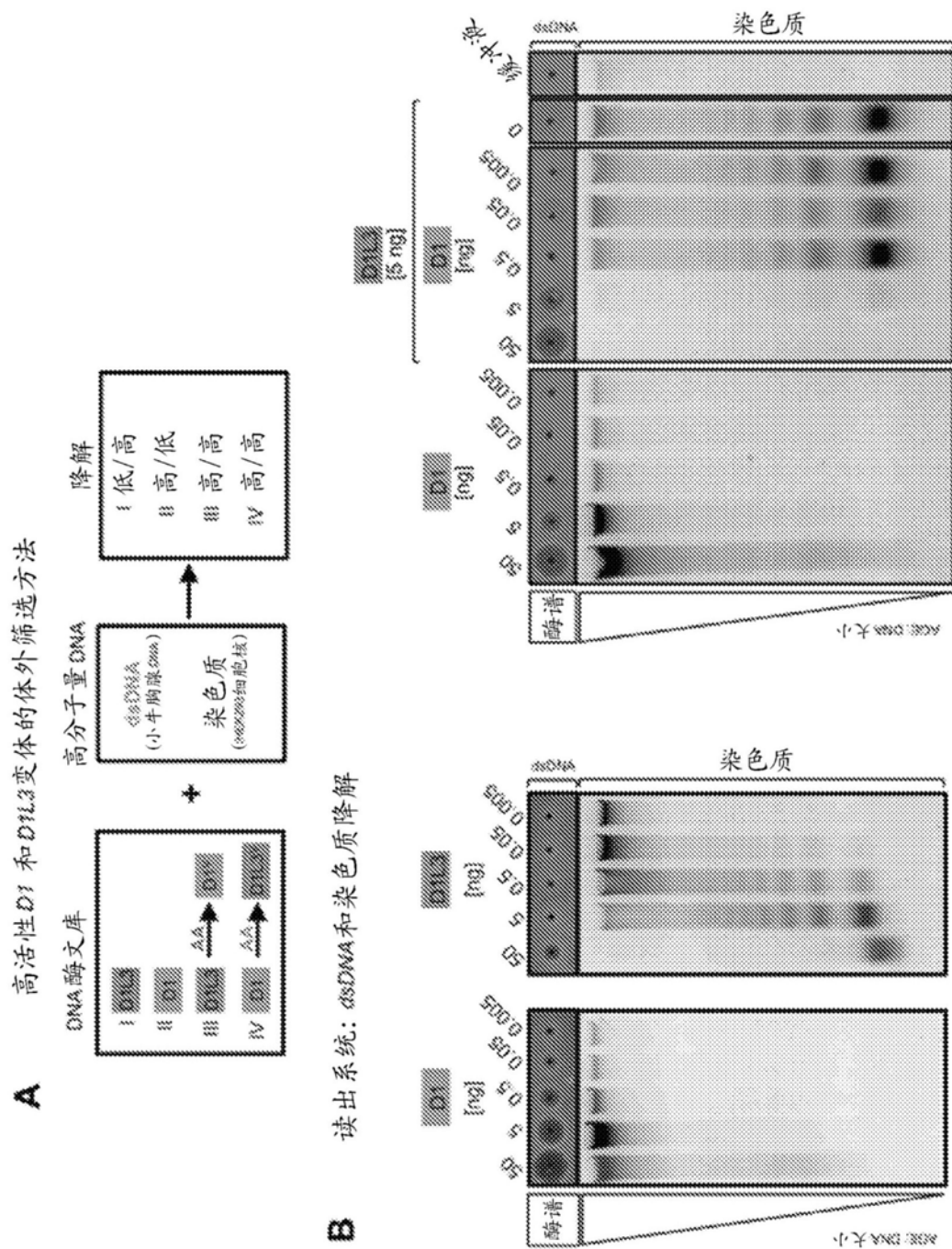


图17

#	DNA酶IL3	DNA酶I	DNA酶I中的突变	在本申请中进行分析
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 (Q115K)	+
16	K180 (K160)	G181 (G159)	G181K (G159K)	+
17	K199 (K179)	P200 (P178)	P200K (P178K)	-
18	K200 (K180)	S201 (S179)	S201K (S179K)	+
19	K203 (K183)	S204 (S182)	S204K (S182K)	+
20	R208 (R188)	W209 (W187)	W209R (W187R)	+
21	R212 (R192)	T213 (T191)	T213R (T191R)	+
22	K226 (K206)	-	A226_T227insK (A204_T205insK)	+
23	K227 (K207)	T227 (T205)	T227K (T205K)	+
24	R239 (R219)	A239 (A217)	A239R (A217R)	+
25	K250 (K230)	D250 (D228)	D250K (D228K)	+
26	K259 (K239)	A259 (A237)	A259K (A237K)	-
27	K262 (K262)	G262 (G240)	G262K (G240K)	-
28	K280 (K260)	M280 (M258)	M280K (M258K)	+
29	R285 (K265)	-	-	-
30	K291 (K271)	-	-	-
31	K292 (K272)	-	-	-
32	R297 (K277)	-	-	-
33	K298 (K278)	-	-	-
34	K299 (K279)	-	-	-
35	K301 (K281)	-	-	-
36	K303 (K283)	-	-	-
37	R304 (K284)	-	-	-

图18

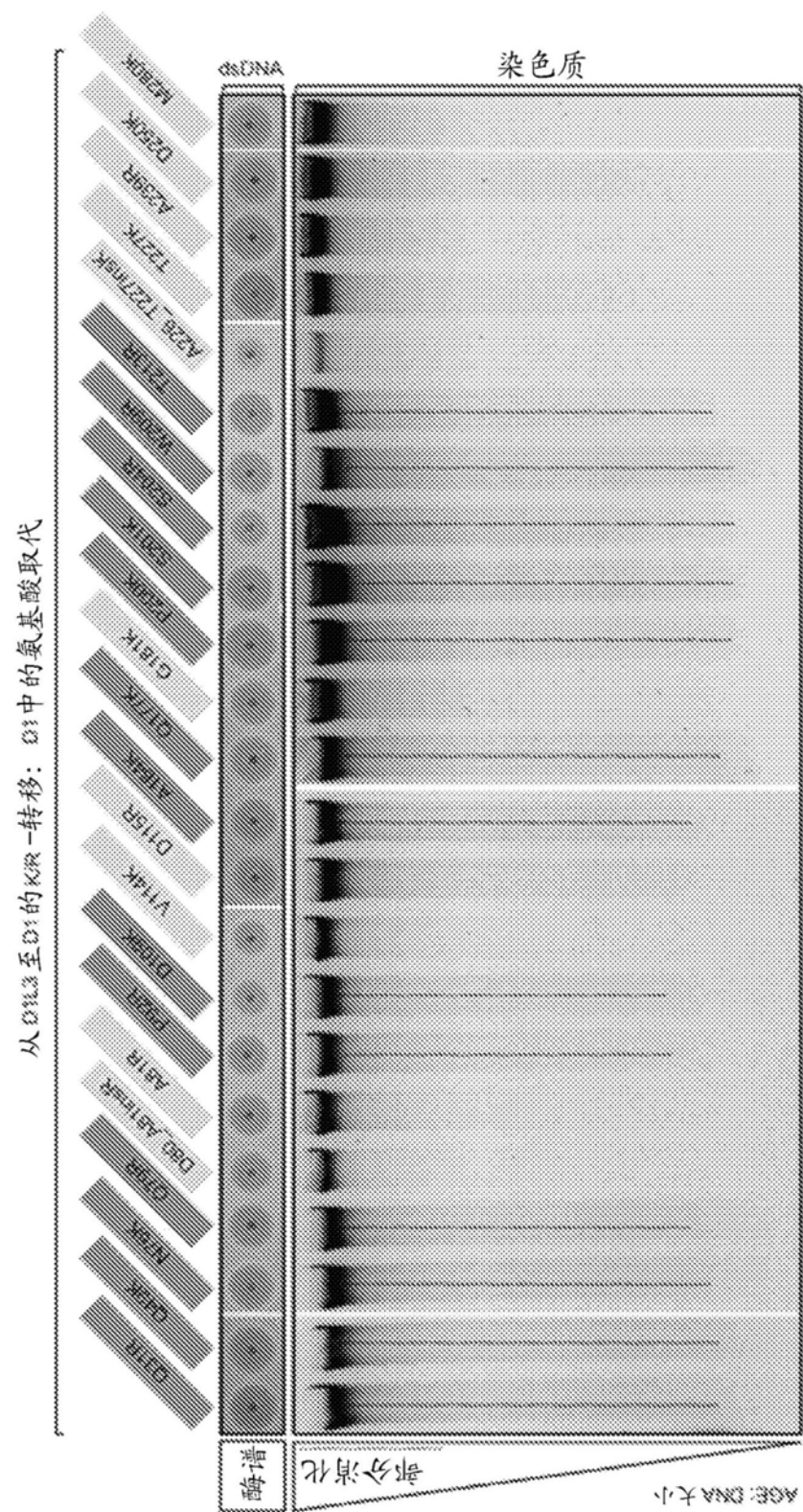


图19

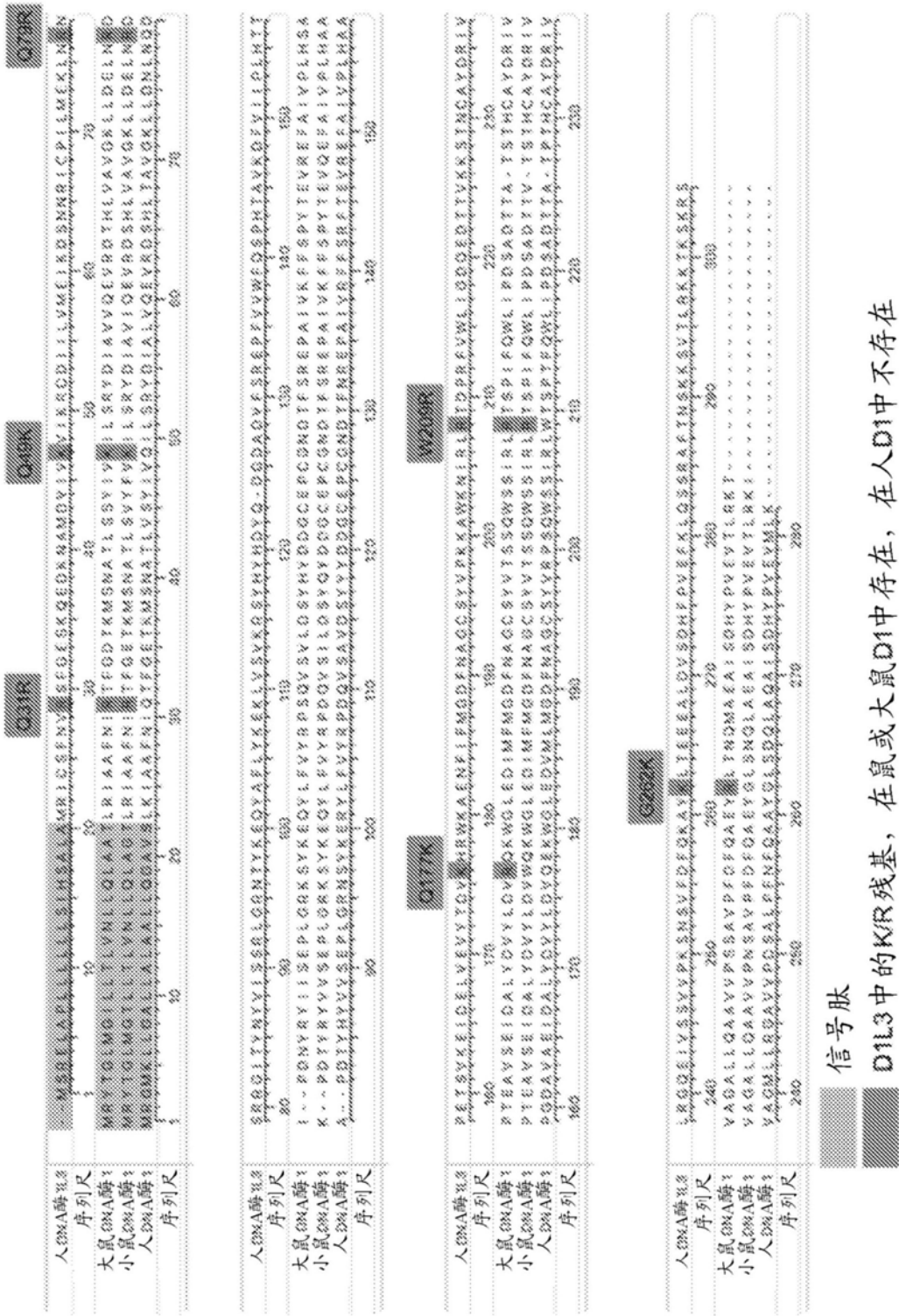


图20

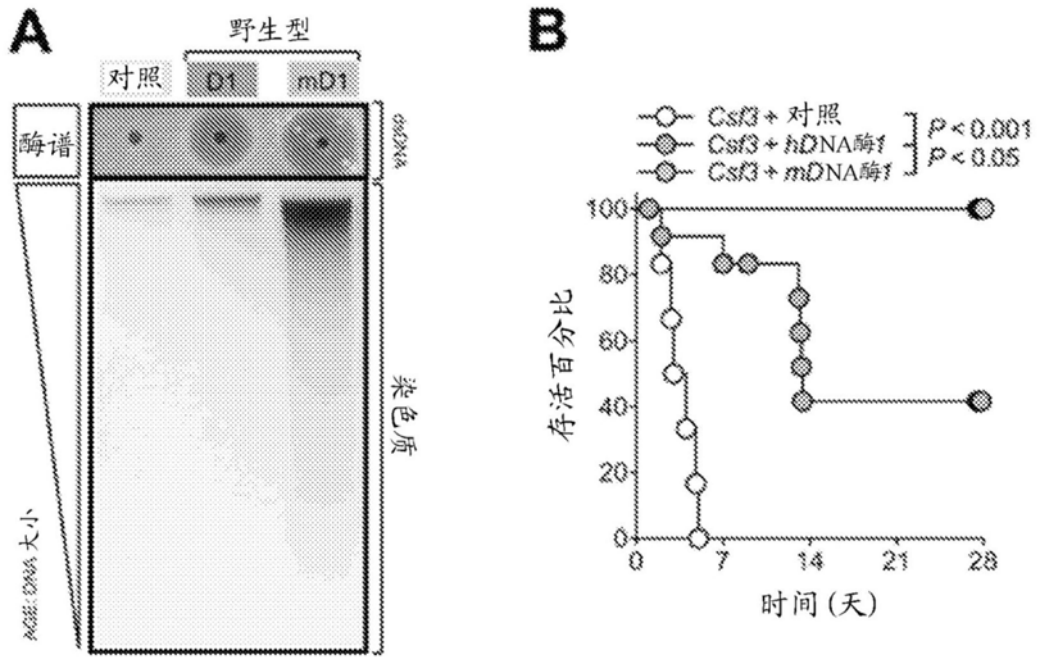


图21

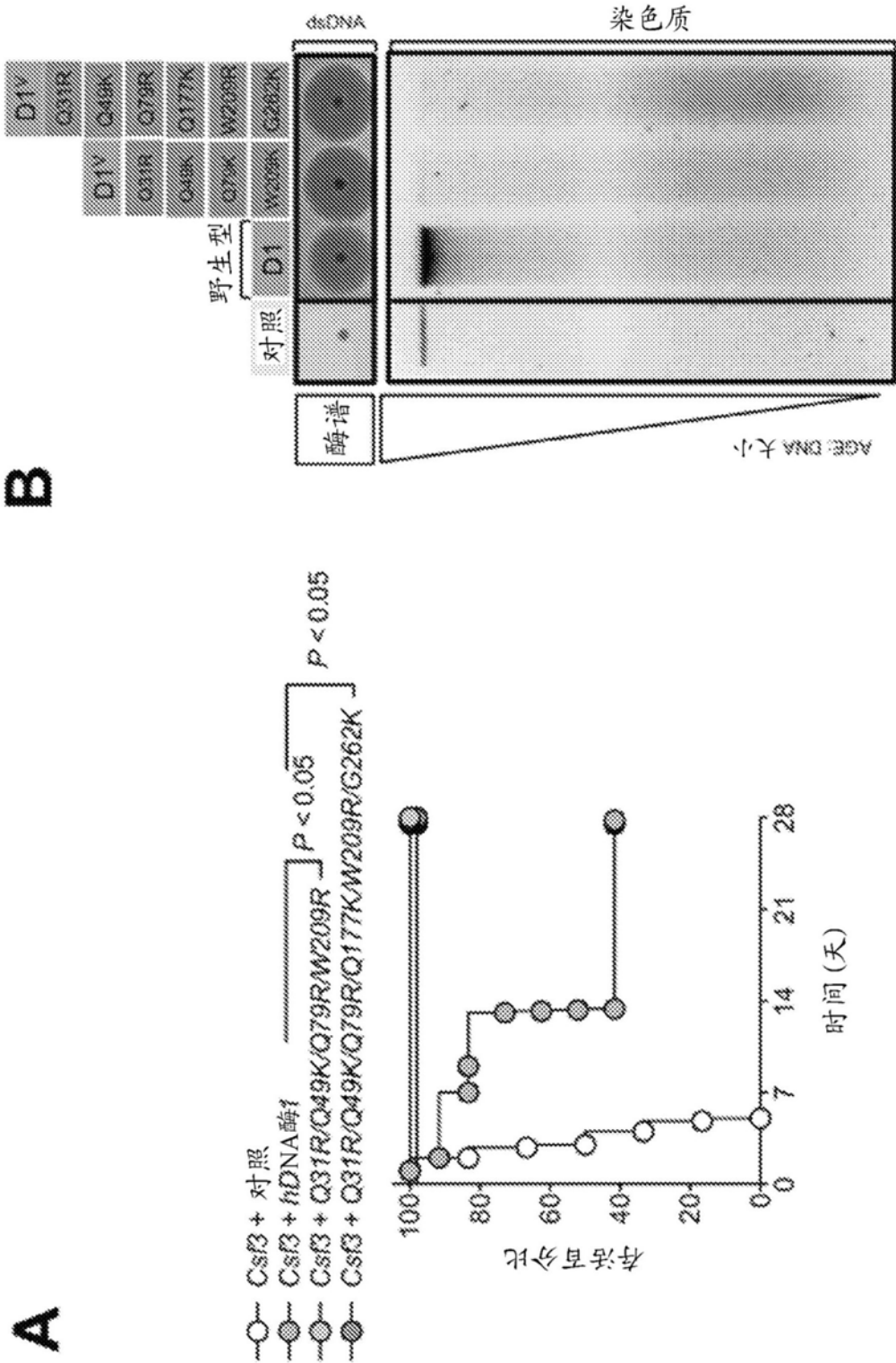


图22

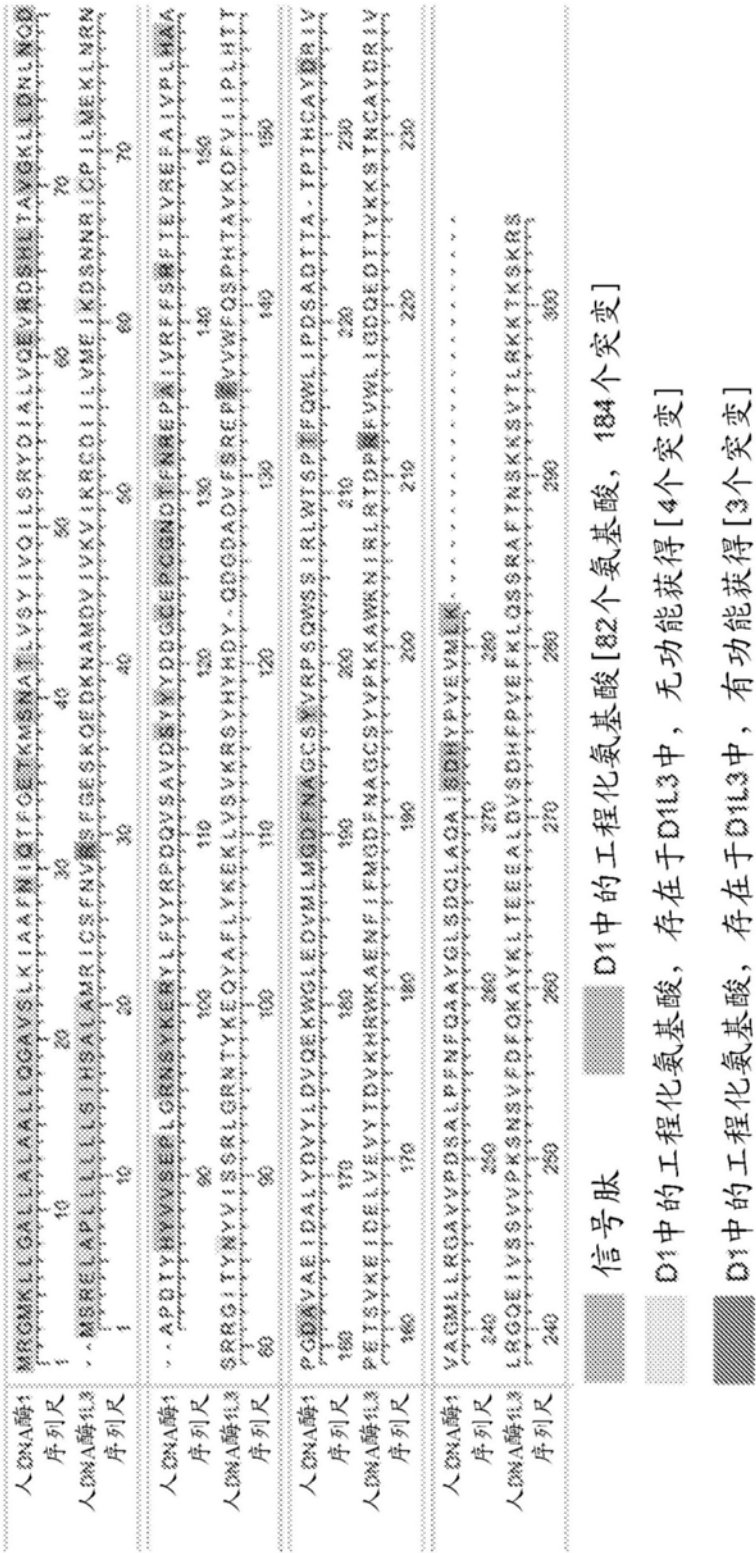


图23

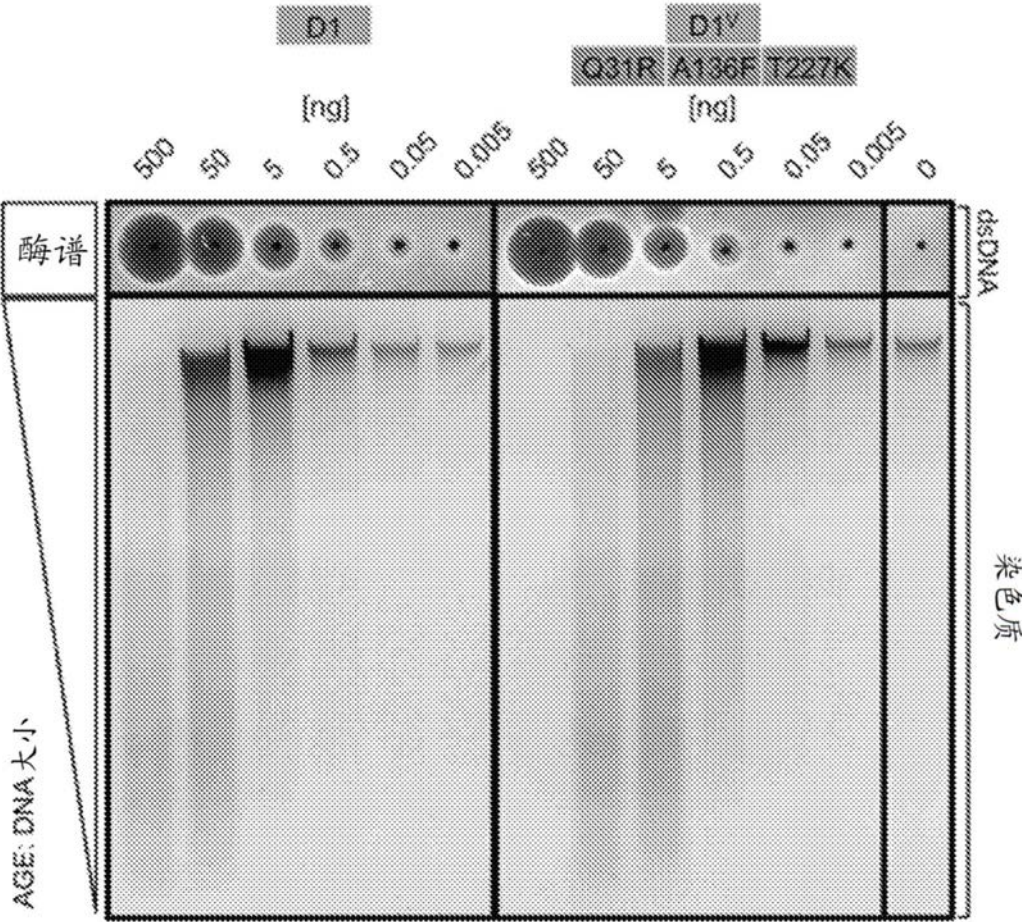


图25

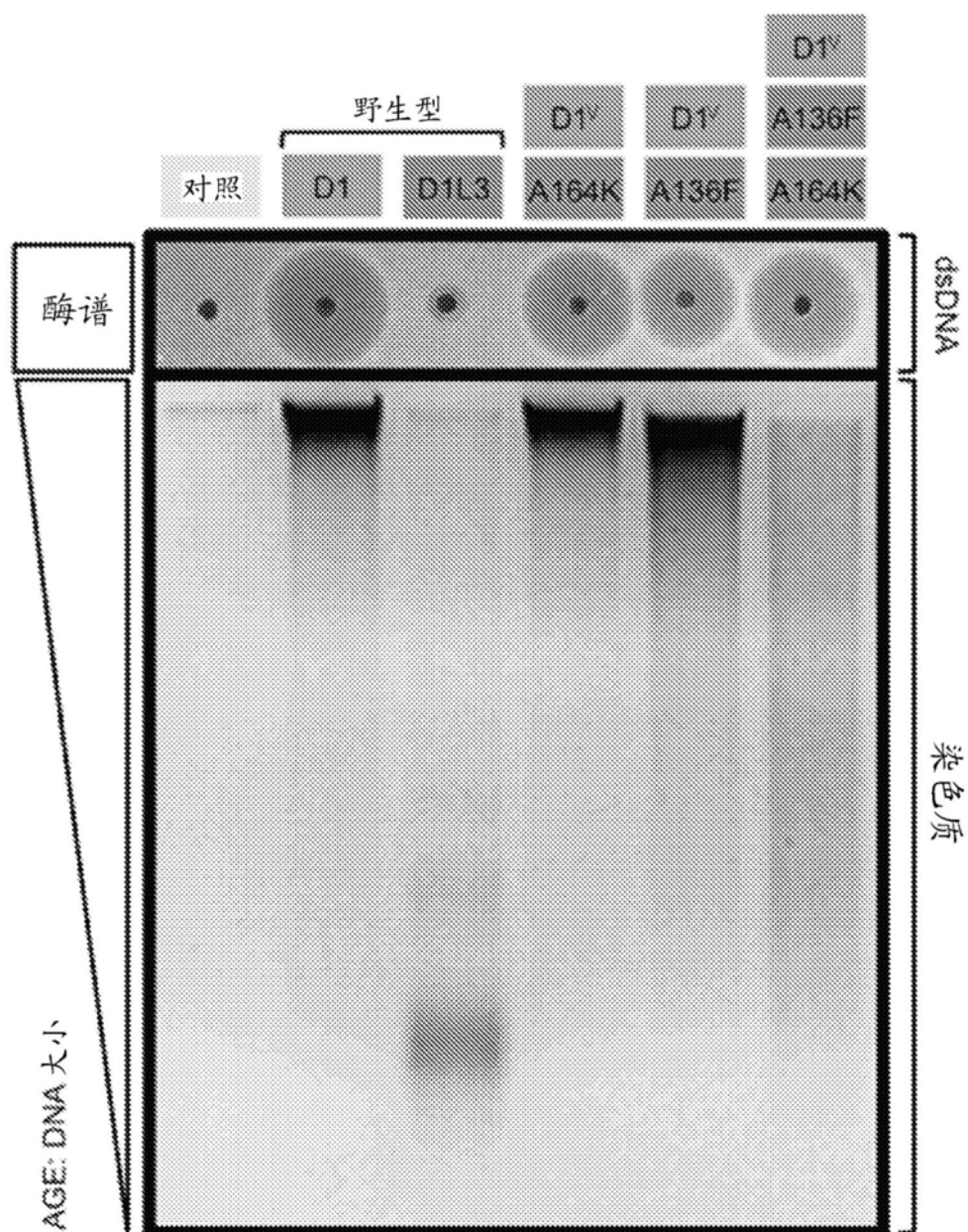


图26

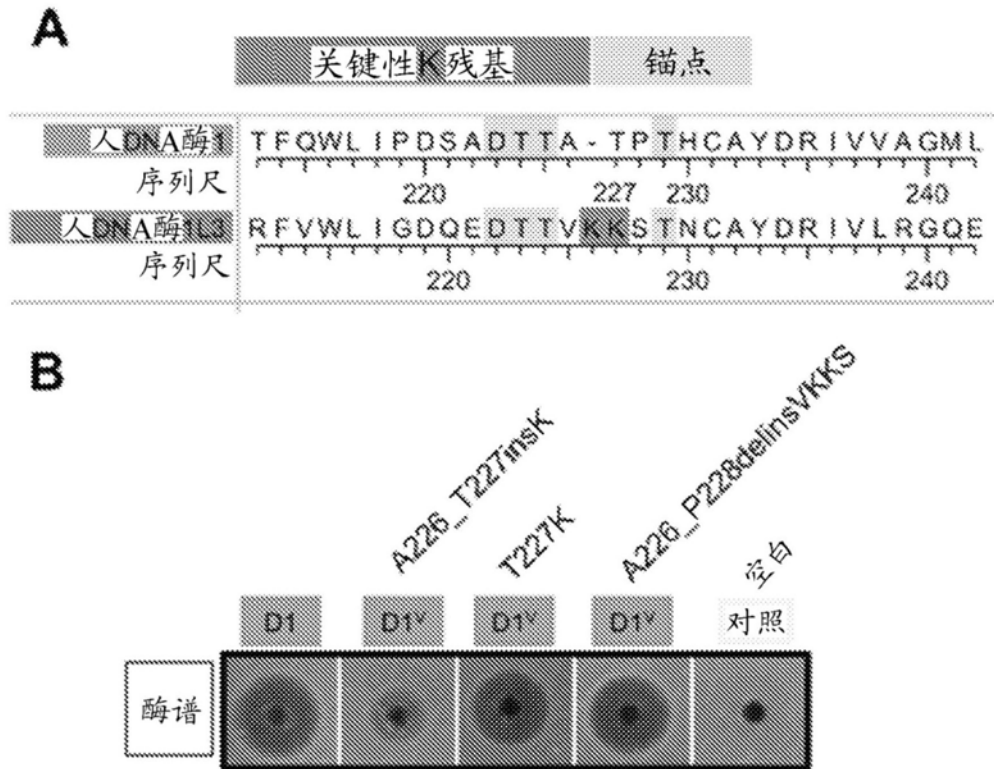


图27

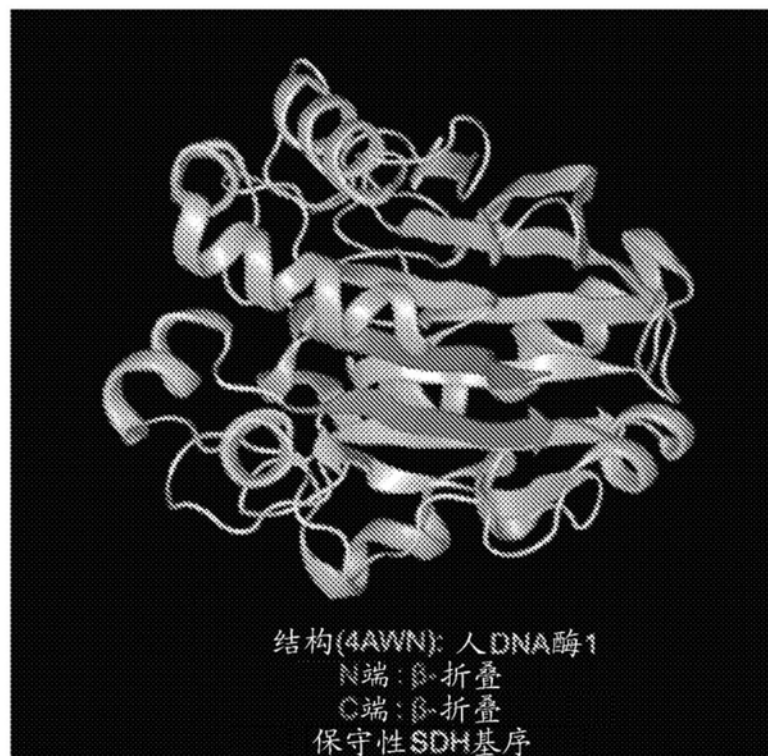
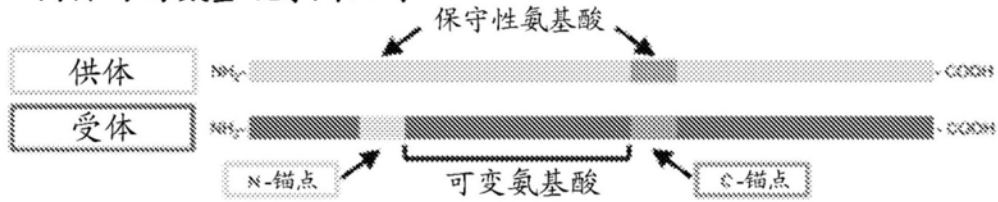


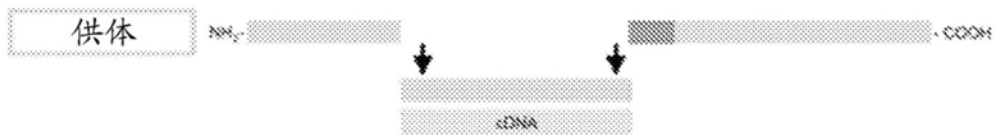
图28

同源蛋白的构建嵌段工程化

I. 同源酶的氨基酸序列比对



II. 切除编码供体酶中的可变氨基酸的CDNA



III. 使编码受体酶中的可变氨基酸的CDNA缺失



IV. 将CDNA从供体转移至受体酶



图29

DNA序列1	小鼠(P49183) 大鼠(P21704) 黑猩猩(H2QAH1) 人(P24855) 序列尺	MRYT-GLMGTLTL--VNLLQAGTLRIAAFN:RTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAY:QEVRSKSHLVAVGKLLDEL MRYT-GLMGILLTL--VNLLQAAATLRIAAFN:RTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDEL MRSM-KLIGALLAL--AALLOGAVSLKIAAFN:QTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDNL MRGM-ALLGALLAL--AALLOGAVSLKIAAFN:QTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDNL 1 MSLHPASPRLASLLIFILALHDTLALRLCSFNVRSGASKKENHEAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL MSLYPASPYLASLLIFILALHGALSRLCSFNVRSGESKKNHNAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL ----MSRELTPLLLLLSIHSTLALRLCSFNVRSGESKQEDQAMDVIVKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL ----MSRELAPLLLLLSIHSAALMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL 1 NRDK--PDYRYVVSSEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSI:LDSCYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVQEFVIVPL NRD!--PDNYRYI:SEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL 80 NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFHSPFTAVKDFVIVPL NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKAKYLYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFQAPFTAAKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL 80 信号肽保守性氨基酸=锚点可变氨基酸=构建嵌段
DNA序列2	小鼠(O55070) 大鼠(O89107) 黑猩猩(H2QMLJ7) 人(O13609) 序列尺	MSLHPASPRLASLLIFILALHDTLALRLCSFNVRSGASKKENHEAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL MSLYPASPYLASLLIFILALHGALSRLCSFNVRSGESKKNHNAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL ----MSRELTPLLLLLSIHSTLALRLCSFNVRSGESKQEDQAMDVIVKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL ----MSRELAPLLLLLSIHSAALMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL 1 NRDK--PDYRYVVSSEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSI:LDSCYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVQEFVIVPL NRD!--PDNYRYI:SEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL 80 NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFHSPFTAVKDFVIVPL NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKAKYLYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFQAPFTAAKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL 80 信号肽保守性氨基酸=锚点可变氨基酸=构建嵌段
DNA序列3	小鼠(P49183) 大鼠(P21704) 黑猩猩(H2QAH1) 人(P24855) 序列尺	MRYT-GLMGTLTL--VNLLQAGTLRIAAFN:RTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAY:QEVRSKSHLVAVGKLLDEL MRYT-GLMGILLTL--VNLLQAAATLRIAAFN:RTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDEL MRSM-KLIGALLAL--AALLOGAVSLKIAAFN:QTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDNL MRGM-ALLGALLAL--AALLOGAVSLKIAAFN:QTFGETKMSNATLSVYFKILSKRYDIAYVQEVRSKSHLVAVGKLLDNL 1 MSLHPASPRLASLLIFILALHDTLALRLCSFNVRSGASKKENHEAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL MSLYPASPYLASLLIFILALHGALSRLCSFNVRSGESKKNHNAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL ----MSRELTPLLLLLSIHSTLALRLCSFNVRSGESKQEDQAMDVIVKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL ----MSRELAPLLLLLSIHSAALMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL 1 NRDK--PDYRYVVSSEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSI:LDSCYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVQEFVIVPL NRD!--PDNYRYI:SEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL 80 NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFHSPFTAVKDFVIVPL NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKAKYLYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFQAPFTAAKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL 80 信号肽保守性氨基酸=锚点可变氨基酸=构建嵌段
DNA序列4	小鼠(O55070) 大鼠(O89107) 黑猩猩(H2QMLJ7) 人(O13609) 序列尺	MSLHPASPRLASLLIFILALHDTLALRLCSFNVRSGASKKENHEAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL MSLYPASPYLASLLIFILALHGALSRLCSFNVRSGESKKNHNAMDIIVKIIKRCOLI:LLMEIKDSSNN:CPMIMEKL ----MSRELTPLLLLLSIHSTLALRLCSFNVRSGESKQEDQAMDVIVKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL ----MSRELAPLLLLLSIHSAALMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIKVKRCODI:LVMEIKDSSNNR:CPILMEKL 1 NRDK--PDYRYVVSSEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSI:LDSCYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVQEFVIVPL NRD!--PDNYRYI:SEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDGGCEPCGNDTFSREPA:VKFFSPYTEVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL NQDA--PDYHYVVSSEPLGRNSYKERYLFVYRPSQVSAVDSYVYDGGCEPCGNDTFSREPA:VRFSSRFTVREFVIVPL 80 NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFHSPFTAVKDFVIVPL NGNSRRSTTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKAKYLYHGYQ-DGDTQVFSREPFVWFQAPFTAAKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL NRNSRRGITTYNYV:SSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKRSYHYHGYQ-DGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIVPL 80 信号肽保守性氨基酸=锚点可变氨基酸=构建嵌段

图30

DNA序列3	小鼠(P49183) 大鼠(P21704) 黑猩猩(H2QAH1) 人(P24855) 序列尺	HAAPTEAVSEIDALYDVYLDVWQKWGLEIMFGDFNAGCSYVTSOWSSIRLRISPIFCWLPDSADTTVT-STHCAYD HSAPTEAVSEIDALYDVYLDVROKKGLEIMFGDFNAGCSYVTSOWSSIRLRISPIFCWLPDSADTTAT-STHCAYD HAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDMFGDFNAGCSYVTPSWSSIRLRISPIFCWLPDSADTTAT-PTHCAVD HAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDMFGDFNAGCSYVTPSWSSIRLRISPIFCWLPDSADTTAT-PTHCAVD 160 170 180 190 200 210 220 230
DNA序列3	小鼠(O55070) 大鼠(O88107) 黑猩猩(H2QAHU7) 人(Q13609) 序列尺	HTTPETSVKEIDELVDVYTDVRSQWKTEFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRIDPKFVWLGQEDTTVKKSTSCAYD HTTPETSVKEIDELADVYTDVRRRNKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRIDPKFVWLGQEDTTVKKSTSCAYD HTTPETSVKEIDELVEVYTDVKKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRIDPKFVWLGQEDTTVKKSTSCAYD HTTPETSVKEIDELVEVYTDVKKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRIDPKFVWLGQEDTTVKKSTSCAYD 160 170 180 190 200 210 220 230
DNA序列3	小鼠(P49183) 大鼠(P21704) 黑猩猩(H2QAH1) 人(P24855) 序列尺	RIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDQAEYGLSNQAEALSDHYPVEVTLRK!- RIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDQAEYRLTNQMAEALSDHYPVEVTLRK! RIVVAGMLLQGAVVPDSALPENEQAAYGLSDQLAQALSDHYPVEVMLK- RIVVAGMLLQGAVVPDSALPENEQAAYGLSDQLAQALSDHYPVEVMLK- 240 250 260 270 280 290 300
DNA序列3	小鼠(O55070) 大鼠(O88107) 黑猩猩(H2QAHU7) 人(Q13609) 序列尺	RIVLCGQEI VNSVVPKSSGVDFQKAYDELSEELDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVSLLKRRKKGNRS RIVLRGQEI VNSVVPKSSGVDFQKAYDELSEELDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVSLLKRRKKGNRS RIVLRGQEI VSSVVPKSSGVDFQKAYDELSEELDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVSLLKRRKKGNRS RIVLRGQEI VSSVVPKSSGVDFQKAYDELSEELDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKSVSLLKRRKKGNRS 240 250 260 270 280 290 300
		信号肽 保守性氨基酸=锚点 可变氨基酸=构建嵌段

图30续

A: 构建嵌段工程化的实例: 具有来自人DNA酶1L3 (D1L3)的构建嵌段的人DNA酶1 (D1)变体

BB #	D1 N-锚点: D1中的保守性氨基酸	D1 C-锚点: D1中的保守性氨基酸	D1 构建嵌段: D1中的可变量氨基酸	D1L3 构建嵌段: D1L3中的可变量氨基酸	D1变体的构建嵌段突变	BB #
0	N/A	N/A	1-22 (MRGMKLL GALLALALLOGAVS)	1-20 (MSRELAPILLILLISHSALA)	M1_S22delinsMSRELAPILLILLISHSALA	BB ₀
1	信号肽	F28N29	23-27 (LKIAA)	21-25 (MRICS)	L23_A27delinsMRICS	BB ₁₋₃
2	F28N29	F33G34	30-32 (KQT)	34-30 (VRS)	L30_T32delinsVRS	BB ₁₋₃
3	F33G34	K37	35-36 (ET)	33-34 (ES)	E35_T36delinsES	BB ₁₋₃
4	K37	V48	38-47 (MSNATLVSY)	38-45 (QEDNAMDVI)	M38_A47delinsQEDNAMDVI	BB ₄
5	V48	R53	49-52 (QILS)	47-50 (KVIK)	M38_A47delinsKVIK	BB ₅₋₇
6	R53	D55	54 (Y)	52 (C)	Y54C	BB ₅₋₇
7	D55	E61	56-60 (IALVQ)	54-58 (RLVM)	I56_Q58delinsRLVM	BB ₅₋₇
8	E61	D64	62-63 (VR)	60-61 (IK)	V62_R63delinsIK	BB ₈₋₁₀
9	D64	L73	65-72 (SHLTAVGK)	63-70 (SNNRICPI)	S65_K72delinsSNNRICPI	BB ₈₋₁₀
10	L73	L77N78	74-76 (LDN)	72-74 (MEK)	L74_N76delinsMEK	BB ₁₁
11	L77N78	V85	79-83 (DQAVDT)	77-84 (QNSRRGRT)	D78_T83delinsQNSRRGRT	BB ₁₁
12	V85	V87	85 (H)	86 (N)	N86H	BB ₁₁₋₁₃
13	V87	S90	88-89 (VV)	88-89 (VV)	V88_V89delinsVV	BB ₁₁₋₁₃
14	S90	L93G94R95	91-92 (SQ)	91-92 (SQ)	S91_S92delinsSQ	BB ₁₄₋₁₆
15	L93G94R95	Y96K99E100	95-97 (NS)	95-97 (NT)	N96_S97delinsNT	BB ₁₄₋₁₆
16	Y96K99E100	Y102	101 (R)	101 (Q)	R101Q	BB ₁₄₋₁₆
17	Y102	F104	103 (L)	103 (A)	L103A	BB ₁₄₋₁₆
18	F104	Y106	105 (V)	105 (L)	V105L	BB ₁₄₋₁₆
19	Y106	V111S112	107-110 (RPDQ)	107-110 (KEKL)	R107_Q110delinsKEKL	BB ₁₈₋₁₉
20	Y111S112	Y117	113-116 (AVDS)	113-116 (VGRS)	A113_S116delinsVGRS	BB ₁₈₋₁₉
21	Y117	Y119	118 (Y)	118 (H)	Y118H	BB ₁₈₋₁₉
22	Y119	D121	120 (Q)	120 (H)	D120H	BB ₁₈₋₁₉
23	D121	D128	122-128 (GCEPCGN)	123-127 (YQGGDA)	G122_N128delinsYQGGDA	BB ₂₀₋₂₂
24	D128	F131	130 (T)	129 (V)	T130S	BB ₂₀₋₂₂
25	F131	R133E134P135	132 (N)	131 (S)	N132S	BB ₂₀₋₂₂
26	R133E134P135	V138	135-137 (SI)	135-137 (PV)	A136_V137delinsPV	BB ₂₃
27	V138	F140	139 (R)	138 (W)	R139W	BB ₂₃
28	F140	T145	141-144 (FSRF)	140-143 (QSPH)	F141_F144delinsQSPH	BB ₂₃
29	T145	F150	146-149 (EVRE)	145-148 (AVKD)	E146_E148delinsAVKD	BB ₂₃
30	F150	I152	151 (A)	150 (V)	A151V	BB ₂₃
31	I152	P154L155H156	153 (V)	152 (G)	V153I	BB ₂₃
32	P154L155H156	P159	157-158 (AA)	156-157 (TT)	A157_A158delinsTT	BB ₂₃
33	P159	V163	160-162 (GDA)	159-161 (ETS)	G160_A162delinsETS	BB ₂₃
34	V163	E165H166Q167	164 (A)	163 (K)	A164K	BB ₂₃

图31

A: 续

BB #	D1 N-端描述: D1中的保守性氨基酸	D1 C-端描述: D1中的保守性氨基酸	D1中的可变氨基酸	D1L3中的可变氨基酸	D1变体的构建片段突变	BB #
35	E165/E166/D167	L169	168 (A)	167 (E)	A168E	BB #36
36	L169	V172/V173	170-171 (YD)	169-171 (VE)	V170_D171delinsVE	
37	V172/V173	Q175/V176	174 (L)	173 (T)	L174T	
38	D175/V176	W180	177-179 (QEK)	176-178 (KRR)	Q177_K178delinsKRR	BB #39
39	W180	E183	181-182 (QL)	180-181 (KA)	G181_L182delinsKA	
40	E183	M187-GDP-NAGCSY- V198	184-187 (DVMIL)	183-187 (NPIF)	Q184_L187delinsNPIF	
41	M187-GDP-NAGCSY/V198	W203	198-202 (SPSQ)	198-201 (PKKA)	R199_Q202delinsPKKA	BB #42
42	W203	D205/Q207/L208	204-205 (SS)	203-204 (KA)	S204_S205delinsKA	
43	D205/R207/L208	T210	209 (W)	208 (R)	W209R	
44	T210	P212	211 (S)	210 (D)	S211D	BB #45
45	P212	F214	213 (I)	212 (R)	I213R	
46	F214	W216/L217/P218	215 (Q)	214 (V)	Q215V	
47	W216/L217/P218	D220	219 (P)	218 (G)	P219G	BB #48
48	D220	D223/P224/T225	221-222 (SA)	220-221 (QE)	S221_A222delinsQE	
49	D223/T224/T225	T229	225-228 (ATP)	225-228 (VSGS)	A225_P228delinsVSGS	
50	T229	C231-AYDR-V237	230 (H)	230 (N)	H230N	BB #51
51	C231-AYDR-V237	G240	236-239 (VA)	236-239 (LR)	V239_A239delinsLR	
52	G240	V247/V248/P249	241-246 (MLRGA)	241-246 (QENVSS)	M241_A246delinsQENVSS	
53	V247/V248/P249	S251	250 (D)	250 (K)	D250K	BB #54
54	S251	F255	252-254 (ALP)	252-254 (NSV)	A252_P254delinsNSV	
55	F255	F257/Q258	256 (N)	256 (D)	N256D	
56	F257/Q258	Y261	259-260 (AA)	259-260 (KA)	A259_A260delinsKA	BB #57
57	Y261	L263	262 (G)	262 (K)	G262K	
58	L263	A268	264-267 (SQDL)	264-267 (TEEE)	S264_L267delinsTEEE	
59	A268	S272/D273/H274	269-271 (QAM)	269-271 (LDV)	Q269_L271delinsLDV	BB #60
60	S272/D273/H274	P276/V277/E278	275 (Y)	275 (F)	Y275F	
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (VM)	279-280 (FK)	V279_M280delinsFK	
62	L281	-	282 (K)	282-305 (QSSRAFTNSKK SVTLRKKTKSKRS)	K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS	BB #63

图31续

B: 构建嵌段工程化的实例: 具有来自人DNA酶1(D1)的构建嵌段的人DNA酶1L3(D1L3)变体

BB #	D1L3 N-端点: D1中的保守性氨基酸	D1L3 C-端点: D1中的保守性氨基酸	D1L3 构建嵌段: D1L3中的可变氨基酸	D1 构建嵌段: D1中的可变氨基酸	D1L3 变体的构建嵌段突变	BB #
0	N/A	N/A	1-20 (MSRELAPLLLLLSHPSALA)	1-22 (MIRGMKLL GALLALALLOGAVS)	M1_A20delmsMIRGMKLLGALLALA	BB ₀
1	信号肽	F26N27	21-25 (MIRCS)	23-27 (LKIAA)	ALLOGAVS	BB ₁
2	F26N27	F31G32	28-30 (VRS)	30-32 (TOT)	M21_S25delmsLKIAA	BB ₂₋₃
3	F33G34	K35	33-34 (ES)	35-36 (ET)	V28_S33delmsTOT E33_S34delmsET	BB ₄₋₅
4	K35	V46	36-45 (SEDNADQNV)	38-47 (MSNATLVSV)	Q36_A45delmsMSNATLVSV	BB ₆
5	V46	R51	47-50 (KVRK)	49-52 (QLS)	K47_K50delmsQLS	BB ₇₋₉
6	R51	D53	52 (C)	54 (V)	C52Y	BB ₁₀₋₁₁
7	D53	E59	54-58 (ILVM)	59-60 (IALVQ)	I54_M58delmsIALVQ	BB ₁₂₋₁₄
8	E59	D62	60-61 (K)	62-63 (VR)	I60_A61delmsVR	BB ₁₅₋₁₆
9	D62	L71	63-70 (SNRRCP)	65-72 (SHLTAVGK)	S63_I70delmsSHLTAVGK	BB ₁₇₋₁₈
10	L71	L75N76	72-74 (MEK)	74-76 (LDN)	M72_K74delmsLDN	BB ₁₉
11	L75N76	Y85	77-84 (RNSRRGIT)	79-84 (QDAPDT)	R77_I94delmsQDAPDT	BB ₂₀₋₂₁
12	Y85	Y87	86 (N)	86 (H)	N86H	BB ₂₂₋₂₃
13	Y87	S90	88-89 (VR)	88-89 (VV)	V88_I89delmsVV	BB ₂₄₋₂₅
14	S90	L93G94R95	91-92 (SR)	91-92 (EP)	S91_R92delmsEP	BB ₂₆₋₂₇
15	L93G94R95	Y98K99E100	96-97 (NT)	96-97 (NS)	N96_I97delmsNS	BB ₂₈₋₂₉
16	Y98K99E100	Y102	101 (Q)	101 (R)	Q101R	BB ₃₀₋₃₁
17	Y102	F104	103 (A)	103 (L)	A103L	BB ₃₂₋₃₃
18	F104	Y106	105 (L)	105 (V)	L105V	BB ₃₄₋₃₅
19	Y106	V111S112	107-110 (KENL)	107-110 (RPDD)	K107_L110delmsRPDD	BB ₃₆₋₃₇
20	Y111S112	Y117	113-116 (VKRS)	113-116 (AVDS)	V113_S116delmsAVDS	BB ₃₈₋₃₉
21	Y117	Y119	118 (H)	118 (Y)	H118Y	BB ₄₀₋₄₁
22	Y119	D121	120 (H)	120 (D)	H120D	BB ₄₂₋₄₃
23	D121	D126	122-127 (VGGDA)	122-128 (GCEPCGN)	Y122_A127delmsGCEPCGN	BB ₄₄₋₄₅
24	D126	F130	129 (V)	130 (I)	V129I	BB ₄₆₋₄₇
25	F130	R132E133P134	131 (S)	132 (N)	S131N	BB ₄₈₋₄₉
26	R132E133P134	V137	135-136 (FV)	136-137 (AI)	I36F_I36VdelmsAI	BB ₅₀₋₅₁
27	V137	F139	138 (W)	138 (R)	W138R	BB ₅₂₋₅₃
28	F139	T144	140-143 (QSPH)	141-144 (FSHF)	Q140_H143delmsFSHF	BB ₅₄₋₅₅
29	T144	F149	145-148 (AVKD)	146-149 (EVRE)	A145_D148delmsAVKD	BB ₅₆₋₅₇
30	F149	H51	150 (V)	151 (A)	V150A	BB ₅₈₋₅₉
31	H51	P153L154H155	152 (I)	153 (V)	I152A	BB ₆₀₋₆₁
32	P153L154H155	P157	156-157 (TTT)	157-159 (AA)	T156_T157delmsAA	BB ₆₂₋₆₃
33	P157	V162	159-161 (ETG)	160-162 (GDA)	E159_S161delmsGDA	BB ₆₄₋₆₅
34	V162	E162R165D166	163 (R)	164 (A)	R163A	BB ₆₆₋₆₇

图31续

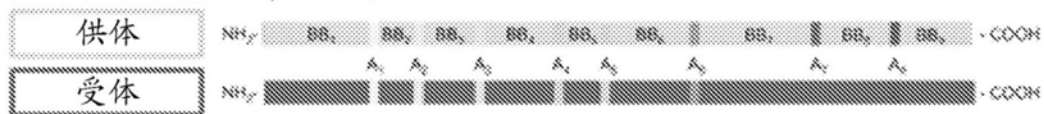
B: 续

BB #	D1L3 靶: 锚点: D1L3 中的保守性氨基酸	D1L3 C- 锚点: D1L3 中的保守性氨基酸	D1L3 构建肽: D1L3 中的可变氨基酸	D1L3 构建肽: D1L3 中的可变氨基酸	D1L3 变体的构建嵌段突变	BB 域
35	E184/D185/D186 L168	L168	167 (E)	168 (A)	E167A	BB ₃₄₋₃₇
36	L168	V171/Y172	169-170 (VE)	170-171 (YD)	V169_E170delinsYD	BB ₃₄₋₃₇
37	V171/Y172	D174/V175	173 (T)	174 (L)	T173L	BB ₃₄₋₃₇
38	D174/V175	W179	176-179 (KRR)	177-179 (QEK)	K176_R178delinsQEK	BB ₃₄₋₃₇
39	W179	E182	180-181 (KA)	181-182 (GL)	K180_A181delinsGL	BB ₃₄₋₃₇
40	E182	M187-GDPNAGCSY- V197	183-186 (NFF)	184-187 (DVML)	N183_F186delinsDVML	BB ₃₄₋₃₇
41	M187-GDPNAGCSY-V197	W202	189-201 (PKKA)	199-202 (RPSQ)	198P_201AdeinsRPSQ	BB ₃₄₋₃₇
42	W202	I305/R206/L307	203-204 (KN)	204-205 (SS)	K203_N204delinsSS	BB ₃₄₋₃₇
43	I205/R206/L207	T209	208 (R)	208 (W)	R208W	BB ₃₄₋₃₇
44	T209	P211	210 (D)	211 (S)	D210S	BB ₃₄₋₃₇
45	P211	F213	212 (R)	213 (T)	R212T	BB ₃₄₋₃₇
46	F213	W215/L216/I217	214 (V)	215 (Q)	V214Q	BB ₃₄₋₃₇
47	W215/L216/I217	D219	218 (G)	219 (P)	G218P	BB ₃₄₋₃₇
48	D219	D222/T223/T224	220-221 (QE)	221-222 (SA)	Q220_E221delinsSA	BB ₃₄₋₃₇
49	D222/T223/T224	T229	225-228 (VKKK)	226-229 (ATP)	V225_S228delinsATP	BB ₃₄₋₃₇
50	T229	C231-AYDRI-V237	230 (N)	230 (M)	N230H	BB ₃₄₋₃₇
51	C231-AYDRI-V237	G240	238-239 (LR)	238-239 (VA)	L238_R239delinsVA	BB ₃₄₋₃₇
52	G240	V247/V248/P249	241-246 (QEVSS)	241-246 (MLLRGA)	Q241_S246delinsMLLRGA	BB ₃₄₋₃₇
53	V247/V248/P249	S251	250 (K)	250 (D)	K250D	BB ₃₄₋₃₇
54	S251	F255	252-253 (NSV)	253-254 (ALP)	N252_V253delinsALP	BB ₃₄₋₃₇
55	F255	F257/Q258	256 (D)	256 (N)	D256N	BB ₃₄₋₃₇
56	F257/Q258	Y261	259-260 (KA)	259-260 (AA)	K259_A260delinsAA	BB ₃₄₋₃₇
57	Y261	L263	262 (K)	262 (G)	K262G	BB ₃₄₋₃₇
58	L263	A268	264-267 (TEEE)	264-267 (SDQL)	T264_E267delinsSDQL	BB ₃₄₋₃₇
59	A268	S272/D273/H274	269-271 (LDV)	269-271 (QAI)	L269_V271delinsQAI	BB ₃₄₋₃₇
60	S272/D273/H274	P276/V277/E278	275 (F)	275 (Y)	F275Y	BB ₃₄₋₃₇
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (PK)	279-280 (VM)	F279_K280delinsVM	BB ₃₄₋₃₇
62	L281	(GSSRAFTNSAK SVILPKTKSKRS)	282 (K)	282 (K)	Q282_S305delinsK	BB ₃₄₋₃₇

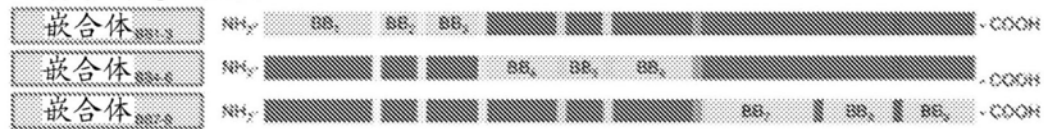
图31续

构建嵌段簇工程化

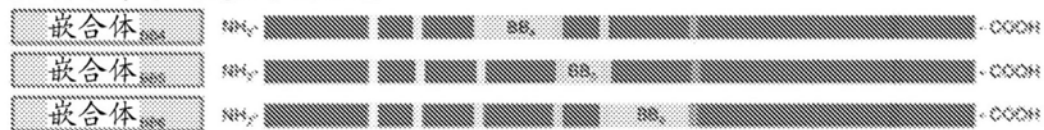
I. 同源酶的氨基酸序列比对



II. 转移构建嵌段簇



III. 转移单个构建嵌段 (任选)



IV. 转移单个氨基酸残基 (任选)

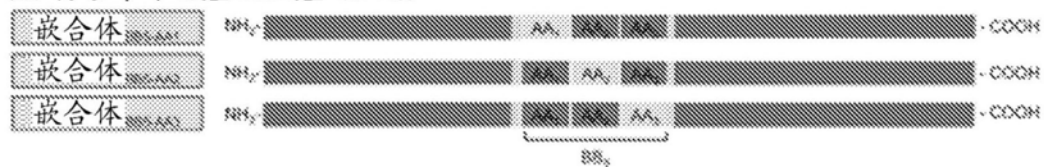


图32

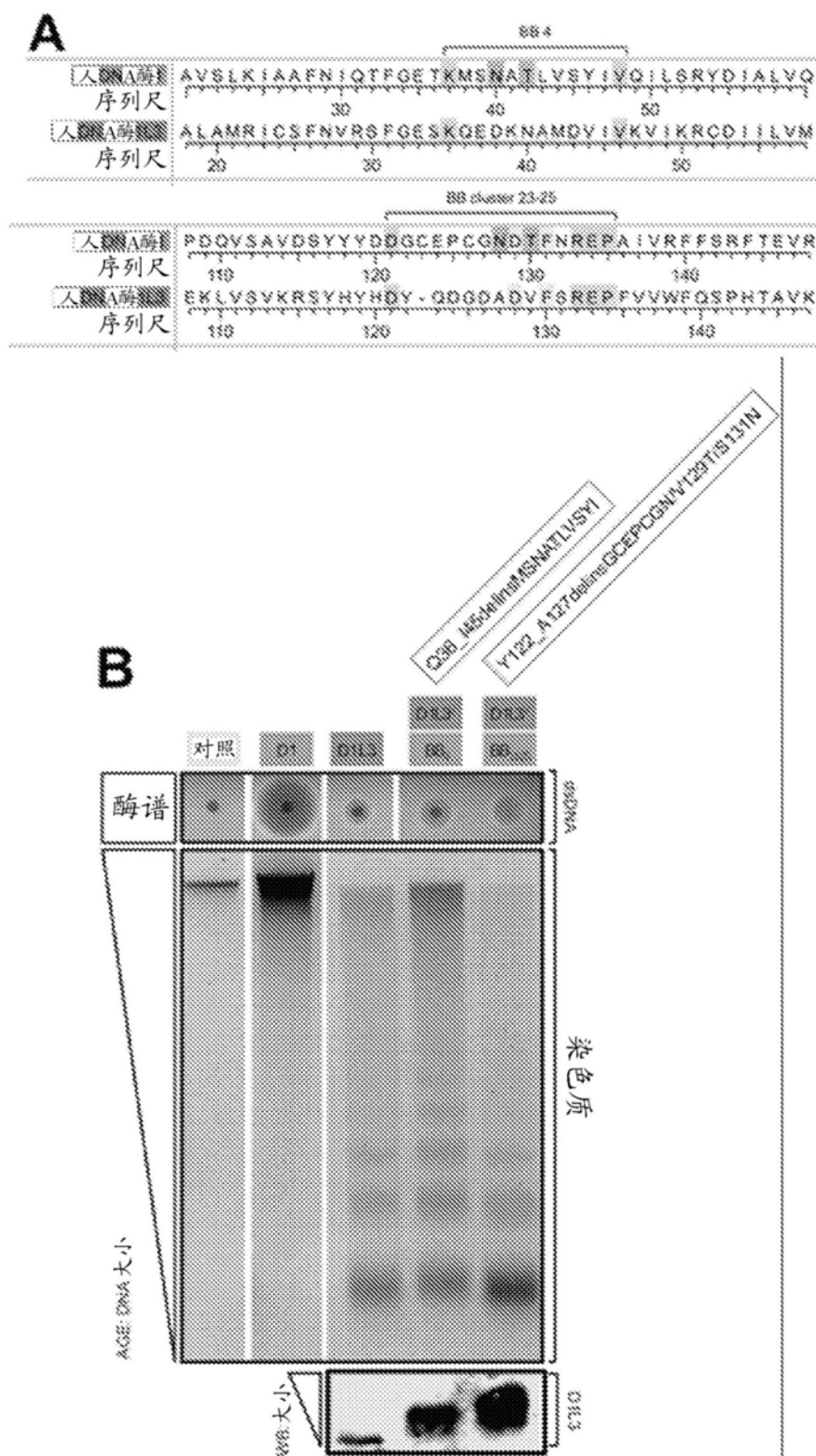


图35

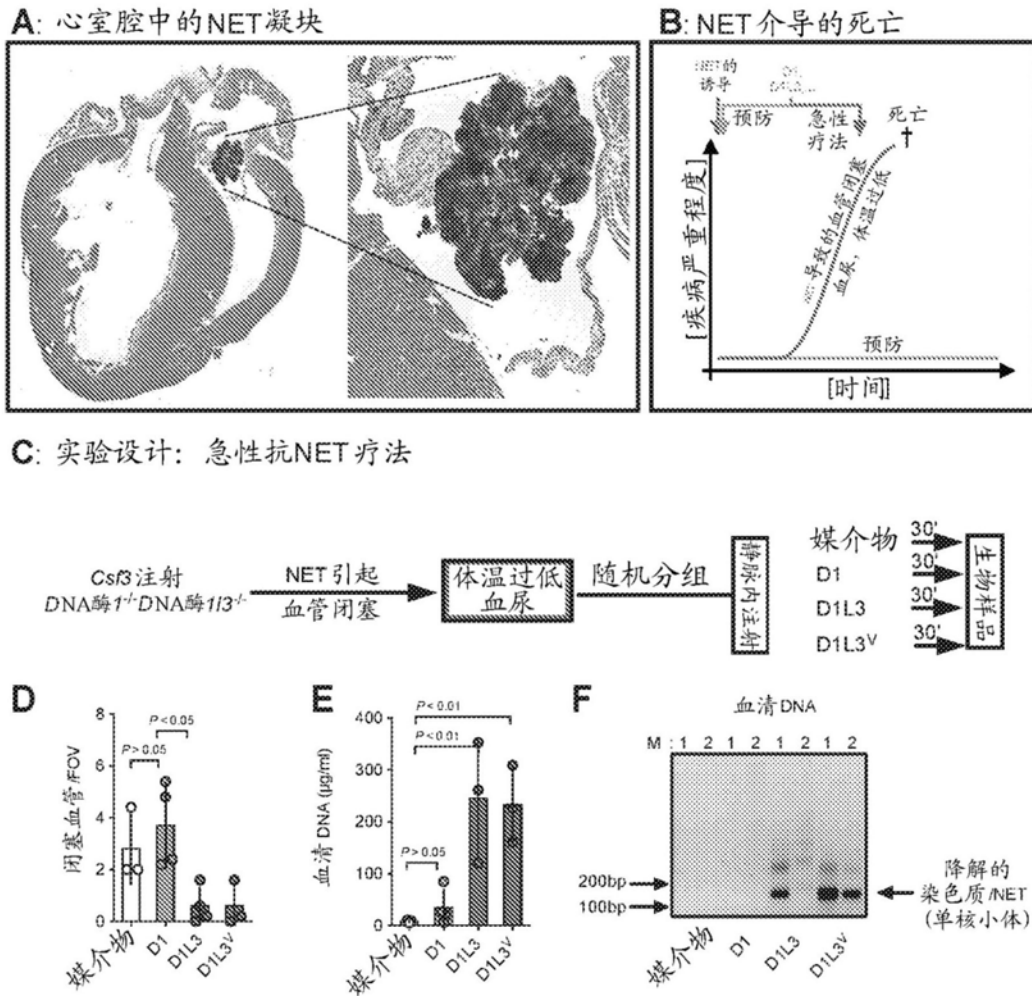


图36

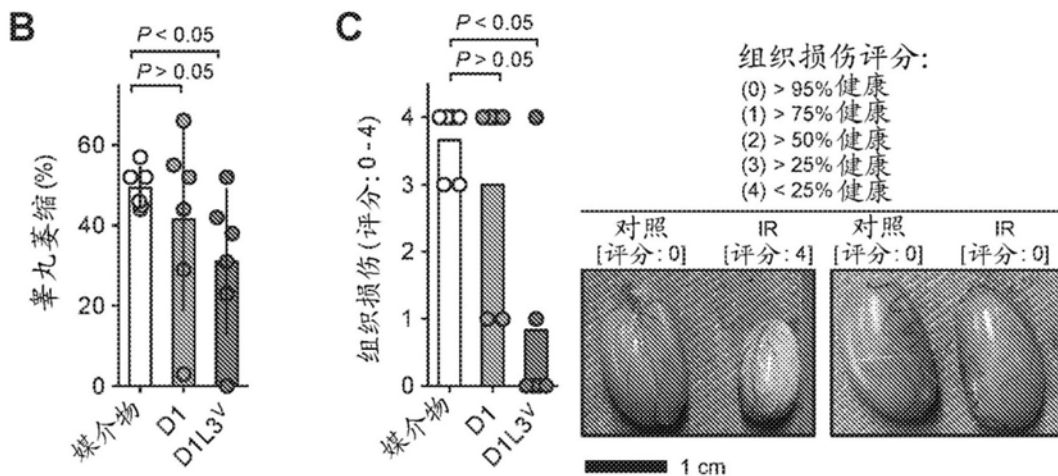
A: 实验设计: 缺血再灌注损伤疗法

图37

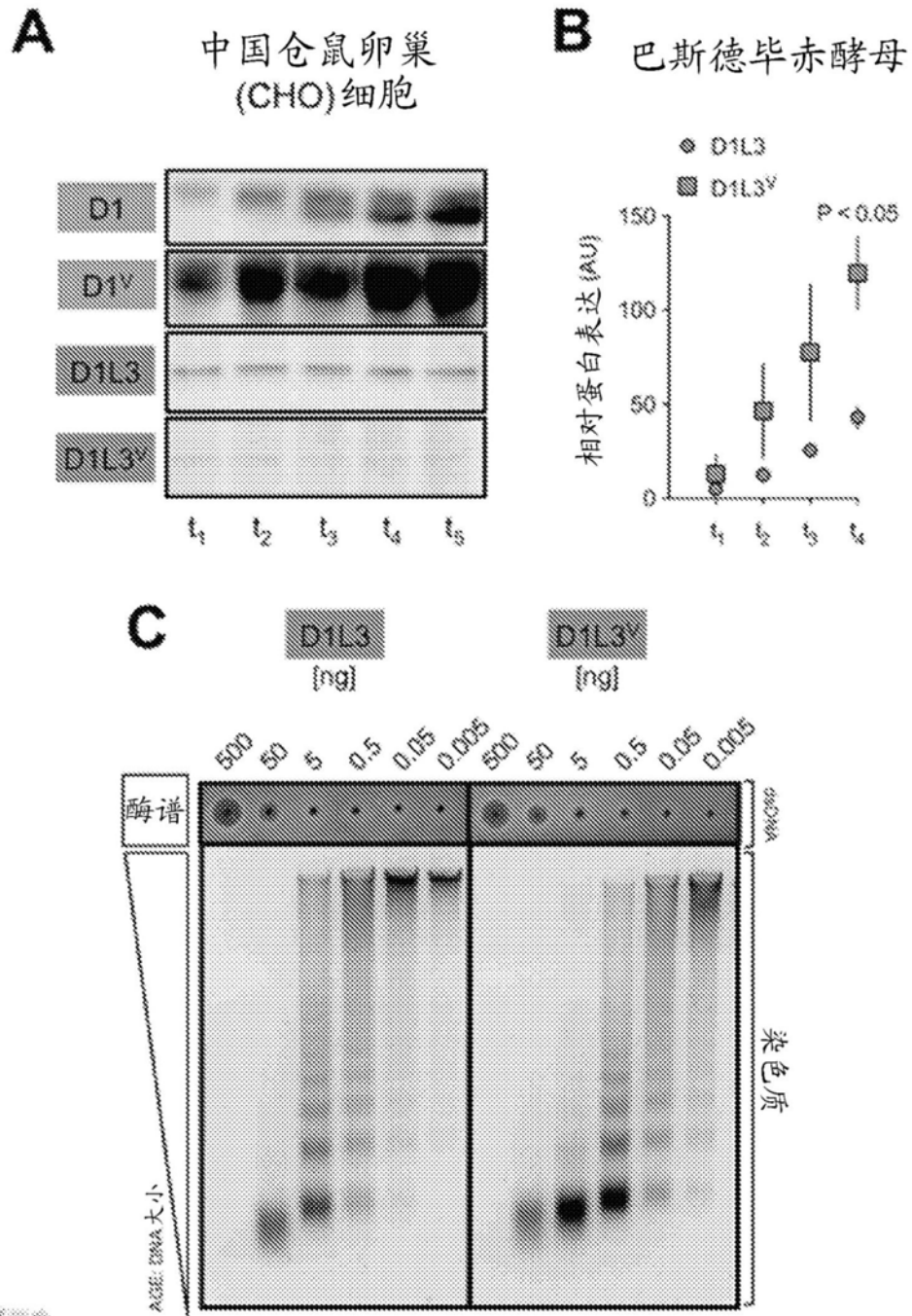


图38

SEQ ID NO	描述	突变 (无信号肽的成熟蛋白)	构建嵌段 工程化	亲本 SEQ ID NO
5	DNA酶1变体	Q31R/Q49K/Q79K/W209K (Q3R/Q37K/Q57K/W187K)	-	1
6	DNA酶1变体	Q31R/Q49K/Q79K/Q177K/W209K/G262K (Q3R/Q27K/Q57K/Q159K/W187K/Q240K)	-	1
7	DNA酶1变体	Q31R/A136F/T227K (Q3R/A114F/T205K)	-	1
9	DNA酶1变体	A136F/A164K (A114F/A142K)	-	1
10	DNA酶1变体	Q79_T84delinsRNSRRGHT (Q57_T62delinsRNSRRGHT)	+ {B8 ₁₁ }	1
11	DNA酶1变体	H86N/V88_V89delinsVVE91_P82delinsSR (H64N/V88_V67delinsVVE69_P70delinsSR)	+ {B8 ₁₀₋₁₂ }	1
12	DNA酶1变体	A136_H137delinsFV (A114_I115delinsFV)	+ {B8 ₁₀ }	1
13	DNA酶1变体	R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/T213R/Q215V/ P219G/S221_A222delinsQE (R177_Q160delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S180D/T181R/Q183V/ P197G/S199_A200delinsQE)	+ {B8 ₁₁₋₁₂ }	1
14	DNA酶1变体	A226_P228delinsVKKK (A204_P206delinsVKKK)	+ {B8 ₁₀ }	1
15	DNA酶1变体	Q79_T84delinsRNSRRGHT/H86N/V88_V89delinsVVE91_P82delinsSR/ A136_H137delinsFV/ R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/ T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE/A226_P228delinsVKKK (Q57_T62delinsRNSRRGHT/H64N/V88_V67delinsVVE69_P70delinsSR/ A114_I115delinsFV/R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S180D/ T191R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE/ A204_P206delinsVKKK)	+ {B8 ₁₁ , B8 ₁₂₋₁₄ , B8 ₁₀ , B8 ₁₁₋₁₂ , B8 ₁₀ }	1
17	DNA酶1L3变体	F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S385delinsK (F255Y/F259_K260delinsVM/Q262_S285delinsK)	+ {B8 ₁₀₋₁₂ }	2
19	DNA酶1L3变体	Q36_I45delinsMSNATLVSVI (Q16_I2delinsMSNATLVSVI)	+ {B8 ₁ }	2
20	DNA酶1L3变体	Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (Y102_A107delinsGCEPCGN/V109T/S111N)	+ {B8 ₁₀₋₁₂ }	2

图39