

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046216**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.16

(21) Номер заявки
202190940

(22) Дата подачи заявки
2019.10.08

(51) Int. Cl. **C12N 9/22** (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(54) РАЗРАБОТКА ДНКаз ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА И ТЕРАПИИ

(31) **62/742,682; 62/775,563; 62/779,104;
62/808,601; 62/846,904**

(32) **2018.10.08; 2018.12.05; 2018.12.13;
2019.02.21; 2019.05.13**

(33) **US**

(43) **2021.10.15**

(86) **PCT/US2019/055178**

(87) **WO 2020/076817 2020.04.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЬЮТРОЛИС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фукс Тобиас А., Хакким Р. Абдул (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-20040138156
US-B2-6656685**

JIMENEZ-ALCAZAR, M., et al. Host DNases Prevent Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps. Science. 1 December 2017, Vol. 358; Pages 1202-1206; <http://science.sciencemag.org/>; Page 1 of 5, Abstract; Page 4 of 5, Right Column, Second Paragraph

JIMENEZ-ALCAZAR, M., et al. Host DNases Prevent Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps. Science. 1 December 2017, Vol. 358; Pages 1202-1206; <http://science.sciencemag.org/>; Page 1 of 5, Abstract; Page 4 of 5, Right Column, Second Paragraph

**WO-A1-2018134419
WO-A2-2011053982**

(57) В изобретении предложены сконструированные внеклеточные белки ДНКазы человека (например, варианты ДНКазы 1 (D1), ДНКазы1-подобного белка 1 (D1L1), ДНКазы1-подобного белка 2 (D1L2), изоформы 1 ДНКазы1-подобного белка 3 (D1L3), изоформы 2 ДНКазы1-подобного белка 3 (D1L3-2), ДНКазы 2А (D2А) и ДНКазы 2В (D2В)), которые можно применять для лечения патологических состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением нейтрофильной внеклеточной ловушки (NET). В соответствии с изобретением вариант ДНКазы имеет преимущества для терапии и/или крупномасштабного производства.

B1

046216

**046216
B1**

Родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/742682, поданной 8 октября 2018 г.; 62/775563, поданной 5 декабря 2018 г.; 62/779104, поданной 13 декабря 2018 г.; 62808601, поданной 21 февраля 2019 г.; и 62/846904, поданной 13 мая 2019 г., содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Это изобретение относится к области разработки ферментов - ДНКаз.

Уровень техники

Воспаление представляет собой необходимый ответ хозяина для контроля проникающих микробов и заживления поврежденных тканей. Неконтролируемое и персистентное воспаление вызывает повреждение тканей при большом количестве воспалительных заболеваний. Нейтрофилы при остром воспалении являются доминирующими лейкоцитами. Во время инфекции, нейтрофилы генерируют нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET), решетки филаментов ДНК, декорированных токсичными гистонами и ферментами, которые иммобилизируют и нейтрализуют бактерии. Тем не менее высвобожденные по ошибке NET могут нанести вред клеткам-хозяевам в соответствии с их цитотоксической, противовоспалительной и протромботической активностью.

ДНКазы 1 (D1) образует вместе с ДНКазы 1-подобным белком 1 (D1L1), ДНКазы 1-подобным белком 2 (D1L2) и ДНКазы 1-подобным белком 3 (D1L3) семейство белков ДНКазы 1, группу гомологичных секретируемых ферментов ДНКаз. ДНКазы 2A и ДНКазы 2B образуют дополнительную группу гомологичных внеклеточных ферментов ДНКаз. Члены семейства белков ДНКазы 1 и ДНКазы 2 эволюционно консервативны и экспрессируются у различных видов, включая человека. Рекомбинантные члены семейства человеческих белков ДНКазы 1 и ДНКазы 2 являются кандидатами в лекарственные препараты для лечения заболеваний, связанных с NET. Хотя белок D1 был разработан для некоторых терапевтических применений у пациентов, условия для крупномасштабного производства других членов семейства белков ДНКазы 1 не описаны. Кроме того физические, ферментативные и фармакокинетические свойства этих ферментов являются не идеальными для клинических применений. Таким образом, существует потребность в определении процесса производства ферментов D1L1, D1L2 и D1L3, а также в разработке ДНКаз для использования в терапии, в том числе для деградации NET.

Сущность изобретения

В данном изобретении предложены сконструированные внеклеточные белки ДНКазы человека (например, варианты ДНКазы 1 (D1), ДНКазы 1-подобный белок 1 (D1L1), ДНКазы 1-подобный белок 2 (D1L2), изоформа 1 ДНКазы 1-подобного белка 3 (D1L3), изоформа 2 ДНКазы 1-подобного белка 3 (D1L3-2), ДНКазы 2A (D2A) и ДНКазы 2B (D2B)), которые можно использовать для лечения патологических состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением внеклеточной ДНК, внеклеточного хроматина и нейтрофильной внеклеточной ловушки (NET). В соответствии с аспектами изобретения варианты ДНКазы, описанные в данном документе, более пригодны для терапии и/или более подходят для крупномасштабного производства. В некоторых вариантах осуществления варианты ДНКазы, описанные в данном документе, имеют преимущества для медикаментозной терапии, включая системную терапию. Такие преимущества включают более медленное выведение лекарственного средства, например, увеличенный период полужизни в кровотоке (например, период полувыведения из сыворотки), увеличенную продолжительность фармакодинамической активности, высокую активность по деградации хроматина и устойчивость к действию протеаз.

В некоторых аспектах изобретения предложен вариант D1L3, где вариант D1L3 имеет один или более из следующих элементов: повышенная стабильность белка, более медленное выведение лекарственного средства и увеличенная продолжительность фармакодинамической активности, устойчивость к протеолитической деградации, более высокие уровни продукции в системах экспрессии *in vitro*, лучшая пригодность для очистки, но не существенно меньшая, такая же или лучшая активность по деградации хроматина и/или NET по сравнению с изоформой 1 D1L3 фермента дикого типа с SEQ ID NO:4 или изоформой 2 D1L3 фермента дикого типа с SEQ ID NO:5.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 представляет собой слитый белок, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична зрелому ферменту, определенному SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность альбумина на N-конце зрелого фермента и необязательно связывающую аминокислотную последовательность между аминокислотной последовательностью альбумина (домен альбумина) и аминокислотной последовательностью D1L3 (домен D1L3). В этих вариантах осуществления D1L3 демонстрирует более медленное выведение (например, улучшенный период полувыведения из кровообращения или период полувыведения из сыворотки) и увеличенную продолжительность фармакодинамической активности, в том числе для системной терапии. В некоторых вариантах осуществления слияние альбумина со связывающей последовательностью с доменом D1L3 существенно не влияет на активность фермента по деградации хроматина (например, измеренную с помощью анализа *in vitro*) по сравнению с ферментом без слияния с альбумином.

В этих вариантах осуществления домен D1L3 слитого белка имеет делецию всего или части

С-концевого основного домена, который присутствует в ферменте D1L3 дикого типа. Делеция или инактивация С-концевого основного домена существенно улучшает активность по деградации хроматина. То есть удаление С-концевого основного домена (BD) активирует фермент D1L3 дикого типа для деградации хроматина.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет одну или более замен структурными блоками из D1. Например, вариант D1L3 может иметь замену структурного блока Q282_S305delinsK, которая включает удаление С-концевого основного домена, который отсутствует в D1. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 101 SEQ ID NO: 4. Заменой может быть Arg на основе соответствующего структурного блока из D1 или в некоторых вариантах осуществления может быть Lys. Замены в этом положении могут усиливать активность варианта D1L3 по деградации хроматина.

Линкер, если он присутствует, может быть гибким линкером, жестким линкером или физиологически расщепляемым линкером, таким как линкер, расщепляемый протеазой. Например, линкером может быть гидрофильная аминокислотная последовательность, и он может быть сконструирован преимущественно из аминокислот, выбранных из Gly, Ala, Ser, Thr и Pro. В некоторых вариантах осуществления вариант представляет собой гибкий линкер, который состоит преимущественно из остатков глицина и серина (например, линкер $(G_yS)_n$, где y обозначает число от 1 до 5, а n - от 1 до 20). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой α -спиральный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере 15 аминокислот или по меньшей мере 25 аминокислот. В различных вариантах осуществления более длинные линкеры, содержащие по меньшей мере 15 аминокислот, могут обеспечивать улучшение продуктивности при экспрессии в системах экспрессии млекопитающих и не млекопитающих, таких как клетки CHO или *Pichia pastoris*. Кроме того, что неожиданно, более длинные линкерные последовательности показали улучшенную активность по деградации хроматина в анализе деградации хроматина *in vitro* по сравнению с более короткими линкерными последовательностями.

В различных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-30, в каждом случае необязательно имеющую от одной до двадцати аминокислотных модификаций, независимо выбранных из вставок, делеций или замен. Эти последовательности обеспечивают примеры слитых белков D1L3 (или варианты D1L3) с последовательностями альбумина, в том числе с различными конструкциями линкеров. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации находятся в домене D1L3, домене альбумина или обоих доменах. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30. В этих вариантах осуществления вариант D1L3 содержит от N-конца до С-конца: аминокислотную последовательность альбумина, средний или длинный гибкий линкер и аминокислотную последовательность D1L3 (т.е. включая варианты D1L3). SEQ ID NO: 28 дополнительно включает слияние альбумина на С-конце через длинный гибкий пептидный линкер.

В других вариантах осуществления линкер расщепляется протеазой, такой как протеаза системы коагуляции, например активированным фактором XII. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность фактора XI и/или прекалликреина. В других вариантах осуществления линкер содержит пептидную последовательность, которая расщепляется нейтрофильной специфической протеазой, такой как эластаза нейтрофилов, катепсин G или протеиназа 3.

В некоторых аспектах изобретения предложены варианты внеклеточных ДНКаз, сконструированные так, чтобы иметь преимущества при производстве, обеспечивая продуцирование рекомбинантного фермента, подходящего для применения в терапии. В различных вариантах осуществления изобретения предложены рекомбинантные варианты D1, D1L1, D1L2 и D1L3, содержащие одну или более аминокислотных замен по остаткам цистеина (или пегилирование остатков Cys), что приводит к снижению внутри- и межмолекулярного поперечного сшивания через дисульфидные мостики во время экспрессии белка.

В других аспектах изобретения предложены варианты внеклеточных ДНКаз, сконструированные так, чтобы иметь преимущества в устойчивости к действию протеаз, для улучшения воздействия *in vivo*, например, замедления элиминации, например, продление периода полужизни (например, периода полужизни в сыворотке) и увеличение продолжительности фармакодинамической активности, а также снижение протеолиза во время продуцирования рекомбинантных ферментов. В данном изобретении идентифицированы, например, остатки D1L3, которые чувствительны к протеолизу плазмином, тромбином и/или трипсином, а также остатки (например, парные основные аминокислоты), которые чувствительны к действию протеаз, продуцируемым линиями клеток млекопитающих и других. Сконструированная мутация этих остатков может обеспечить эти преимущества в устойчивости к действию протеаз.

В других аспектах изобретения предложен способ рекомбинантного продуцирования внеклеточных белков ДНКаз, включая их варианты, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в способе используется экспрессионная система, не относящаяся к млекопитающим, например эукариотическая экспрессионная система, не относящаяся к млекопитающим, такая как *Pichia pastoris*. В некоторых вариантах осуществления *Pichia pastoris* кодирует фермент ДНКазу своим нативным сигналь-

ным пептидом, обеспечивающим секрецию из клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная система экспрессии имеет делецию или инактивацию одной или более протеаз, которые расщепляют парные основные аминокислоты. Примеры ферментов включают фурин (экспрессируемый клетками СНО) и аспарагиновую протеиназу 3 (Ysp1) и кексин (Кех2), экспрессируемые *Pichia pastoris*. В некоторых вариантах осуществления эти ферменты не являются генетически удаленными или инактивированными, но их активность ингибируется ингибитором протеазы во время продуцирования рекомбинантного белка.

В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания клеток экспрессионной системы, не относящейся к млекопитающим, или экспрессионной системы млекопитающих, дополнена полианионами, такими как сульфат декстрана, гепарины, цитрат железа и ЭДТА. В дополнительных вариантах осуществления среда для выращивания *Pichia pastoris* или другой экспрессионной системы дополнена сульфатом декстрана, который имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 100 кДа. Например, полианион может быть добавлен к культуре в количестве, достаточном для образования комплекса с продуцируемым рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные внеклеточные белки ДНКазы и их варианты из культуральной среды системы экспрессии не млекопитающих или системы экспрессии млекопитающих очищают способом, который включает диссоциацию рекомбинантных внеклеточных белков и вариантов ДНКазы из полианионов, таких как сульфат декстрана, гепарины и ЭДТА.

В других аспектах изобретения предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие варианты D1, D1L1, D1L2 или D1L3, а также векторы и клетки-хозяева. Полинуклеотиды могут кодировать мРНК или ДНК. Клетки-хозяева могут быть клетками рекомбинантной системы экспрессии, включая бактериальные или эукариотические, независимо от того, относятся ли они к не млекопитающим, такие как *Pichia pastoris*, или млекопитающим, такие как клетки СНО. В других вариантах осуществления клетка-хозяин может быть доставлена для терапии ДНКазой. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложены клетки-хозяева, например клетки человека, например лейкоциты, модифицированные для секреции одного или более внеклеточных белков ДНКазы, описанных в данном документе, и предназначенные для введения в качестве лекарственного средства.

В изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие внеклеточный белок ДНКазы или его вариант, как описано в данном документе, или, необязательно, полинуклеотид или вектор, как описано, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения.

В других аспектах изобретения предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в деградации внеклеточной ДНК, деградации внеклеточного хроматина, деградации внеклеточной ловушки (ЕТ) и/или деградации внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET), путем введения терапевтически эффективного количества внеклеточной ДНКазы или ее варианта или композиции, описанной в данном документе.

Другие аспекты и варианты осуществления данного изобретения будут очевидны из следующего подробного описания.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показано, что мутации Q101R и Q282_S305delinsK в SEQ ID NO: 4 увеличивают активность ДНКазы1L3 по деградации высокомолекулярного хроматина. Клетки СНО временно трансфицировали с помощью ДНКазы1L3 или ДНКазы1L3 дикого типа с заменами структурных блоков. Супернатанты трансфицированных клеток инкубировали с очищенными ядрами (высокомолекулярный хроматин) или буфером. ДНК выделяли и анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. На фигуре показан агарозный гель, окрашенный красителем для выявления ДНК.

На фиг. 2 показана характеристика двух вариантов ДНКазы1L3. Различные концентрации супернатантов клеток СНО, трансфицированных ДНКазы1L3 или ДНКазы1L3 дикого типа с мутацией Q101R или Q282_S305delinsK, анализировали с помощью вестерн-блот анализа (WB) с использованием антител к ДНКазы1L3. Более широкая (вариант 1) и более тонкая (вариант 2) полосы были обнаружены в образцах с ДНКазы1L3 дикого типа и мутантом Q101R. В образцах с мутантом Q282_S305delinsK была обнаружена только более тонкая полоса (вариант 2). Параллельно анализировали активность по деградации хроматина при различных концентрациях супернатантов. На фигуре показана ДНК, проанализированная с помощью электрофореза в агарозном геле. Обе мутации, Q101R или Q282_S305delinsK, увеличивали активность по деградации хроматина по сравнению с ДНКазы1L3 дикого типа.

На фиг. 3 показано присутствие вариантов 1 и 2 ДНКазы1L3 в супернатантах клеток СНО, которые были стабильно трансфицированы с помощью ДНКазы1L3 дикого типа. Образцы анализировали с помощью вестерн-блот анализа (WB) с использованием антител к ДНКазы1L3. Более широкая (вариант 1) и более тонкая (вариант 2) полосы были обнаружены в 5 клонах.

На фиг. 4 показаны С-концевые аминокислотные последовательности рекомбинантно экспрессируемого D1L3 дикого типа в *Pichia pastoris* для идентификации часто встречающихся сайтов расщепления. Аминокислотное секвенирование очищенного D1L3 дикого типа выявило три мутанта с делецией

С-конца: K291_S305del, K292_S305del и S293_S305del. С-конец D1L3 дикого типа не был обнаружен. Параллельно анализировали активность по деградации хроматина при различных концентрациях очищенного белка и сравнивали с очищенным белком ДНКаз1 (D1) и ДНКаз1L3 с удаленным основным доменом (BDD-D1L3) с мутацией F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK. На фигуре показана ДНК, проанализированная с помощью электрофореза в агарозном геле.

На фиг. 5 показано, что добавление сульфата декстрана к среде выращивания СНО улучшает выход белка. Стабильные пулы клеток СНО, экспрессирующих D1L3 дикого типа, инкубировали в стандартной среде выращивания СНО или среде выращивания СНО с добавлением сульфата декстрана. Супернатант анализировали с помощью вестерн-блот анализа (WB) с использованием антител к ДНКаз1L3. На фигуре показано, что D1L3 плохо экспрессируется в клетках СНО с низким выходом белка. Добавление сульфата декстрана увеличивает выход, но не предотвращает фрагментацию продуктов.

На фиг. 6 показано использование поверхности анионного обмена и поверхности катионного обмена для аффинной очистки комплекса D1L3 с сульфатом декстрана.

На фиг. 7 перечислены стратегии мутации сайта расщепления трипсином для ограничения деградации D1L3.

На фиг. 8 показано сравнение аминокислотных последовательностей D1 человека (SEQ ID NO: 1) и D1L3 человека (SEQ ID NO: 4) с показанными плазмин-чувствительными остатками KR.

На фиг. 9 показаны стратегии мутации сайта расщепления плазмином для ограничения деградации D1L3.

На фиг. 10 показано, что D1L3 с мутированными сайтами расщепления плазмином сохраняет ферментативную активность. Супернатанты с клеток, которые были временно трансфицированы с помощью ДНКаз1L3, содержащие мутации в четырех предполагаемых сайтах расщепления плазмином (K180_A181delinsGL, P198_A201delinsRPSQ, K259A, R285A), инкубировали с очищенными ядрами (высокомолекулярный хроматин) или буфером. ДНК выделяли и анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. На фигуре показан агарозный гель, окрашенный красителем для выявления ДНК.

На фиг. 11 перечислены сайты расщепления плазмином, на основе их расщепления плазмином, и показаны стратегии мутации для ограничения деградации D1L3.

На фиг. 12А, В показано, что D1L3 имеет склонность к неправильной укладке при экспрессии в клетках СНО. На фиг. 12А показан простой вектор экспрессии для экспрессии D1L3 с использованием природного секреторного сигнального пептида. Супернатанты стабильных пулов анализировали с помощью вестерн-блот анализа с использованием антитела к ДНКаз1L3, и на фиг. 12В показано присутствие агрегатов с высокой молекулярной массой в невозстанавливающих условиях, которые разделяются в восстанавливающих условиях.

На фиг. 13 показано сравнение аминокислотных последовательностей D1 человека (SEQ ID NO: 1) и D1L3 человека (SEQ ID NO: 4) с показанными консервативными и неконсервативными остатками цистеина.

На фиг. 14 перечислены остатки цистеина в D1L3 и показаны стратегии мутаций для ограничения образования высокомолекулярных агрегатов во время экспрессии белка.

На фиг. 15 показано, что мутации С68А и С194А в D1L3 не влияют на активность по деградации хроматина. Мутации С24А и С52А подавляли активность по деградации хроматина. Супернатанты с клеток, которые были временно трансфицированы мутированными вариантами ДНКаз1L3, инкубировали с очищенными ядрами или буфером. ДНК выделяли и анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. На фигуре показан агарозный гель, окрашенный красителем для выявления ДНК.

На фиг. 16А показана экспрессия D1L3 в *Pichia pastoris* с использованием либо нативного секреторного сигнала, либо α -фактора спаривания из *Saccharomyces cerevisiae* (α MF). Секреторный сигнал α MF привел к гликозилированию и непроцессингу сигнального пептида (фиг. 16В).

На фиг. 17А показаны гибридная конструкция α MF, альбумина сыворотки человека (HSA), линкерной последовательности и D1L3. Гибридная конструкция не поддавалась гликозилированию в системе экспрессии *P. pastoris* (фиг. 17В) и сохраняет активность по деградации хроматина (фиг. 17С).

На фиг. 18 показано уровни экспрессии слитых конструкций альбумина сыворотки человека (HSA) с ДНКаз1L3 с удаленным основным доменом (BDD-D1L3) или ДНКаз1L3 дикого типа (D1L3) в *Pichia pastoris*. HSA сливается либо с N-, либо с С-концом BDD-D1L3 или D1L3. Две линкерные последовательности, L1 и L2, помещали между HSA и BDD-D1L3 или D1L3.

На фиг. 19 показано уровни экспрессии слитых конструкций альбумина сыворотки человека (HSA) с ДНКаз1L3 дикого типа (D1L3) в *Pichia pastoris*. HSA сливается с N-концом D1L3. Три разные линкерные последовательности (L2, L3, L4) помещали между HSA и D1L3.

На фиг. 20 показано уровни экспрессии и активность по деградации хроматина слитых конструкций альбумина сыворотки человека (HSA) с основным доменом DNASE1L3 (BDD-D1L3), продуцируемых в *Pichia pastoris*. HSA сливается с N-концом BDD-D1L3. Три разные линкерные последовательности (L5, L6, L7) помещали между HSA и D1L3.

На фиг. 21А показано, что мышей *Dnase1^{-/-}Dnase113^{-/-}*, инъецированных SED ID NO: 14 и SEQ ID NO: 19, проявлялась аналогичная активность по деградации хроматина в сыворотке.

На фиг. 21В показано, что период полувыведения SEQ ID NO: 19 в кровотоке у мышей, экспрессирующих человеческий рецептор FcRn, составляет 3,3 дня.

На фиг. 22 показано уровни экспрессии и активность по деградации хроматина слитых конструкций альбумина сыворотки человека (HSA) с основным доменом ДНКаз1L3 (BDD-D1L3), продуцируемых в *Pichia pastoris*. HSA сливается с N- и C-концом BDD-D1L3. Две разные линкерные последовательности (L7 и L8) помещали между HSA и BDD-D1L3.

На фиг. 23 показана гибридная конструкция HSA и линкер, расщепляемый фактором XIIa. Показаны последовательности линкера, содержащего последовательность человеческого фактора XI (SEQ ID NO: 42), и линкера, содержащего последовательность человеческого прекаллекреина (SEQ ID NO: 44).

На фиг. 24 показаны другие конструкции, в которых используются линкеры, расщепляемые фактором XIIa, для слитых белков с увеличенным периодом полувыведения, в том числе внеклеточных ДНКаз человека, факторов свертывания крови человека и факторов комплемента человека.

Описание изобретения

В данном изобретении предложены кандидаты для конструирования внеклеточных белков ДНКаз человека (например, варианты ДНКазы 1 (D1), ДНКаз1-подобный белок 1 (D1L1), ДНКаз1-подобный белок 2 (D1L2), изоформа 1 ДНКаз1-подобного белка 3 (D1L3), изоформа 2 ДНКаз1-подобного белка 3 (D1L3-2), ДНКаз2A (D2A) и ДНКаз2B (D2B)), которые можно использовать для лечения патологических состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением внеклеточной ДНК, внеклеточного хроматина и нейтрофильной внеклеточной ловушки (NET). В соответствии с аспектами изобретения варианты ДНКазы, описанные в данном документе, более пригодные/или эффективны для терапии и/или более подходят для крупномасштабного производства. В некоторых вариантах осуществления варианты ДНКазы, описанные в данном документе, имеют преимущества для системной терапии. Такие преимущества включают более длительное воздействие (например, более медленное выведение, более длительный период полувыведения из кровообращения), увеличенную продолжительность фармакодинамического действия, улучшенную активность по деградации хроматина и устойчивость к действию протеаз.

Определения

Использование в данном описании и в формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на единственное и множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, обозначение "агент" включает как один агент, так и множество таких агентов.

Термин "хроматиназа" относится к классу ферментов дезоксирибонуклеаз, которые проявляют более чем незначительную способность разрезать, расщеплять или перерабатывать хроматин, т.е. ДНК, связанную с одним или более гистоновыми белками. ДНКаз1L3 человека представляет собой хроматиназу. Обычно различные варианты белка ДНКаз1L3, описанные в данном документе, представляют собой хроматиназы. Не все ферменты ДНКазы являются хроматиназами. Например, ДНКаз1 человека практически не имеет способности разрезать, расщеплять или перерабатывать хроматин и не является хроматиназой.

Используемый в данном документе термин "время полужизни" в отношении лекарственного средства относится к периоду полувыведения концентрации лекарственного средства у животного, измеренной в представляющей интерес матрице, например, в сыворотке или плазме. Специалисту в данной области техники понятно, что не все лекарственные средства демонстрируют кинетику первого порядка или проявляют ее на всех этапах выведения. В таких случаях специалисту в данной области техники понятно, что термины "продление периода полувыведения" или "увеличенный период полувыведения" являются выражениями, которые относятся к более медленной скорости выведения.

"Выделенный" означает измененное или удаленное из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются "выделенными", однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать по существу в очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

В контексте данного описания термин "внеклеточная ловушка нейтрофилов" и аббревиатура "NET" относятся к сети внеклеточных волокон, содержащих ядерное содержимое, например ДНК, связанную с гистоновыми белками, которые выделяются из иммунной клетки, обычно нейтрофила, запрограммированным образом.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность или нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность", включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК", также может включать в себя интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать интрон(ы).

Термины "примерно" и "приблизительно" включают количество, которое составляет $\pm 10\%$ от соот-

ветствующего числового значения.

Термин "внеклеточная ДНКазы" относится к внеклеточным белкам ДНКазам семейства ДНКазы 1 и ДНКазы 2 (например, ДНКазы 1 (D1), ДНКазы1-подобный белок 1 (D1L1), ДНКазы1-подобный белок 2 (D1L2), изоформа 1 ДНКазы1-подобного белка 3 (D1L3), изоформа 2 ДНКазы1-подобного белка 3 (D1L3-2), ДНКазы 2А (D2А) и ДНКазы 2В (D2В)).

В некоторых аспектах и вариантах осуществления внеклеточная ДНКазы или ее вариант являются гибридными, необязательно посредством вставленного линкера, с фрагментом, увеличивающим периодом полувыведения, таким как альбумин, трансферрин, Fc или эластиноподобный белок, или его вариант. См., например, патент США № 9458218, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная ДНКазы или ее вариант димеризуется шарнирной областью иммуноглобулина. Например, сконструированные ферменты, описанные в данном документе, могут также включать слияние с Fc-доменом (например, шарнирным доменом и доменами CH2 и доменами CH3 иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления ДНКазы (например, вариант D1L3) слита с аминокислотной последовательностью или доменом альбумина, например с альбумином человека или его фрагментом или вариантом. См., например, WO 2015/066550 и патент США № 9221896, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Альбумин может быть присоединен к ДНКазе, необязательно с помощью вставленного линкера, на N-конце и/или C-конце сконструированной внеклеточной ДНКазы или ее варианта. Типичная аминокислотная последовательность альбумина представлена в виде SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления D1L3 и D1 или варианты, описанные в данном документе, вместе димеризуются шарнирной Fc-областью, создавая димерную молекулу с синергетическими функциональными свойствами для деградации NET. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная ДНКазы или ее вариант слит на N-конце с аминокислотной последовательностью альбумина через пептидный линкер. Пептидный линкер может быть гибким линкером, жестким линкером или в некоторых вариантах осуществления физиологически расщепляемым линкером (например, линкером, расщепляемым протеазой). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину от 5 до 100 аминокислот или от 5 до 50 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер представляет собой органическую молекулу, группу, полимер (например, ПЭГ) или химический фрагмент, который ковалентно связан с внеклеточной ДНКазой и фрагментом, увеличивающим период полувыведения (например, альбумином).

В некоторых аспектах изобретение относится к варианту D1L3, где вариант D1L3 имеет один или более из следующих элементов: повышенная стабильность белка, более медленное выведение лекарственного средства и увеличенная продолжительность фармакодинамической активности, устойчивость к протеолитической деградации, более высокие уровни продукции в системах экспрессии *in vitro*, лучшая пригодность для очистки, но не существенно меньшая, такая же или лучшая активность по деградации хроматина и/или NET по сравнению с изоформой 1 D1L3 фермента дикого типа с SEQ ID NO:4 или изоформой 2 D1L3 фермента дикого типа с SEQ ID NO:5. В контексте данного описания, если не указано иное, термин D1L3 включает как изоформу 1, так и изоформу 2.

Активность фермента по деградации ДНК, и/или хроматина, и/или NET, например, варианта D1L3 можно измерить *in vitro*, например, путем инкубации фермента с ДНК, хроматином или NET, полученными, например, из очищенных ядер, ДНК или крови *ex vivo* или нейтрофилов, индуцированных к образованию NET. В качестве альтернативы активность фермента по деградации ДНК, и/или хроматина, и/или NET, например, варианта D1L3 может быть измерена *in vivo*, например, введением фермента субъекту, при этом субъект продуцирует внеклеточную ДНК, хроматин или NET или индуцирует их продуцирование и измерения влияния фермента на концентрации ДНК, хроматина или уровней NET в матрице, например в сыворотке, предпочтительно с параллельным отрицательным контролем, или путем временного сравнения концентраций до и после введения фермента.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет примерно такую же активность по деградации хроматина и/или NET по сравнению с изоформой 1 фермента D1L3 дикого типа с SEQ ID NO: 4 или изоформой 2 фермента D1L3 дикого типа с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 обладает более высокой активностью по деградации хроматина и/или NET по сравнению с изоформой 1 фермента D1L3 дикого типа с SEQ ID NO: 4 или изоформой 2 фермента D1L3 дикого типа с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 представляет собой слитый белок, содержащий домен альбумина, необязательный линкер и домен D1L3. В некоторых вариантах осуществления домен альбумина и необязательный линкер расположены на N-концевой стороне домена D1L3. В некоторых вариантах осуществления домен альбумина и необязательный линкер расположены на C-концевой стороне домена D1L3. Во всех таких вариантах осуществления необязательный линкер расположен между доменом альбумина и доменом D1L3.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность или домен слитого белка альбумина по меньшей мере примерно на 75%, или по меньшей мере примерно на 80%, или по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична эталонной последовательности

альбумина, определенной SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность или домен альбумина содержит или состоит из эталонной последовательности альбумина, определенной SEQ ID NO: 39. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность альбумина связывается с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), например FcRn человека. Аминокислотная последовательность альбумина может быть вариантом HSA дикого типа (например, представленным SEQ ID NO: 39). В различных вариантах осуществления варианты альбумина могут иметь от одной до двадцати или от одной до десяти аминокислотных модификаций, независимо выбранных из делеций, замен и вставок по отношению к SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность альбумина представляет собой любую аминокислотную последовательность альбумина млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность или домен альбумина представляет собой фрагмент полноразмерного альбумина, представленного SEQ ID NO: 39. Термин "фрагмент", при применении в контексте альбумина, относится к любому фрагменту полноразмерного альбумина или его варианту (как описано выше), который продлевает время полужизни фермента ДНКазы, с которым он слит или конъюгирован, относительно соответствующей неслитой ДНКазы. В некоторых вариантах осуществления фрагмент альбумина может относиться к аминокислотной последовательности, содержащей слияние нескольких доменов альбумина (см., например, WO 2011/124718), таких как домены I и III, а также домены II и III. Обычно фрагмент альбумина содержит по меньшей мере примерно 100 аминокислот или по меньшей мере примерно 200 или по меньшей мере примерно 300 аминокислот полноразмерной последовательности. В различных вариантах осуществления фрагмент альбумина сохраняет способность связывать FcRn человека.

В некоторых вариантах осуществления D1L3-подобный домен слитого белка по меньшей мере примерно на 85%, или по меньшей мере примерно на 90%, или по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 97%, или по меньшей мере примерно на 98%, или по меньшей мере примерно на 99% идентичен эталонной последовательности зрелого фермента D1L3, определенной SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления домен D1L3 содержит или состоит из эталонной последовательности, определенной SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность не содержит С-концевой основной домен SEQ ID NO: 4 или 5, определяемый С-концевыми 23 аминокислотами.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит домен D1L3, где аминокислотная последовательность домена D1L3 по меньшей мере примерно на 80% идентична зрелому ферменту, определенному SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Слитый белок может дополнительно содержать аминокислотную последовательность или домен альбумина на N-конце зрелого фермента и связывающую аминокислотную последовательность между аминокислотной последовательностью альбумина и аминокислотной последовательностью зрелого фермента. В некоторых вариантах осуществления домен D1L3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 90% идентична эталонной последовательности зрелого фермента, определенной SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность не содержит С-концевой основной домен SEQ ID NO: 4 или 5, определяемый С-концевыми 23 аминокислотами. Слитый белок, содержащий домен D1L3, демонстрирует улучшенное время полужизни в кровотоке и продолжительность фармакодинамического эффекта, в том числе для системной терапии. Кроме того, слияние альбумина со связывающей последовательностью не оказывает существенного влияния (или в некоторых вариантах осуществления не оказывает какого-либо отрицательного воздействия) на активность по деградации хроматина, как определено с помощью анализа деградации хроматина *in vitro*, по сравнению с вариантом без слияния с альбумином.

Подразумевается, что идентичность последовательностей с ферментами ДНКазы дикого типа, и если не указано иное, относится к зрелым ферментам, лишенным сигнального пептида. Кроме того, если не указано иное, для ясности положения аминокислот пронумерованы относительно полностью транслируемой последовательности ДНКазы, включая сигнальный пептид. Соответственно, например, ссылка на идентичность последовательности фермента SEQ ID NO: 4 (D1L3 человека, изоформа 1) относится к процентной идентичности со зрелым ферментом, имеющим M21 на N-конце. Точно так же ссылка на идентичность последовательности фермента SEQ ID NO: 1 (D1 человека) относится к процентной идентичности со зрелым ферментом, имеющим L23 на N-конце.

В некоторых вариантах осуществления D1L3 имеет делецию всего или части С-концевого основного домена. С-концевой основной домен определяется как С-концевые 23 аминокислоты SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Делеция или инактивация С-концевого основного домена D1L3 существенно улучшает активность по деградации хроматина. См. фиг. 1, 2 и 4. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет делецию С-концевых аминокислот основного домена, например по меньшей мере 5 аминокислот, или в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10 аминокислот, или в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20 аминокислот С-концевого основного домена. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет делецию всего С-концевого основного домена, определяемого 23 С-концевыми

аминокислотами SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Примеры делеций BD включают Q282_S305delinsK (см. SEQ ID NO: 9), S305delinsK (см. SEQ ID NO: 10), K292_S305del (см. SEQ ID NO: 11) и S293_S305del (см. SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления С-конец домена D1L3 (имеющий делецию BD) содержит от 1 до 10 или от 1 до 5 аминокислот на С-конце, которые не совпадают с С-концом BD и не влияют отрицательно на активность по деградации хроматина в анализе *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 представляет собой сконструированный слитый белок, содержащий: домен ДНКАзи1L3 последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8 - SEQ ID NO: 16; линкер последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 31 - SEQ ID NO: 38; и домен альбумина, имеющий последовательность SEQ ID NO: 39 или варианты или фрагмент, как описано. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет одну или более замен структурными блоками D1, которые описаны в PCT/US2018/04708, который включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления последовательность или домен D1L3 содержит замену структурным блоком D1, которая может быть выбрана из одного или нескольких из: M21_R22delinsLK, C24_S25delinsAA, V28_S30delinsIQT, S34T, Q36_V44delinsMSNATLVSY, K47_K50delinsQILS, C52Y, I55_M58delinsIALVQE, I60_K61delinsVR, N64_I70delinsHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_I83delinsQDAPD, N86H, I89V, S91_R92delinsEP, T97S, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_R115delinsAVD, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, F135_V136delinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsEVRE, V150A, I152V, 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, K259A, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM, Q282_S205delinsK, где каждая из вышеуказанных замен пронумерована в соответствии с SEQ ID NO: 4.

Например, вариант D1L3 может иметь замену структурным блоком D1 Q282_S305delinsK, которая включает удаление С-концевого основного домена, который отсутствует в D1. В некоторых вариантах осуществления фермент D1L3 имеет аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 101 SEQ ID NO: 4. Замена может быть Arg на основе соответствующего структурного блока из D1 или в некоторых вариантах осуществления может быть Lys. Замены в этом положении могут усиливать активность D1L3 по деградации хроматина. Другие замены в этой позиции, вероятно, будут иметь аналогичные свойства.

Линкеры, если они присутствуют, могут быть выбраны из гибких, жестких и расщепляемых пептидных линкеров. Гибкие линкеры преимущественно или полностью состоят из остатков небольших, неполярных или полярных аминокислот, таких как Gly, Ser и Thr. Типичный гибкий линкер содержит $(Gly,Ser)_n$ линкеры, где n обозначает число от 1 до 10 (например, от 1 до 5) и n обозначает число от 1 до примерно 10, а в некоторых вариантах осуществления обозначает число от 3 до примерно 6. В примерных вариантах осуществления обозначает число от 2 до 4, а n обозначает число от 3 до 8. Из-за своей гибкости эти линкеры неструктурированы. Более жесткие линкеры включают мотивы полипролина или поли Pro-Ala и α -спиральные линкеры. Типичным примером α -спирального линкера является $A(EAAAK)_nA$, где n имеет значения, указанные выше (например, от 1 до 10 или от 2 до 6). Обычно линкеры могут состоять преимущественно из аминокислот, выбранных из Gly, Ser, Thr, Ala и Pro. Типичные линкерные последовательности содержат по меньшей мере 10 аминокислот и могут находиться в диапазоне от 15 до 35 аминокислот. Типичные конструкции линкеров представлены как SEQ ID NO: 31-38.

В некоторых вариантах осуществления вариант содержит линкер, где аминокислотная последовательность линкера состоит преимущественно из остатков глицина и серина или состоит в основном из остатков глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления соотношение Ser и Gly в линкере составляет, соответственно, от примерно 1:1 до примерно 1:10, от примерно 1:2 до примерно 1:6 или примерно 1:4. Типичные линкерные последовательности содержат $S(GGS)_4GSS$ (SEQ ID NO: 36), $S(GGS)_9GS$ (SEQ ID NO: 37), $(GGS)_9GS$ (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере 10 аминокислот, или по меньшей мере 15 аминокислот, или по меньшей мере 20 аминокислот, или по меньшей мере 25 аминокислот. Например, линкер может иметь длину от 15 до 30 аминокислот. В различных вариантах осуществления более длинные линкеры, содержащие по меньшей мере 15 аминокислот, могут обеспечивать улучшение продуктивности при экспрессии в *Pichia pastoris*. См. фиг. 20. Кроме того, что неожиданно, более длинные линкерные последовательности показали улучшенную активность по деградации хроматина по сравнению с более короткими линкерными последовательностями. См. фиг. 20.

В различных вариантах осуществления вариант D1L3 представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-30. В других вариантах осуществления вариант D1L3 представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-30 и имеющий от одной до двадцати, или от одной до десяти, или от одной до пяти аминокислотных модификаций, независимо выбранных из аминокислотных вставок, делеций или замен относительно эталонной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17-30. В некоторых вари-

антах осуществления аминокислотные модификации находятся в домене D1L3, домене альбумина или в обоих доменах слитого белка. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30. В этих вариантах осуществления аминокислотная последовательность альбумина слита с N-концом или N-концевой стороной D1L3 (или варианта) через средний или длинный гибкий линкер.

В других вариантах осуществления линкер представляет собой физиологически расщепляемый линкер, такой как линкер, расщепляемый протеазой. Например, протеаза может быть протеазой системы коагуляции, такой как активированный фактор XII. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность фактора XI (SEQ ID NO:42) и/или прекалликреина (SEQ ID NO:44 или 45) или его физиологически расщепляемый фрагмент. В выбранных вариантах осуществления линкерная аминокислотная последовательность из фактора XI содержит всю или части SEQ ID NO: 42 (например, части SEQ ID NO: 42, включая модификации SEQ ID NO: 42, которые допускают расщепление фактором XIIa). В некоторых вариантах осуществления линкерная аминокислотная последовательность из прекалликреина содержит всю или части SEQ ID NO: 44 (например, части SEQ ID NO: 44, включая модификации SEQ ID NO: 44, которые допускают расщепление фактором XIIa). В других вариантах осуществления линкер содержит пептидную последовательность, которая расщепляется нейтрофильной специфической протеазой, такой как эластаза нейтрофилов, катепсин G и протеиназа 3.

Некоторые примерные варианты осуществления слитых белков D1L3 содержат комбинацию трех аминокислотных последовательностей, которые могут быть независимо выбраны из последовательностей, раскрытых в данном документе, и такие последовательности, расположенные в порядке от N-конца до C-конца:

- Слияние 1: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 2: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 3: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 4: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 5: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 6: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 7: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 8: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 9: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 10: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 11: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 12: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 13: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 14: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 15: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 16: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 17: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 18: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 19: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 20: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 21: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 22: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 23: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 24: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 25: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 26: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 27: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 28: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 29: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 30: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 31: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 32: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 33: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 34: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 35: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 36: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 37: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 38: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;
- Слияние 39: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39;

Слияние 102: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 103: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 104: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 105: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 106: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 107: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 108: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 109: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 110: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 39;
Слияние 111: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 112: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 113: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 114: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 115: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 116: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 117: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 118: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 119: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 120: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 121: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 39;
Слияние 122: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 123: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 124: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 125: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 126: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 127: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 128: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 129: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 130: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 131: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;
Слияние 132: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 39;

В некоторых вариантах осуществления слитый белок синтезируется с сигнальным пептидом. Сигнальный пептид может быть удален во время секреции из клетки-хозяина. Типичные сигнальные пептиды показаны в SEQ ID NO: 4-16 и SEQ ID NO: 44-46. В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой зрелый белок, т.е. без сигнального пептида.

В различных вариантах осуществления слитый белок выбран из слитых белков от 1 до 132, и выбранный слитый белок может необязательно иметь до 20 (или до 10) аминокислотных модификаций, независимо выбранных из аминокислотных делеций, вставок и замен.

В некоторых аспектах изобретения предложены варианты внеклеточных ферментов ДНКазы, сконструированные так, чтобы иметь преимущества при производстве, обеспечивая производство рекомбинантного фермента, подходящего для использования в терапии и который необязательно может быть использован в связи с вариантами осуществления слитого белка (включая варианты осуществления слияния с альбумином), как уже было описано. В различных вариантах осуществления изобретения предложены рекомбинантные варианты D1, D1L1, D1L2 и D1L3, содержащие одну или более аминокислотных замен или делеций по остаткам цистеина, что приводит к снижению внутри- и межмолекулярного поперечного сшивания через дисульфидные мостики во время экспрессии белка. Например, вариант ДНКазы может не иметь одного, двух или трех остатков цистеина, присутствующих в последовательности дикого типа (например, один, два или три остатка цистеина удалены), или может содержать один или более таких цистеиновых остатков, замещенных другой аминокислотой(ами). В некоторых вариантах осуществления один или более остатков цистеина заменены аминокислотой, независимо выбранной из Ala, Gly и Ser, или один или более остатков цистеина заменены как часть замены структурного блока. В некоторых вариантах осуществления один или более замещенных остатков цистеина являются не консервативными между другими членами семейства белков D1 (например, D1, D1L1, D1L2 и D1L3). В некоторых вариантах осуществления сконструированный фермент содержит или дополнительно содержит по меньшей мере одну замену структурного блока из другого члена семейства белков D1 и/или другую точечную мутацию, которая повышает стабильность белка, устойчивость к расщеплению протеазами, биодоступность и, по существу, такая же или лучшая активность по деградации ДНК и/или хроматина и/или NET (in vitro или in vivo) по сравнению с ферментом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления замены и/или модификации включают, среди других модификаций, только единственную модификацию остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления удаления одного остатка цистеина достаточно для получения значительных преимуществ при производстве.

В других аспектах изобретения предложены варианты внеклеточных ДНКаз сконструированные

так, чтобы иметь преимущества в устойчивости к протеазам, для улучшения периода полувыведения *in vivo*, а также для снижения протеолиза во время продуцирования рекомбинантного фермента. В данном изобретении идентифицировано, например, остатки D1L3, которые чувствительны к протеолизу плазмином, тромбином и/или трипсином, а также остатки (например, парные основные аминокислоты), которые чувствительны к действию протеаз, продуцируемых линиями клеток млекопитающих и других.

Описанные в данном документе рекомбинантные внеклеточные варианты ДНКазы могут иметь комбинацию точечных мутаций, включая замены по остаткам цистеина, замены по остаткам, чувствительных к протеазе, и/или могут содержать одну или более замен на основании блоков. Конструирование структурных блоков белков (ВВРЕ) описано в РСТ/US18/47084 и US 62/800790, описания которых включены в данный документ посредством ссылки. ВВРЕ включает обеспечение выравнивания белок-белок донорных и реципиентных внеклеточных ферментов ДНКазы и идентификацию варьируемых аминокислотных последовательностей для переноса ("структурный блок"). Варируемую аминокислоту(ы) фланкируют одной или более консервативными аминокислотами в донорных и реципиентных ферментах внеклеточных ДНКаз (против хода транскрипции и по ходу транскрипции структурного блока). Эти структурные блоки можно менять местами между реципиентным и донорским белками для получения химерного фермента.

В других аспектах изобретения предложен способ рекомбинантного продуцирования внеклеточных белков ДНКаз, включая их варианты, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в способе используется экспрессионная система, не относящаяся к млекопитающим, такая как *Pichia pastoris*. В отдельных вариантах осуществления *Pichia pastoris* кодирует фермент ДНКазу с нативным сигнальным пептидом, делая возможной секрецию из клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как клетки яичника китайского хомячка (СНО). В некоторых вариантах осуществления изобретения, удаляя остатки цистеина, ненужные для активности, изобретение позволяет избежать межмолекулярных и внутримолекулярных дисульфидных связей, которые в противном случае образуются и препятствуют рекомбинантному продуцированию. В некоторых вариантах осуществления значительное уменьшение ошибочных межмолекулярных и внутримолекулярных дисульфидных связей может быть достигнуто за счет замены одного остатка цистеина.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная система экспрессии имеет делецию или инактивацию одной или более протеаз, которые расщепляют парные основные аминокислоты. Примеры ферментов включают фурин (экспрессируемый клетками СНО) и аспарагиновую протеиназу 3 (*Ysp1*) и кексин (*Kex2*), экспрессируемые *Pichia pastoris*. В некоторых вариантах осуществления эти ферменты не являются генетически удаленными или инактивированными, но их активность ингибируется ингибитором протеазы во время продуцирования рекомбинантного белка.

В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания клеток экспрессионной системы, не относящейся к млекопитающим, или экспрессионной системы млекопитающих, дополнена полианионами, такими как сульфат декстрана, гепарины, цитрат железа и ЭДТА. В дополнительных вариантах осуществления среда для выращивания *Pichia pastoris* или другой экспрессионной системы дополнена сульфатом декстрана, который имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 100 кДа. В некоторых вариантах осуществления сульфат декстрана имеет среднюю молекулярную массу, которая составляет примерно 10 кДа или меньше, или примерно 20 кДа или меньше, или примерно 30 кДа или меньше, или примерно 40 кДа или меньше, или примерно 50 кДа или меньше, или примерно 75 кДа или меньше, или примерно 100 кДа или меньше. В различных вариантах осуществления полианион добавляют к культуре в количестве, достаточном для образования комплекса с продуцируемым рекомбинантным белком.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные внеклеточные белки ДНКазы и их варианты из культуральной среды системы экспрессии не млекопитающих или системы экспрессии млекопитающих очищают способом, который включает диссоциацию рекомбинантных внеклеточных белков и вариантов ДНКазы из полианионов, таких как сульфат декстрана, гепарины, ЭДТА. В некоторых вариантах осуществления способ очистки включает сильные анионообменные смолы, такие как триэтиламиноэтил. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный белок ДНКазы, продуцируемый в соответствии со способом, представляет собой D1L3 или его вариант.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен вариант D1L3, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ферменту, определенному SEQ ID NO: 4 (D1L3 человека, изоформа 1) или SEQ ID NO: 5 (D1L3 человека, изоформа 2), и имеющий одну или более замен остатков цистеина и/или одну или более замен аминокислот, которые чувствительны к протеолизу, например протеолизу *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления вариант белка D1L3 содержит одну или более дополнительных модификаций, которые приводят к повышенной стабильности белка (например, устойчивости к протеазам), более высоким уровням продукции в системах экспрессии *in vitro* и/или не существенно меньшей, такой же или лучшей активности по деградации ДНК и/или хроматина и/или NET по сравнению с белком D1L3 дикого типа с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Например, вариант D1L3 может содержать по меньшей мере одну дополнительную замену структурного блока или точечную мутацию, описанную в РСТ/US2018/47084 (которая

полностью включена в данное описание посредством ссылки), или может содержать одну или более замен, описанных в данном документе, для повышения устойчивости к действию протеаз.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет замену Cys 68, которая необязательно замещена аминокислотой, выбранной из Ala, Ser и Gly. В некоторых вариантах осуществления вариант содержит замену N64_I70delinsHLTAVGK. В некоторых вариантах осуществления последовательность HLTAVGK может быть дополнительно модифицирована одной, двумя или тремя заменами, делециями и/или вставками (вместе) при условии, что остаток Cys не включен. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95% или по меньшей мере примерно на 98% идентична с эталонной SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен фермент D1L3, содержащий фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), конъюгированный в положении, соответствующем Cys 68, который, как полагают, является неспаренным цистеином. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет конъюгацию ПЭГ с аминокислотой, соответствующей C194. В этих вариантах осуществления фрагмент ПЭГ будет обеспечивать продление времени полужизни, избегая при этом дисульфидного скремблирования и/или неправильного сворачивания белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ конъюгирован с использованием химической реакции с малеимидом, которая может быть выполнена в мягких условиях. Известны и могут быть использованы другие химические составы конъюгации, такие как химические составы активации винилсульфона, дитиопиридина и йодацетамида. Фрагмент ПЭГ может быть линейным или разветвленным и обычно может находиться в диапазоне от 10 до 40 кДа или в диапазоне от 20 до 30 кДа.

В качестве альтернативы или в дополнение к этому, в изобретении предложен вариант D1L3, содержащий один или более замещенных остатков аргинина и/или лизина, приводящих к повышенной устойчивости к действию протеаз. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 имеет замену в одном или более положениях, соответствующих K180, K200, K259 и/или R285 в SEQ ID NO: 4. В соответствии с этим раскрытием такие остатки лизина и аргинина идентифицируются как потенциально чувствительные сайты к действию протеаз. Таким образом, один или более (например, 1, 2, 3 или 4) из этих остатков могут быть модифицированы незаряженным остатком, таким как остаток, независимо выбранный из Ala, Gly, Leu, Ile, Val, Thr, Ser и Pro. В некоторых вариантах осуществления чувствительные к протеазе остатки лизина или аргинина заменяются как часть замены структурного блока. Например, вариант D1L3 может содержать одну или более замен, выбранных из K180_A181delinsGL, P198_A201delinsRPSQ и K259A. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 содержит одну или обе замены: K180_A181delinsGL и/или P198_A201delinsRPSQ, каждая из которых необязательно модифицирована одной или двумя аминокислотными заменами, делециями или вставками, при условии, что замена структурного блока не модифицируется заменой или вставкой остатком R или K. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 обладает повышенной устойчивостью к протеолизу одной или более протеазами, выбранными из плазмина, тромбина и/или трипсина.

В качестве альтернативы или в дополнение к этому, вариант D1L3 содержит одну или более мутаций парного основного остатка. В некоторых вариантах осуществления парный основной остаток соответствует положению, выбранному из K50/R51, R80/R81, K114/R115, K199/K200, K226/K227, K291/K292, R297/K298/K299 и K303/R304 из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L3 содержит одну или более замен, выбранных из замены, соответствующей R114T, R114A, R114D, R114Q, K227S и K227E из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций парного основного остатка включают аминокислотную замену, соответствующую R51K, R81K, R115K и R304K. В некоторых вариантах осуществления парный основной остаток заменяется с использованием замены соответствующего структурного блока. В соответствии с этими вариантами осуществления вариант D1L3, экспрессируемый системой экспрессии рекомбинантного белка (например, CHO и *Pichia pastoris*), будет более устойчивым к действию протеаз.

В некоторых аспектах изобретения предложен вариант ДНКазы 1 (D1), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ферменту, определенному SEQ ID NO: 1, с одной или более заменами остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления вариант белка D1 содержит одну или более дополнительных модификаций, которые приводят к повышенной стабильности белка, более высоким уровням продукции в системах экспрессии *in vitro* и/или не существенно меньшей, такой же или лучшей активности по деградации ДНК и/или хроматина и/или NET по сравнению с белком D1 дикого типа с SEQ ID NO:1. Например, вариант D1 может содержать по меньшей мере одну дополнительную замену структурного блока или точечную мутацию, описанную в PCT/US2018/47084, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления вариант D1 имеет замену одного или обоих из C123 и C126, которые необязательно замещены Ala, Ser и Gly. В некоторых вариантах осуществления вариант D1 содержит замену G122_N128delinsYQGDA. В некоторых вариантах осуществления вариант D1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична с SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен фермент D1, содержащий фрагмент ПЭГ, конъюгированный в положении, соответствующем C123 и/или C126. В этих вариантах осуществления фрагмент ПЭГ будет обеспечивать продление времени полужизни, избегая при этом дисульфидного скремблирования и/или неправильного сворачивания белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ конъюгирован с использованием химической реакции с малеимидом, которая может быть выполнена в мягких условиях. Известны и могут быть использованы другие химические составы конъюгации, такие как химические составы активации винилсульфона, дитиопиридина и йодацетамида. Фрагмент ПЭГ может быть линейным или разветвленным и обычно может находиться в диапазоне от 10 до 40 кДа или в диапазоне от 20 до 30 кДа.

В других аспектах изобретения предложен вариант D1L1, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ферменту, определенному SEQ ID NO: 2, с одним или более замещенными остатками цистеина. Остаток(и) цистеина необязательно являются неконсервативными в пределах семейства D1 (например, C22 и/или C50) и необязательно замещены Gly, Arg или Ser или замещены как часть замены структурного блока. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен фермент D1L1, содержащий фрагмент ПЭГ, конъюгированный в положении, соответствующем C22 и/или C50. В этих вариантах осуществления фрагмент ПЭГ будет обеспечивать продление времени полужизни, избегая при этом дисульфидного скремблирования и/или неправильного сворачивания белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ конъюгирован с использованием химической реакции с малеимидом, которая может быть выполнена в мягких условиях. Известны и могут быть использованы другие химические составы конъюгации, такие как химические составы активации винилсульфона, дитиопиридина и йодацетамида. Фрагмент ПЭГ может быть линейным или разветвленным и обычно может находиться в диапазоне от 10 до 40 кДа или в диапазоне от 20 до 30 кДа.

В некоторых аспектах изобретения предложен вариант D1L2, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична ферменту, определенному SEQ ID NO: 3, с одним или более замещенными остатками цистеина. Остатки цистеина могут быть неконсервативными в семейства D1 (например, C43) и необязательно замещены Gly, Arg или Ser или замещены как часть замены структурного блока. В некоторых вариантах осуществления вариант D1L2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен фермент D1L2, содержащий фрагмент ПЭГ, конъюгированный в положении, соответствующем C43. В этих вариантах осуществления фрагмент ПЭГ будет обеспечивать продление времени полужизни, избегая при этом дисульфидного скремблирования и/или неправильного сворачивания белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ конъюгирован с использованием химической реакции с малеимидом, которая может быть выполнена в мягких условиях. Известны и могут быть использованы другие химические составы конъюгации, такие как химические составы активации винилсульфона, дитиопиридина и йодацетамида. Фрагмент ПЭГ может быть линейным или разветвленным и обычно может находиться в диапазоне от 10 до 40 кДа или в диапазоне от 20 до 30 кДа.

В других аспектах изобретения предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие варианты D1, D1L1, D1L2 или D1L3, описанные в данном документе, а также векторы и клетки-хозяева. Клетки-хозяева могут быть клетками любой системы экспрессии, включая бактериальные или эукариотические, независимо от того, относятся ли они к не млекопитающим, такие как *Pichia pastoris*, или млекопитающим, такие как клетки CHO.

В некоторых вариантах осуществления для терапии используется доставка полинуклеотидов. Кодирующие полинуклеотиды могут быть доставлены в виде мРНК или в виде конструкций ДНК с использованием известных процедур, например электропорации или сжатия клеток, и/или векторов (включая вирусные векторы). Полинуклеотиды мРНК могут включать известные модификации (мРНК), чтобы избежать активации врожденной иммунной системы. См. WO 2014/028429, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид доставляется в организм субъекта. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды доставляются в клетку *in vitro*, а клетка доставляется в организм субъекта. Клетка может представлять собой, например, лейкоцит (например, T-клетку или макрофаг), эндотелиальную клетку, эпителиальную клетку, гепатоцит или стволовую клетку.

В других аспектах изобретения предложен способ продуцирования внеклеточных вариантов ДНКазы, описанных в данном документе. Способ включает культивирование клеток, экспрессирующих полинуклеотид, кодирующий внеклеточную ДНКазу, и выделение рекомбинантного белка ДНКазы. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими. В некоторых вариантах осуществления ДНКазу экспрессируется с использованием системы экспрессии, не относящейся к млекопитающим, которая необязательно представляет собой *Pichia pastoris* или *Saccharomyces spp.* В некоторых вариантах

осуществления используется экспрессионная система млекопитающего, такая как клетки CHO.

В изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие внеклеточную ДНКазу или ее вариант, как описано в данном документе, или, необязательно, полинуклеотид или вектор, как описано, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вектор обычно содержит выделенную нуклеиновую кислоту, которая может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Типичные векторы включают автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который включает в себя неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизинное соединение, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.п.

Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения, включая местное, парентеральное или ингаляционное введение. В различных вариантах осуществления композиция составлена для внутрикожного, внутримышечного, внутрибрюшинного, внутрисуставного, внутривенного, подкожного, внутриартериального, перорального, сублингвального, ингаляционного или трансдермального введения. В некоторых вариантах осуществления композицию составляют для внутривенного или подкожного введения.

В других аспектах изобретения предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в деградации внеклеточной ДНК, деградации внеклеточного хроматина, деградации внеклеточной ловушки (ЕТ) и/или деградации внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET). Способ включает введение терапевтически эффективного количества внеклеточной ДНКазы или ее варианта или композиции, описанных в данном документе. Примеры показаний, когда субъект нуждается в деградации внеклеточной ДНК или хроматина (включая деградацию ЕТ или NET), раскрыты в PCT/US18/47084, описание которого включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества белка, который представлен любой из последовательностей от SEQ ID NO: 8 до SEQ ID NO: 30.

В каждом случае, когда описан способ лечения субъекта, в изобретении также предложено использование одного или более внеклеточных белков ДНКазы для лечения или профилактики заболеваний, связанных с ЕТ и/или NET.

В различных вариантах осуществления данного изобретения предложен способ лечения, предотвращения или сдерживания заболеваний или патологических состояний, характеризующихся присутствием или накоплением NET. Такие заболевания или патологические состояния включают, но не ограничиваются ими, заболевания, связанные с хронической нейтрофилией, агрегацией нейтрофилов и лейкостазом, тромбозом и окклюзией сосудов, ишемическим реперфузионным повреждением, хирургическим и травматическим повреждением ткани, острой или хронической воспалительной реакцией или заболеванием, аутоиммунные заболевания, сердечно-сосудистым заболеванием, метаболические заболевания, системное воспаление, воспалительные заболевания дыхательных путей, воспалительные заболевания почек, воспалительные заболевания, связанные с трансплантированной тканью (например, болезнь "трансплантат против хозяина") и рак (включая лейкоз).

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к лечению болезней или патологических состояний, характеризующихся дефицитом D1L3 или дефицитом D1. В некоторых случаях субъект имеет мутацию (например, мутацию с потерей функции) в гене Dnase1L3 или гене Dnase1. У таких субъектов может проявляться аутоиммунное заболевание (например, системная красная волчанка (СКВ) (включая волчаночный нефрит), склеродермия или системный склероз, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника (включая болезнь Крона и язвенный колит) и уртикарный васкулит). В некоторых случаях субъект имеет приобретенный ингибитор D1 (например, антитело к ДНКазе 1 и актин) и/или D1L3 (например, антитело к ДНКазе 1L3). Такие субъекты также могут иметь аутоиммунное или воспалительное заболевание (например, СКВ, системный склероз).

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску окклюзии NET в системе протоков. Например, описанные в данном документе ферменты ДНКазы можно вводить субъекту для лечения панкреатита, холангита, конъюнктивита, мастита, синдрома сухого глаза, нарушения проходимости семявыносящего протока и заболевания почек.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску накопления NET на эндотелиальных поверхностях (например, спайки, вызванные хирургическим вмешательством), коже (например, раны/рубцы) или в синовиальных соединениях (например, подагра и артрит, например, ревматоидный артрит). Описанные в данном документе ферменты ДНКазы можно вводить субъекту для лечения патологического состояния, характеризующегося накоплением NET на эндотелиальных поверхностях, таких как, но не ограничиваясь этим, спайки, вызванные хирургическим вмешательством.

Другие заболевания и патологические состояния, связанные с NET, которые можно лечить или предотвращать, используя ферменты ДНКазы, описанные в данном документе, включают

АНЦА-ассоциированный васкулит, астму, хроническое обструктивное заболевание легких, нейтрофильный дерматоз, дерматомиозит, ожоги, целлюлит, менингит, энцефалит, средний отит, фарингит, тонзиллит, пневмонию, эндокардит, цистит, пиелонефрит, аппендицит, холецистит, панкреатит, увеит, кератит, диссеминированное внутрисосудистое свертывание, острое повреждение почек, острый респираторный дистресс-синдром, шокую печень, гепаторенальный синдром, инфаркт миокарда, инсульт, ишемию кишечника, ишемию конечностей, перекрут яичка, преэклампсию, эклампсию и трансплантацию солидных органов (например, трансплантацию почки, сердца, печени и/или легких). Кроме того, описанные в данном документе ферменты ДНКазы могут быть использованы для предотвращения образования рубца или контрактуры, например, путем местного нанесения на кожу индивидуума, подверженного этому риску, например у человека с хирургическим разрезом, разрывом или ожогом.

В различных вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, которое лечится или будет лечиться ДНКазой дикого типа, включая D1 и стрептодорназой. Подобные болезни или патологические состояния включают тромбоз, инсульт, сепсис, повреждение легких, атеросклероз, вирусная инфекция, серповидно-клеточная болезнь, инфаркт миокарда, воспаление среднего уха, заживление ран, поражение печени, эндокардит, печень инфекция, панкреатит, первичная дисфункция трансплантата, ишемии/реперфузии конечностей, поражение почек, коагуляция крови, индуцированное квасцами воспаление, гепаторенальное повреждение, плевральные экссудации, гемоторакс, внутрипеченочные тромбы, постпневматическая анемия, язвы, отоларингологические состояния, инфекции ротовой полости, незначительные повреждения, синусит, послеоперационные ринопластики, бесплодие, мочевого катетер, обработка раны, тест кожной реакции, пневмококковый менингит, подагра, ножные язвы, муковисцидоз, синдром Картагенера, астма, лобарный ателектаз, хроничный бронхит, бронхоэктаз, волчанка, первичная цилиарная дискинезия, бронхиолит, эпимея, плевральные инфекции, рак, синдром сухого глаза, инфекции нижних дыхательных путей, хронические гематомы, болезнь Альцгеймера и обструктивное заболевание легких.

Другие аспекты и варианты осуществления данного изобретения будут очевидны из следующих примеров.

Примеры

Почти 70% всех биопрепаратов производятся с использованием клеток яичника китайского хомячка (СНО). Действительно, ДНКазы 1 дикого типа (D1; дорназа альфа) обычно продуцируется в клетках СНО. Несмотря на значительные преимущества в разработке клеточных линий и крупномасштабном производстве с использованием клеток СНО, все еще остается серьезная проблема в производстве ферментов ДНКаз из-за значительной степени варибельности и отсутствия надежных способов прогнозирования или моделирования характеристик роста клеток. Важно отметить, что клетки СНО не были способны стабильно продуцировать гиперактивные варианты D1, что препятствовало их клиническому производству, и до данного раскрытия производственные свойства других членов семейства белков ДНКазы 1, включая ДНКазы 1-подобный белок 3 (D1L3), были неизвестны.

Используя СНО и системы микробной экспрессии, при производстве D1L3 было выявлено несколько проблем, включая низкий выход продукции, протеолитическую деградацию, неправильную укладку белка и ошибочное или нежелательное гликозилирование. В этом изобретении предложены технические решения этих и других проблем производства, которые также могут улучшить терапевтические свойства D1L3.

Пример 1. Экспрессия и характеристика D1L3 с делецией основного домена (BDD) в клетках яичников китайского хомячка (СНО) и в *Pichia pastoris*.

ДНКазы 1 и ДНКазы 1L3 предпочтительно расщепляют ДНК без белка и комплексы ДНК-гистон (т.е. хроматин) соответственно. Предыдущие исследования позволяют предположить, что основной домен (BD) на С-конце ДНКазы 1L3, который отсутствует в ДНКазе 1, отвечает за различные субстратные специфичности обоих ферментов (Sisirak et al., Cell, 2016; Keyel, Developmental Biology, 2017).

Технология белковой инженерии, называемая конструирование структурных блоков белков, описана в PCT/US18/47084 и US 62/800790, описания которых полностью включены в данное описание посредством ссылки. Этот подход может быть применен к членам семейства белков ДНКазы 1 и ДНКазы 2. Способ основан на следующих этапах: обеспечение выравнивания белок-белок донорных и реципиентных ферментов ДНКазы; определение варибельных аминокислотных последовательностей для переноса, при этом варибельные аминокислоты фланкируются одной или несколькими консервативными аминокислотами в ферментах донорных и реципиентных ферментах ДНКазы; замена варибельных аминокислот реципиентной ДНКазы на варибельные аминокислоты донорной ДНКазы для создания химерной ДНКазы и рекомбинантное продуцирование химерной ДНКазы.

Чтобы охарактеризовать аминокислоты, которые ответственны за активность по деградации хроматина (активность "хроматиназы"), в D1L3 дикого типа была проведена замена структурными блоками из D1, как описано в PCT/US2018/047084. Замена структурных блоков D1L3 выбирают из D1 человека и приводят к образованию вариантов D1L3 человека, которые имеют следующие мутации: M21_R22delinsLK, C24_S25delinsAA, V28_S30delinsIQT, S34T, Q36_V44delinsMSNATLVSY, K47_K50delinsQILS, C52Y, I55_M58delinsIALVQE, I60_K61delinsVR, N64_I70delinsHLTAVGK,

M72_K74delinsLDN, R77_I83delinsQDAPD, N86H, I89V, S91_R92delinsEP, T97S, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_R115delinsAVD, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, F135_V136delinsAI, W138R, Q140_H143delinFSRF, A145_D148delinsEVRE, V150A, I152V, 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, K259A, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM, Q282_S205delinsK относительно SEQ ID NO: 4.

Эти 63 варианта D1L3 были проверены на потерю или усиление активности по деградации хроматина. Вкратце, варианты D1L3 временно экспрессировались в клетках CHO с использованием вектора экспрессии *in vitro*. Супернатанты культур собирали и тестировали на активность по деградации хроматина с использованием очищенных ядер в качестве источника хроматина. Как показано на фиг. 1, замена структурными блоками № 17 и № 63 из D1 значительно улучшили деградацию высокомолекулярного (BM) хроматина до небольших фрагментов по сравнению с D1L3 дикого типа. Замена структурного блока № 7 вызывает миссенс-мутацию Q101R, которая заменяет глутамин в положении 101 на аргинин (SEQ ID NO: 8). Замена структурного блока № 63 вызывает мутацию Q282_S305delinsK, которая удаляет полный С-концевой BD D1L3 в аминокислотных положениях с 283 по 305 и заменяет глутамин (Q) в положении 282 на лизин (SEQ ID NO: 9). Затем был выполнен вестерн-блот анализ супернатантов для определения уровней экспрессии D1L3 дикого типа и обоих мутантов (фиг. 2). К удивлению авторов изобретения, было обнаружено два варианта D1L3 разного размера в образцах с D1L3 дикого типа и мутантом Q101R. Образцы с Q282_S305delinsK содержали только меньший вариант D1L3. Данные позволяют предположить, что BD D1L3 дикого типа спонтанно удаляется (например, протеолизировается) во время экспрессии или пост-секреции в клетках CHO. Два варианта D1L3 также были обнаружены в супернатантах клеток CHO, которые стабильно экспрессируют WT-D1L3 (фиг. 3). Следует отметить, что основной домен D1L3 с удаленным доменом (BDD-D1L3) показал существенно повышенную активность хроматиназы по сравнению с D1L3 дикого типа.

Затем была протестирована *Pichia pastoris* как альтернативная система микробной экспрессии относительно клеток CHO. Обычно авторы изобретения наблюдали более высокие уровни экспрессии с BDD-D1L3 по сравнению с D1L3 дикого типа. На этом этапе были очищены и охарактеризованы D1L3 и BDD-D1L3 дикого типа из супернатантов ферментации *Pichia pastoris* (фиг. 4). Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что D1L3 дикого типа был протеолитически усечен внутри BD в аминокислотных положениях K291, K291 или S293, что привело к гетерогенной смеси вариантов D1L3 после очистки. В отличие от D1L3 дикого типа, экспрессия BDD-D1L3 из-за трех замен структурных блоков (F275Y, F279_K280delinsVM, Q282_S205delinsK) создавала чистый белок.

Затем сравнили хроматиназную активность D1L3 после обеих очисток. Авторы изобретения наблюдали, что гетерогенная смесь вариантов D1L3 с усечением BD в положениях K291, K291 или S293 имела примерно в 10 раз более низкую хроматиназную активность по сравнению с вариантом D1L3 с полной делецией BD из-за F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S205delinsK. В совокупности данные показывают, что протеолитическое расщепление BD может происходить естественным образом в системах экспрессии микробов и млекопитающих (например, CHO и *P. pastoris*), и удаление BD, по-видимому, активирует активность D1L3 по деградации хроматина.

Пример 2. Экспрессия D1L3 в клетках CHO в биореакторах.

В данном документе раскрывается разработка стабильных клеточных линий CHO, продуцирующих D1L3 дикого типа (SEQ ID NO: 4). Клеточные линии культивировали в биореакторах с использованием стандартной культуральной среды для CHO. В частности, на фиг. 5 показан вестерн-блот анализ D1L3 человека, экспрессируемого и секретируемого клетками CHO в биореакторе в условиях, совместимых с cGMP. Образцы были собраны в разные моменты времени (t_1 - t_3). Были обнаружены только минорные уровни фрагментов D1L3 и D1L3. Данные показывают, что низкий выход продукции D1L3 является проблемой при производстве D1L3.

Как описано в данном документе, высокие уровни продукции D1L3 дикого типа были достигнуты путем добавления полианионов в культуральную среду. Такие полианионы могут содержать один или более остатков из гепарина, сульфата декстрана, цитрата железа и этилендиаминтетрауксусной кислоты и представлять собой биологически активный ингредиент в "реагентах против слипания клеток". В частности, авторы изобретения добавили сульфат декстрана в культуральную среду для CHO и наблюдали сильное увеличение фрагментов D1L3, а также D1L3 (фиг. 5). Данные показывают, что полианионы увеличивают выход продукции D1L3, но не предотвращают протеолитическую деградацию.

На фиг. 6A показано, что полианионы, такие как сульфат декстрана (DS), образуют комплекс с D1L3. Комплекс D1L3-DS предотвращает взаимодействие и поглощение D1L3 отрицательно заряженными поверхностями во время производственного процесса. Такие отрицательно заряженные поверхности включают, но не ограничиваются ими, клеточную поверхность продуцирующих клеток (например, клетки CHO, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces* spp.), ДНК, экспонируемую умирающими клетками, и по-

верхности биореакторов. На фиг. 6B и 6C показан двухэтапный процесс очистки D1L3 от комплексов DS-D1L3. Как показано на фиг. 6, первый этап направлен на диссоциацию комплекса DS-D1L3. Диссоциация может быть достигнута путем инкубации комплекса DS-D1L3 с сильными анионообменными поверхностями, которые связывают DS и, таким образом, высвобождают D1L3. В частности, процесс очистки может включать пропускание культуральной среды, содержащей DS-D1L3, через хроматографическую колонку, заполненную сильной анионообменной смолой, с последующим сбором потока, который содержит D1L3 без DS. Второй этап процесса очистки показан на фиг. 6C и включает аффинную очистку D1L3 из потока без DS посредством применения сильной катионообменной смолы. В заключение, выход продукции D1L3 может быть существенно увеличен за счет добавления полианионов, таких как сульфат декстрана.

Пример 3. Конструирование D1L3 устойчивого к действию протеаз.

D1L3 дикого типа содержит 50 остатков аргинина и лизина, что делает фермент особенно чувствительным к таким протеазам, как трипсин, тромбин и плазмин. В этом примере были идентифицированы сайты расщепления трипсином и плазмином в D1L3. Сайты могут быть мутированы с получением вариантов D1L3, устойчивых к действию протеаз.

Вкратце, очищенный D1L3 обрабатывали трипсином. Были выделены фрагменты D1L3 и аминокислотная последовательность фрагментов определена с использованием комбинаций жидкостной хроматографии (ЖХ) и масс-спектрометрии (МС). Было определено, что трипсин расщепляет D1L3 по следующим остаткам аргинина и лизина: R22, R29, R51, R66, R80, R81, R95, K99, R115, K147, K163, K180, R208, R212, R235, R239, K250 и K262. Эти остатки аргинина и лизина можно заменить небольшими аминокислотами, такими как аланин, валин и серин, или аминокислотами, которые имеют аналогичные свойства в соответствии с оценкой расстояния Грэнтэма (например, гистидином, глутамином и глутаматом; фиг.7). D1, устойчивый к протеазам, содержит остатки аргинина и лизина, соответствующие R51, R95, K99 и R235, что позволяет предположить, что эти остатки не несут основную ответственность за протеолитическую деградацию D1L3.

Конструирование структурных блоков белков применялось для переноса следующих структурных блоков из D1 для замены структурных блоков D1L3, которые содержат сайты расщепления трипсином (фиг. 7): R22 (Мутация: M21_R22delinsLK), R29 (V28_S30delinsIQT), R66 (N64_I70delinsHLTAVGK), R80 (R77_I83delinsQDAPD), R81 (R77_I83delinsQDAPD), R115 (V113_R115delinsAVD), K163 (K163A), K180 (K180_A181delinsGL), R208 (R208W) MR212 (R212T), R239 (L238_R239delinsVA), K250 (K250D) и K262 (K262G).

Плазмин является протеазой плазмы, которая образуется при активации ее зимогенного плазминогена. Ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1) подавляет активацию плазмина. Интересно, что PAI-1 увеличивает ферментативную активность D1L3 в сыворотке, предполагая, что плазмин может протеолитически инактивировать D1L3. Однако сайты расщепления плазмином в D1L3 не идентифицированы.

Анализ *in silico* показал, что комбинация аминокислот лизин-аланин (KA) или аргинин-аланин (RA), как полагают, предпочтительно расщепляется протеазой плазмином или протеазами, которые обладают плазминоподобной активностью. D1L3 содержит всего четыре предполагаемых сайта расщепления плазмином (фиг.8): (сайт 1) K180/A181 (K160/A161 без сигнального пептида), (сайт 2) K200/A201 (K180/A181 без сигнального пептида), (сайт 3) K259/A260 (K239/A240 без сигнального пептида) и (сайт 4) R285/A286 (R270/A250 без сигнального пептида). Используя парное выравнивание D1 и D1L3, было обнаружено, что ни один из сайтов расщепления плазмином не присутствует в D1 (фиг. 8). Эти данные согласуются с тем фактом, что на активность D1 не влияет инактивация протеазами сыворотки, такими как тромбин и плазмин. Конструирование структурных блоков белков применялось для переноса следующих структурных блоков из D1 для замены структурных блоков D1L3, которые содержат сайты расщепления плазмином (фиг.9): (сайт 1) K180_A181delinsGL, (сайт 2) P198_A201delinsRPSQ и (сайт 3) K259A. R285/A286 (сайт 4) находится в C-концевом удлинении, которое отсутствует в D1. Следовательно, авторы изобретения создали вариант D1L3, в котором были мутированы все четыре предполагаемых сайта расщепления плазмином: K180_A181delinsGL, P198_A201delinsRPSQ, K259A и R285A. Затем была проанализирована деградация хроматина вариантом D1L3, при этом наблюдалась сильная активность по деградации хроматина в мутированном D1L3 (фиг. 10). В совокупности данные показывают, что четыре остатка аргинина и лизина, K180, K200, K259 и R285, могут быть мутированы для снижения риска протеолитической деградации без ущерба для ферментативной активности.

Затем очищенный D1L3 обрабатывали очищенным плазмином. Были выделены фрагменты D1L3 и аминокислотная последовательность фрагментов определена с использованием комбинаций ЖХ и МС. Авторы изобретения определили, что плазмин расщепляет D1L3 по следующим остаткам аргинина и лизина: R22, R29, K45, K47, K74, R81, R92, K107, K176, R212, R226, R227, K250, K259 и K262. Эти остатки аргинина и лизина можно заменить небольшими аминокислотами, такими как аланин, валин и серин, или аминокислотами, которые имеют аналогичные свойства в соответствии с оценкой расстояния Грэнтэма (например, гистидином, глутамином и глутаматом; фиг.11). D1, устойчивый к протеазам, содержит остатки лизина, соответствующие K45, что позволяет предположить, что эти остатки не несут

основную ответственность за протеолитическую деградацию D1L3 плазмином. Конструирование структурных блоков белков применялось для переноса следующих структурных блоков из D1 для замены структурных блоков D1L3, которые содержат сайты расщепления трипсином *in silico* (фиг. 11): R22 (Мутация: M21_R22delinsLK), R29 (V28_S30delinsIQT), K47 (K47_K50delinsQILS), K74 (M72_K74delinsLDN), R81 (R77_I83delinsQDAPD), R92 (S91_R92delinsEP), K107 (K107_L110delinsRPDQ), K176 (K176_R178delinsQEK), R212 (R212T), K226 (V225_S228delinsATP), K227 (V225_S228delinsATP), K250 (K250D), K259 (K259A) и K262 (K262G).

Наконец, был выделен рекомбинантно экспрессированный D1L3 дикого типа и секвенирован его С-конец. Были идентифицированы три различные аминокислотные последовательности, оканчивающиеся на S290 (SEQ ID NO: 10), K291 (SEQ ID NO: 11) и K292 (SEQ ID NO: 12) соответственно (фиг. 4, пример 1). Эти данные идентифицируют остатки лизина 291 и 292 как значимые сайты протеолитического расщепления D1L3 во время крупномасштабного производства.

Пример 4. Конструирование D1L3 для избежания деградации.

Авторы изобретения наблюдали фрагментацию D1L3 после гетерологичной экспрессии у *Pichia pastoris*. Анализ фрагментов, характеризующих парными основными аминокислотами, остатками аргинина (R) и лизина (K) в качестве сайтов протеолитического расщепления. Подобную особенность деградации наблюдали после экспрессии D1L3 в клетках СНО. Эти наблюдения показывают, что клетки *Pichia pastoris* и СНО имеют общие гомологичные протеазы, которые расщепляют D1L3 по парным основным аминокислотам, хотя эффект был более значительным в клетках СНО.

Было определено, что фермент, расщепляющий парные основные аминокислоты (PASE), способствовал фрагментации ДНКазы1L3. PASE, также известный как фурин (Uniprot ID: P09958), экспрессируется у человека и млекопитающих. *Pichia pastoris* экспрессирует два фермента, нацеленных на парные основные аминокислоты, а именно аспарагиновую протеиназу 3 (ген: Ysp1; Uniprot ID: P32329) и кексин (ген: Kex2; Uniprot ID: P13134). Таким образом, варианты ДНКазы1L3 и ДНКазы1L3 могут экспрессироваться в *Pichia pastoris* и в клетках СНО, в которых фурин, аспарагиновая протеиназа 3 и кексин фармакологически ингибированы или генетически истощены.

Кроме того, мутации парных основных аминокислот в вариантах ДНКазы1L3 и ДНКазы1L3 делают возможной их экспрессию в СНО и *Pichia pastoris* с пониженной фрагментацией. Анализ фрагментов ДНКазы1L3 выявил особенности парных основных аминокислот в положениях: K50/R51, R80/R81, K114/R115, K199/K200, K226/K227, K291/K292, R297/K298/K299 и K303/R304 в SEQ ID NO: 2

Как раскрыто в предварительной заявке на патент США № 62/800790 (которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), ДНКазы1L3 других видов содержит аминокислотные замены в этих сайтах расщепления, включая R114T (мышь), R114A (крыса), R114D (морская свинка), R114Q (корова), K227S (собака) и K227E (слон). Эти аминокислотные замены могут быть применены к ДНКазы1L3 человека для придания ферменту устойчивости к протеолитической деградации, в том числе во время экспрессии в клетках СНО и *Pichia pastoris*.

Кексин предпочтительно расщепляется в сайтах после остатков KR и RR. ДНКазы1L3 в положениях K50/R51, R80/R81, K114/R115 и K303/R304 имеет 4 сайта расщепления KEX2. Аминокислотные замены этих остатков делают ДНКазы1L3 устойчивым к действию KEX2 и делают возможной экспрессию вариантов ДНКазы1L3 и ДНКазы1L3 в *Pichia pastoris* и в клетках СНО. Эти аминокислотные замены могут быть консервативными, например R51K, R81K, R115K и R304K.

Пример 5. Конструирование вариантов D1L3 для предотвращения образования высокомолекулярных агрегатов.

Во время cGMP-совместимой экспрессии D1L3 в клетках СНО (фиг. 12A) наблюдали накопление высокомолекулярных агрегатов D1L3, указывая на дополнительную проблему для клинического производства D1L3. Образование агрегатов с высоким молекулярным весом наблюдалось у *Pichia pastoris* в гораздо меньшей степени.

Применение восстанавливающих условий к белкам материала биореактора привело к растворению агрегатов D1L3. Данные показывают, что образование агрегатов D1L3 вызывается внутри- и/или межмолекулярным перекрестным связыванием через дисульфидные мостики во время экспрессии белка. В частности, как показано на фиг. 12B, гель прогоняли в невозстанавливающих условиях, и показано накопление высокомолекулярных агрегатов D1L3 с течением времени. Гель прогоняли в восстанавливающих условиях, и агрегаты не были обнаружены. Данные показывают, что ошибочные внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи вызывают неправильную укладку D1L3 человека в производственных условиях.

На фиг. 13 показано выравнивание аминокислотной последовательностей D1 (SEQ ID NO:1) человека и D1L3 (SEQ ID NO: 4) человека. Показаны сигнальный пептид, консервативные аминокислоты, переменные аминокислоты, неконсервативные остатки цистеина и консервативные остатки цистеина. Мутации в неконсервативных остатках цистеина уменьшают возможности образования внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей во время экспрессии белка. Анализ аминокислотной последовательности D1L3 (SEQ ID NO: 4) показал присутствие пяти остатков цистеина (C): C24, C52, C68, C194 и C231 (фиг. 14). Остатки цистеина C194 и C231 консервативны среди всех членов семейства белков

ДНКазы 1 и образуют дисульфидные связи, которые необходимы для ферментативной активности ДНКазы 1. Функция остатков цистеина в D1L3 не была известна до данного раскрытия. Соответственно, как описано в данном документе, мутация этих остатков цистеина снижает перекрестное сшивание через дисульфидные мостики и, таким образом, увеличивает выход продукции белка.

Остатки цистеина могут быть заменены другими небольшими аминокислотами, а именно аланином (A), серином (S) и глицином (G), среди прочего. Такие замены вызывают следующие аминокислотные мутации C24A/S/G, C52A/S/G, C68A/S/G, C194A/S/G и C231A/S/G. Кроме того, структурные блоки, которые содержат консервативные остатки цистеина, могут быть заменены структурными блоками из донорной ДНКазы семейства белков ДНКазы 1 (например, D1 и D1L3). Следующие структурные блоки из D1 были использованы для замены структурных блоков D1L3, которые содержат неконсервативные остатки цистеина C24, C52 и C68: C24_S25delinsAA, C52Y и N64_I70delinsHLTAVGK. Активность вариантов D1L3 по деградации хроматина определяли количественно, как описано в PCT/US18/4708. Как обычные замены аминокислот (C24A, C52A), так и замены структурных блоков (C24_S25delinsAA, C52Y) вызвали полное отсутствие деградации хроматина, что указывает на то, что C24 и C52 необходимы для активности D1L3 (фиг. 15). Важно отметить, что мутация цистеина C68 либо путем обычной аминокислотной замены [C68A, (SEQ ID NO: 13)], либо путем мутации ВВ (N64_I70delinsHLTAVGK) привела к образованию варианта D1L3 с активностью по деградации хроматина (фиг. 15). Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что цистеин C68 не консервативен среди других членов семейства белков ДНКазы 1, подтверждая мнение о том, что C68 не требуется для ферментативной активности. Кроме того, было обнаружено, что аминокислотная замена высококонсервативного цистеина C194 на аланин (C194A), но не мутация высококонсервативного цистеина C231 на аланин (C231A), привела к образованию ферментативно активного варианта D1L3 (фиг. 15). Таким образом, цистеин C68 и C194 можно мутировать, чтобы снизить риск образования ошибочных дисульфидных связей во время продукции D1L3.

Аналогичный подход может быть применен для мутации неконсервативных остатков цистеина в других членах семейства белков ДНКазы 1: D1, ДНКазы 1-подобный белок 1 (D1L1) и ДНКазы 1-подобный белок 2 (D1L2). D1 имеет два неконсервативных цистеина: C123 и C126. D1L1 показывает два неконсервативных остатка цистеина (C22, C50), которые соответствуют C24 и C52, D1L2 имеет только один неконсервативный остаток цистеина: C43. Мутация неконсервативных остатков цистеина членов семейства белков ДНКазы 1 уменьшит перекрестное связывание через ошибочные дисульфидные мостики во время экспрессии белка и, таким образом, позволит производить D1, D1L1, D1L2 и D1L3 для терапевтического применения.

Пример 6. Конструирование и экспрессия D1L3 и слитого белка альбумин-D1L3 в *Pichia pastoris*.

Была протестирована экспрессия рекомбинантных внеклеточных ДНКаз человека, включая D1L3, с использованием *Pichia pastoris*. Как показано на фиг. 16А, первой на N-конце D1L3 находится лидерная последовательность пре-про-секреции α -фактора спаривания (aMF) *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 46), обычного инструмента для экспрессии гетерологичного белка в *Pichia pastoris*. Как раскрыто в данном документе, комбинация aMF с D1L3 вызвала неожиданное непротестирование aMF из-за гликозилирования (фиг. 16В). Гликозилирование белка D1L3 ограничивает использование *P. pastoris* для клинического производства D1L3. D1L3 правильно протестирована, когда первым на N-конце находится нативный секреторный сигнальный пептид D1L3 [фиг. 16В, (SEQ ID NO: 48)]. Важно отметить, что aMF увеличивал экспрессию D1L3 в 3-5 раз по сравнению с нативным сигнальным пептидом D1L3. Поэтому был проанализирован процессинг слитых белков D1L3. В пилотных исследованиях было получено N-концевое слияние aMF и альбумина сыворотки человека [HSA, (SEQ ID NO: 39)] с D1L3 (фиг. 17А). Некоторые варианты содержали линкерный пептид [например, (GSSSS)₃] между HSA и D1L3. Как показано на фиг. 17В и 17С, экспрессия слитого белка в *P. pastoris* генерировала негликозилированный и ферментативно активный D1L3. Кроме того, уровни экспрессии были увеличены в 5-10 раз по сравнению с экспрессией D1L3, управляемой природным секреторным сигнальным пептидом. В совокупности данные показывают, что слияние D1L3 с альбумином делает возможным производство в *Pichia pastoris*.

На основе этих пилотных исследований были сконструированы различные слитые конструкции HSA с D1L3 дикого типа и BDD-D113 и подвергнуты скринингу на уровни экспрессии целевого белка (SEQ ID NO: 17-28). Как показано на фиг. 18, N-концевое слияние альбумина сыворотки человека (SEQ ID NO: 17) с вариантом BDD-D113 (SEQ ID NO: 16) существенно не увеличивало уровни экспрессии. Однако следует отметить, что авторы изобретения действительно обнаружили сильное увеличение уровней экспрессии после вставки гибкого линкера, состоящего из остатков глицина (G) и серина (S) между HSA и BDD-D1L3. Кроме того, длина линкерной последовательности коррелировала с повышенной экспрессией. Например, хотя 12±1,9 относительных единиц экспрессии были получены с линкером из 5 аминокислот (SEQ ID NO: 18), а с линкером из 15 аминокислот (SEQ ID NO: 19) уровень экспрессии составил 32±3,2 относительных единиц, приблизительно 7,5-кратное улучшение наблюдалось при слиянии с HSA без линкера. Кроме того, N-концевое расположение было критическим для улучшенных уровней экспрессии, поскольку C-концевое слияние конструкций линкер-HSA привело к экспрессии на низких уровнях (SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21). Следует отметить, что N-концевое слияние HSA через

гибкий линкер также значительно увеличивало экспрессию D1L3 дикого типа (SEQ ID NO: 22), примерно в 20 раз по сравнению с нативным D1L3 (SEQ ID NO: 4). В заключение, слияние HSA через линкер с N-концом позволяет продуцировать варианты D1L3, а также BDD-D1L3.

Затем авторы изобретения проверили, является ли природа линкерной последовательности критической для улучшения экспрессии D1L3. Было протестировано две дополнительные последовательности: APAPAPAPAPAPAP (SEQ ID NO: 33, 14 аминокислот, жесткий линкер) и AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO: 34, 12 аминокислот, жесткий, спиральный линкер). Как показано на фиг. 19, в обеих тестовых конструкциях (SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24) наблюдалось сильное увеличение экспрессии, но при жестком спиральном линкере не было достигнуто такого же сильного увеличения уровней экспрессии, как при линкере GGGSGGGSGGGGS. Таким образом, длина и кислотный состав линкера влияют на уровни экспрессии D1L3.

Затем была проанализирована взаимосвязь между длиной линкера, уровнем экспрессии и ферментативной активностью. Для этих тестов были сконструированы экспрессионные векторы, содержащие N-концевое слияние HSA с GS-линкером с вариантами BDD-D1L3 (SEQ ID NO: 25-27). Были протестированы три линкера различной длины:

SGGSGSS [7 аминокислот, (SEQ ID NO: 35)],

SGGSGGSGGSGGSGSS [16 аминокислот, (SEQ ID NO: 36)]

и SGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGSS [31 аминокислота: (SEQ ID NO: 37)].

Как показано на фиг. 20, наблюдалось, что удлинение линкерной последовательности с 7 до 16 аминокислот приводит к увеличению уровня экспрессии. Дальнейшее удлинение с 16 до 31 аминокислоты не увеличивало экспрессию белка, но увеличивало ферментативную активность, что определялось по разложению BM-хроматина на HM-хроматин. Биопрепараты, слитые с альбумином, часто демонстрируют пониженную активность, поскольку альбумин стерически препятствует взаимодействию с субстратами и лигандами. Таким образом, пептидные линкеры можно использовать для увеличения расстояния между альбумином и гибридным белком или пептидом. Однако наблюдение, что вставка линкерной последовательности между HSA и D1L3 одновременно улучшает ферментативную активность и уровни экспрессии, было неожиданным.

Было проведено сравнение активности BDD-D1L3 (SEQ ID NO: 14) по деградации хроматина с его гибридным аналогом (SEQ ID NO: 19). Вкратце, мышам *Dnase1^{-/-}Dnase113^{-/-}* инъецировали SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 19. Сыворотку собирали через 15 мин после инъекции. Как показано на фиг. 21A, сходную активность по деградации хроматина сыворотки наблюдали у обоих животных. Важно отметить, что слияние альбумина с N-концом D1L3 и других внеклеточных ДНК человека обеспечивает терапевтические препараты с увеличенным временем полужизни в отношении ДНКазы. Как описано в данном документе, определили время полужизни SED ID NO: 19, слитого белка HSA-BDD-D1L3 с гибким GS-линкером из 15 аминокислот, на коммерчески доступной модели грызунов. Животная модель характеризуется трансгенной экспрессией FcRn человека, который отвечает за длительное время полужизни альбумина в кровотоке. В то время как неконъюгированный D1L3 (например, SEQ ID NO: 4) имеет очень короткое время полужизни в кровотоке (<30 мин), слияние с альбумином продлило время полужизни до 3,3 дня, тем самым существенно улучшив системное воздействие, а также обеспечив быстрое всасывание с t_{\max} 5 мин (фиг. 21B). В совокупности данные демонстрируют, что N-концевое слияние HSA с D1L3 через линкерную последовательность не только облегчает производство, но также улучшает фармакокинетические свойства D1L3 *in vivo*.

Наконец, было протестировано двойное слияние HSA с N- и C-концом D1L3. Сперва было проанализировано C-конец D1L3 на предмет потенциальных сайтов прикрепления. Авторы изобретения идентифицировали два остатка серина в положениях 283 и 284, которые обеспечивают гибкое соединение BD (RAFTNSKKSVTLRKKTCKRS) с центральной частью D1L3. Таким образом, авторы изобретения удалили BD и решили присоединить HSA через гибкий GS-линкер (SEQ ID NO: 38) к S284. Как показано на фиг. 22, слияние HSA с N- и C-концом BDD-D1L3 (SEQ ID NO: 28) поддерживало высокие уровни экспрессии, которые наблюдались при слиянии HSA с N-концом (SEQ ID NO: 27).

Пример 7. Разработка расщепляемых линкерных последовательностей.

Раскрытые в данном документе результаты имеют значение не только для производства. Например, варианты D1L3 с C-концевыми аминокислотными делециями, которые сохраняют свою ферментативную активность по деградации хроматина и/или NET, как показано с помощью SEQ ID NO: 9-SEQ ID NO: 12, можно использовать для терапии D1L3. Кроме того, сайт-специфическое алкилирование неспаренного цистеинтиола обычно используется для создания биопрепаратов с увеличенным временем полужизни для терапевтических применений. В частности, несущественные цистеины C68 и C194 из D1L3 можно использовать для сайт-специфического ПЭГилирования (ПЭГ, полиэтиленгликоль). Кроме того, ожидается, что варианты D1L3, устойчивые к инактивации плазмином из-за мутаций, таких как K180_A181delinsGL, P198_A201delinsRPSQ, K259A и R285A, будут иметь улучшенное время полужизни и, следовательно, эффективность в терапевтических применениях.

Важно отметить, что слияние альбумина с N-концом D1L3 и другими внеклеточными ДНК человека обеспечивает терапевтические препараты с увеличенным временем полужизни в отношении ДНКазы

(фиг. 23А). Несколько линкерных последовательностей использовали для уменьшения стерического ингибирования D1L3 альбумином. Кроме того, был разработан физиологически расщепляемый пептидный линкер. Пептидный линкер был разработан для расщепления, когда слитый белок находится в непосредственной близости от внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET). Пептидные последовательности, на которые нацелены специфические для нейтрофилов протеазы, такие как эластаза нейтрофилов, катепсин G и протеиназа 3, являются кандидатами для расщепляемой линкерной последовательности.

Была разработана расщепляемая линкерная последовательность, которая расщепляется внутрисосудисто и, таким образом, оптимальна для внутривенного и внутриартериального применения терапевтических средств на основе ДНКаз. При разработке пептида было учтено, что NET обладают способностью активировать факторы свертывания крови, в частности фактор свертывания XII (FXII). Активированный FXII (FXIIa) имеет два основных субстрата: фактор свертывания крови XI (FXI, SEQ ID NO: 40) и прекалликреин (PK, SEQ ID NO:41). Выравнивание аминокислотной последовательности показало, что сайт расщепления FXIIa консервативен для FXI и PK (фиг. 23В). В FXI сайт расщепления находится между аргинином 387 и изолейцином 388. В PK сайт расщепления находится между аргинином 390 и изолейцином 391. Действительно, FXI и PK являются гомологичными белками. Как описано в данном документе, авторы изобретения разработали несколько пептидных линкеров, которые содержат все или части последовательности FXI с положения от 380 до положения 403 (SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43) или последовательности PK с положения от 383 до положения 406 (SEQ ID NO: 44).

В конечном итоге, линкер, расщепляемый FXIIa, можно использовать для производства варианта других биопрепаратов с увеличенным временем полужизни (фиг. 24), включая, помимо прочего, варианты другой внеклеточной ДНКазы, факторов свертывания крови человека (например, фактора VII, фактора VIII, и фактора IX), а также факторы комплемента (например, фактора H).

Все патенты и патентные публикации, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ДНКазы человека дикого типа.

SEQ ID NO: 1

ДНКаз1 (NP_005212.2): сигнальный пептид, зрелый белок:

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTHYVYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYDDGCEPCGNDTFN
REPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDMVMGDFNAGCSYVVP
SQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQ
AISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 2

ДНКаз1-подобный белок 1 (NP_006721.1): сигнальный пептид; зрелый белок:

MHYPTALLFLILANGAQAQAFRCAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEVVDSSGSA
IPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSYVYNDEDDVFAREPFVAQFSLP
SNVLPSSLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLVSVQHWQSKDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEP
GFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLHGERCRSLLHTAAAFDFPFSFQLTEEEALNIDHYPVEVELK
LSQAHSVQPLSLTVLLLLSLLSPQLCPAA

SEQ ID NO: 3

ДНКаз1-подобный белок 2 (NP_001365.1): сигнальный пептид, зрелый белок:

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVS DPACGSIIAKILAGYDLALVQEVDRPDL
SAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMLYFVYRKDAVSVDVDTYLPDPEDVFSREPFVVKFS
APGTGERAPPLPSRRALTPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDMLFLGD
FNADCSYVRAQDWAIRLSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCA YDRIVACGARLRRLKPKQSATVHDFQ
EEFGLDQTQALASDHFPVEVTLKFHR

SEQ ID NO: 4

ДНКаз1-подобный белок 3, изоформа 1 (NP_004935.1): сигнальный пептид, зрелый белок:

MSRELAPLLLLLSIHSALAMRCSFNVSFSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHNDYQDGDADVFSREPFV
VWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETS VKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNI
RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA YDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQKAYKLT EEEALDVS DH
FPVEFKLQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 5

ДНКаз1-подобный белок 3, изоформа 2 (NP_001243489.1): сигнальный пептид; зрелый белок:

MSRELAPLLLLLSIHSALAMRCSFNVSFSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
CPILMEKLNREKLVSVKRSYHYHNDYQDGDADVFSREPFV VWFQSPHTAVKDFVVIPLHTTPETS VKEIDE
LVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNI RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA YD
RIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDFQKAYKLT EEEALDVS DHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKR
S

SEQ ID NO: 6

ДНКаз2А (O00115): сигнальный пептид; зрелый белок:

MIPLLLAALLCVPAGALTCYGDGSGQPVDFVYKLPALRSGEAAQRGLQYKYLDESSGGWRD
 GRALINSPEGAVGRSLQPLYRSNTSQLAFLLYNDQPPQPSKAQDSSMRGHTKGVLLLDHDGGFWLVHS
 VPNFPPPASSAAYSWPHSACTYGTLLCVSFPFAQFSKMGKQLTYTYPWVYNYQLEGIFAQEFPLENV
 VKGHHVSEQEPWNSSITLSQAGAVFQSFQKFKGDDLYSGWLAALGTNLQVQFVHKTGILPSNCS
 DIWQVLNVNQAIFPGPAGPSFNSTEDHSKWCVSPKGPWTCVGDMMNRNQGEEQRGGGTCAQLPALWK
 AFQPLVKNYQPCNGMARKPSRAYKI

SEQ ID NO: 7

ДНКказа 2В (Q8WZ79): сигнальный пептид; зрелый белок:

MKQKMMARLLRTSFALLFLGLFGVLGAATISCRNEEGKAVDWFTFYKLPKRQNKESGETGLEYL
 YLDSTTRSWRKSEQLMNDTKSVLGRTLQQLYEAYASKSNNTAYLIYNDGVPKPVNYSRKYGHTKGLL
 LWNRVQGFVLIHSIPQFPPIPEEGYDYPPTGRRNGQSGICITFKYNQYEAIDSQLLVCNPNVYSCSIPATF
 HQELIHMPQLCTRASSEIPGRLLTTLQSAQGQKFLHFAKSDSFLDDIFAAWMAQRLKTHLLTETWQRK
 RQELPSNCSLPYHVYNIKAIKLSRHSYFSSYQDHAKWCISQKGTNRWTCIGDLNRSRPHQAFRSGGFICT
 QNWQIYQAFQGLVLYYESCK

Вариант ДНКказа1L3 человека

SEQ ID NO: 8

ДНКказа1-подобный белок 3, Q101R(сигнальный пептид; зрелый белок)

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKERYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNI
 RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVSDH
 FPVEFKLQSSRAFTNSKKSIVTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 9

ДНКказа1L3, Q282_S305delinksK (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNI
 RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVSDH
 FPVEFKLQSSRAFTNSK

SEQ ID NO: 10

ДНКказа1L3, S305delinsK (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNI
 RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQAAYKLTETEEALDVSDH
 FPVEFKLQSSRAFTNS

SEQ ID NO: 11

ДНКказа1L3, K292_S305del (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNI
 RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQAAYKLTETEEALDVSDH
 FPVEFKLQSSRAFTNSK

SEQ ID NO: 12

ДНКказа1L3, S293_S305del (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWGLENFIFMGDFNAGCSYVRPSQWKNI
 RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQAAYKLTETEEALDVSDH
 FPVEFKLQSSRAFTNSK

SEQ ID NO: 13

ДНКказа1L3, C68A (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 APILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPF
 VVWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWK
 NIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVS
 DHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSIVTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 14

ДНКказа1L3, F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
 CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
 VWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNI

RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDH
YPVEVMLK

SEQ ID NO: 15

ДНКза1L3, S283_S305del (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
CPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFV
VWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNI
RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDH
FPVEFKLQ

SEQ ID NO: 16

ДНКза1L3, R285_S305del (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLSIHSALAMRICSFNRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRI
CPILMEKLNREKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDE
LVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYD
RIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHFPVEFKLQSS

ДНКза1L3, слитая с альбумином, и варианты

SEQ ID NO: 17

Альбумин - вариант ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКза1L3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICEN
QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKGKLVAAASQAALGLMRICSFNRSFGESKQEDKNAMD
VIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVK
RSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKA
NFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPK
NSVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 18

Альбумин - вариант ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКза1L3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICEN
QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKGKLVAAASQAALGLGGGSMRICSFNRSFGESKQEDK
NAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEK
LVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHR
WKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSS
VVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 19

Альбумин - вариант ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКза1L3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICEN
QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKGKLVAAASQAALGLGGGSGGSGGSGGSMRICSFNV
RSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNRGITYNYVISSRLGRNTYK
EQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDEL
VEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDR
IVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 20

Вариант ДНКза1L3 - Альбумин - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКза1L3):

MRICSFNVSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNY
VISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHT
TPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIIRLTDPRFVWLIGDQEDTT
VKKSTNCAVDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHYPVEVMLKGGGGSDAHKS
EVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDK
LCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLY
EIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGGE
RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLL
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCFEEGKLLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 21

Вариант ДНКза1L3 - Альбумин - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКза1L3):

MRICSFNVSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNY
VISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHT
TPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIIRLTDPRFVWLIGDQEDTT
VKKSTNCAVDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHYPVEVMLKGGGGSGGGGS
GGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDN
EETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
QDSISSKLLKECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKLLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 22

Альбумин - ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, ДНКза1L3):

DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
QDSISSKLLKECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKLLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGSMRICSFNV
RSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYK
EQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDEL
VEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIIRLTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAVDR
IVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTSKRS

SEQ ID NO: 23

Альбумин - ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, ДНКза1L3):

DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
QDSISSKLLKECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFN
ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
VTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKLLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPMERICSFNVSF
GESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQ
YAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVE
VYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIIRLTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAVDRIV
LRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTREEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTSKRS

SEQ ID NO: 24

Альбумин - ДНКза1L3 - слитый белок. (Альбумин, ДНКза1L3):

DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK

SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVLVPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
 QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYFYAR
 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFN
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
 QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLAEAAAKEAAAKAMRICSFNRSF
 GESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITINYVISSRLGRNTYKEQ
 YAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVE
 VYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIV
 LRGQEI VSSVVPKSN SVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS
 SEQ ID NO: 25

Альбумин - вариант ДНКазалL3 - слитый белок. (Альбумин, варианты ДНКазалL3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVLVPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
 QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYFYAR
 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFN
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
 QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLSGSGSSMRICSFNRSFSGESKQED
 KNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITINYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKE
 KLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKH
 RWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVS
 SVVPKSN SVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQ

SEQ ID NO: 26

Альбумин - вариант ДНКазалL3 - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКазалL3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVLVPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
 QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYFYAR
 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFN
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
 QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLSGSGSGSGSGSGSGSSMRICSFNV
 RSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGITINYVISSRLGRNTYK
 EQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDEL
 VEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDR
 IVLRGQEI VSSVVPKSN SVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQ

SEQ ID NO: 27

Альбумин - вариант ДНКазалL3 - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКазалL3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVLVPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
 QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYFYAR
 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFN
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
 QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG
 GSGSGSSMRICSFNRSFSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGI
 TINYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVWFQSPHTAVKDFVI
 IPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQ
 EDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSN SVDFDQKAYKLT EEEALDVSDHFPVEFKLQ

SEQ ID NO: 28

Альбумин - вариант ДНКазалL3 - Альбумин - слитый белок. (Альбумин, вариант ДНКазалL3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRVLVPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK

CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
 QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQ
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKE
 QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
 GSGGSGSSMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRSRRGI
 TYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVI
 IPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIPLRTPRFVWLIGDQ
 EDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVSDFHPVEFKLQSSGSGG
 SGGSGGSGGSGGSGGSGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVN
 EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNP
 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
 KLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDV
 CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP
 QNLKQNCLEFQELGEYKFQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY
 LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 29

Альбумин - изоформа 2 ДНКаза1L3 - слитый белок. (Альбумин, изоформа 2 ДНКаза1L3):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNP
 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
 KLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDV
 CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP
 QNLKQNCLEFQELGEYKFQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY
 LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
 LYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVY
 TDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIPLRTPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRG
 QEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVSDFHPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT
 KSKRS

SEQ ID NO: 30

Альбумин - вариант изоформы 2 ДНКаза1L3 - слитый белок. (Альбумин, ДНКаза1L3 изоформа 2):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK
 SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNP
 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
 KLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDV
 CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP
 QNLKQNCLEFQELGEYKFQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY
 LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGSGG
 SGGSGGSGGSGGSGGSGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVN
 EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNP
 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
 KLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
 GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDV
 CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP
 QNLKQNCLEFQELGEYKFQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY
 LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ
 IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
 LYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEVY
 TDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIPLRTPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRG
 QEIIVSSVVPKSNVDFDFQKAYKLTETEEALDVSDFHPVEFKLQ

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЛИНКЕРА

SEQ ID NO: 31

GGGGS

SEQ ID NO: 32

GGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 33

APAPAPAPAPAP

SEQ ID NO: 34

AЕАААКЕАААКА

SEQ ID NO: 35

SGGSGSS

SEQ ID NO: 36

SGGSGGSGGSGGSGSS

Сигнальный пептид ДНКазы1L3 человека (Q13609):
MSRELAPLLLLLLSIHSALA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант ДНКазы1-подобного белка 3 (D1L3), где вариант D1L3 представляет собой слитый белок, который содержит:

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична зрелому ферменту, определенному аминокислотами 21-282 SEQ ID NO: 4;

аминокислотную последовательность альбумина на N-концевой стороне зрелого фермента, где указанный альбумин имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 39; и

линкерную аминокислотную последовательность между аминокислотной последовательностью альбумина и аминокислотной последовательностью зрелого фермента, где указанная линкерная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 15 аминокислот и состоит из остатков серина и глицина,

где вариант D1L3 имеет делецию по меньшей мере 5 аминокислот C-концевого основного домена, причем C-концевой основной домен определяется 23 C-концевыми аминокислотами SEQ ID NO: 4.

2. Вариант D1L3 по п.1, где вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична зрелому ферменту, определенному SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

3. Вариант D1L3 по п.1, где D1L3 имеет делецию по меньшей мере 10 аминокислот или по меньшей мере 15 аминокислот C-концевого основного домена или делецию всего C-концевого основного домена.

4. Вариант D1L3 по любому из пп.1-3, где D1L3 имеет аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 101 SEQ ID NO: 4, необязательно, где D1L3 имеет аминокислотную замену, которая представляет собой Q101R.

5. Вариант D1L3 по п.1, где линкер представляет собой гибкий линкер, жесткий линкер или содержит сайт расщепления протеазой, необязательно, где линкер имеет по меньшей мере 10 аминокислот или по меньшей мере 15 аминокислот, необязательно, где линкер имеет от 15 до 35 аминокислот.

6. Вариант D1L3 по п.1, где вариант содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 8-30, в каждом случае необязательно имеющую от одной до двадцати аминокислотных модификаций, независимо выбранных из вставок, делеций или замен, необязательно, где вариант имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

7. Вариант D1L3 по любому из пп.1-6, содержащий одну или более замен структурных блоков из D1 и/или одну или более делеций или замен остатков цистеина по сравнению с ферментом SEQ ID NO: 4, необязательно, где заменена аминокислота, соответствующая C68 в SEQ ID NO: 4, необязательно, где аминокислота, соответствующая C68 в SEQ ID NO: 4, заменена аминокислотой, выбранной из Ala, Ser и Gly, необязательно, где вариант содержит замену N64_I70delinsHLTAVGK, которая необязательно модифицирована одной, двумя или тремя аминокислотными заменами, делециями или вставками, при условии, что замена структурного блока не модифицирована для включения остатка цистеина.

8. Вариант D1L3 по п.1, содержащий конъюгацию ПЭГ с аминокислотой, соответствующей C68 и/или C194.

9. Вариант D1L3 по п.1, имеющий одну или более замен остатков аргинина и лизина, которые присутствуют в SEQ ID NO: 4 и/или SEQ ID NO: 5, где замена делает вариант D1L3 менее чувствительным к протеолизу плазмином, тромбином и/или трипсином по сравнению с белком SEQ ID NO: 4 или белком SEQ ID NO: 5,

необязательно, где одна или более замен аргинина и лизина соответствуют следующему(им) положению(ям) SEQ ID NO: 4: K180, K200, K259 и R285;

необязательно, где замена аргинина или лизина выбрана из одного или более из K180A, K200A, K259A и R285A в отношении SEQ ID NO: 4;

необязательно, где вариант содержит замену, выбранную из K180_A181delinsGL, P198_A201delinsRPSQ и K259A в отношении SEQ ID NO: 4,

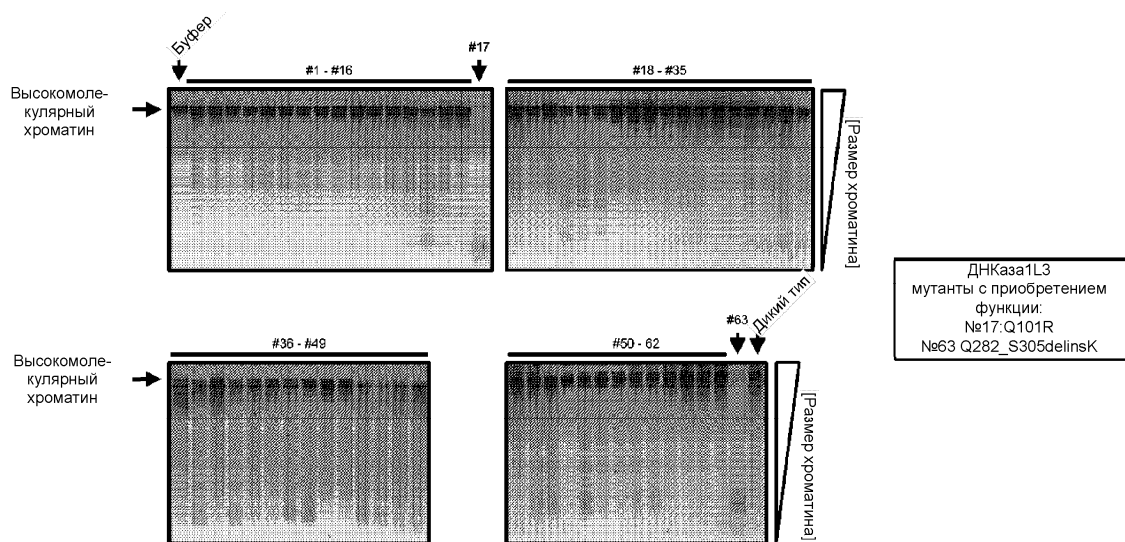
где вариант содержит одну или более мутаций парного основного остатка, причем парный основной остаток соответствует положению, выбранному из K50/R51, R80/R81, K114/R115, K199/K200, K226/K227, K291/K292, R297/K298/K299 и K303/R304 из SEQ ID NO: 4;

необязательно, где одна или более мутаций парного основного остатка включают аминокислотную замену, выбранную из R114T, R114A, R114D, R114Q, K227S и K227E в отношении SEQ ID NO: 4, необязательно, где одна или более мутаций парного основного остатка включают аминокислотную замену, выбранную из R51K, R81K, R115K и R304K в отношении SEQ ID NO: 4.

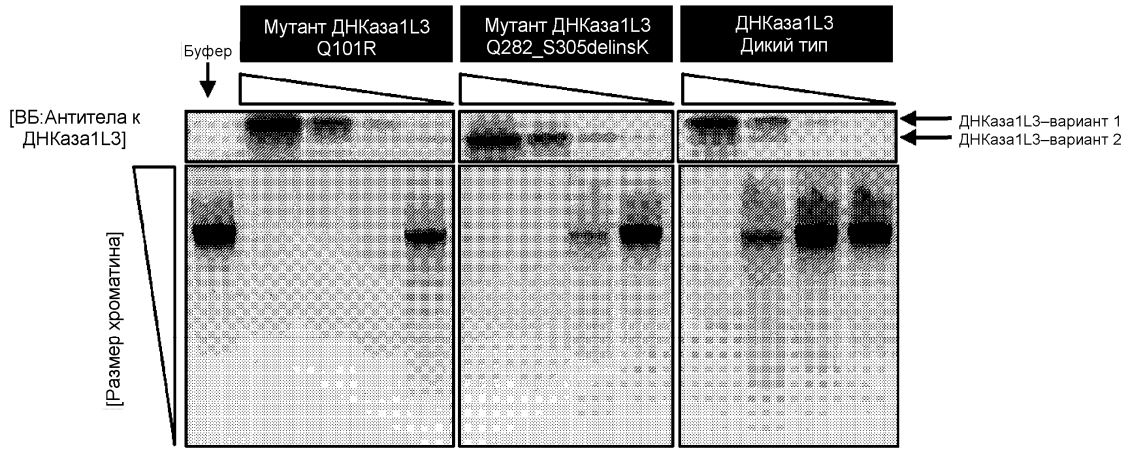
10. Вариант D1L3 по п.6, где линкер расщепляется протеазой системы коагуляции, необязательно, где линкер расщепляется фактором XII или протеазой нейтрофилов.

11. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариант D1L3 по любому из пп.1-10.

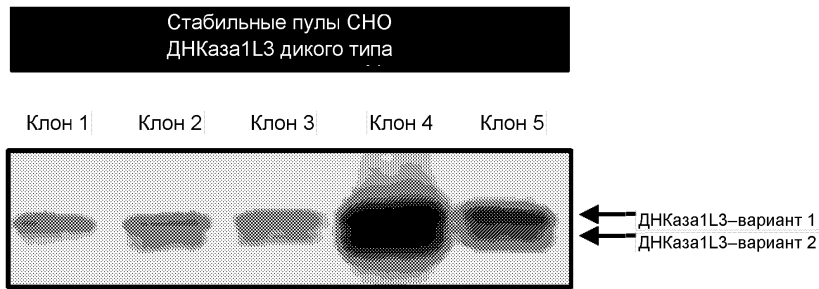
12. Выделенный полинуклеотид по п.11, где полинуклеотид представляет собой мРНК или ДНК.
13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.11 или 12.
14. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.
15. Клетка-хозяин, модифицированная для экспрессии варианта D1L3 по любому из пп.1-10.
16. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант D1L3 по любому из пп.1-10, полинуклеотид по п.11 или 12 или вектор по п.13 и фармацевтически приемлемый носитель.
17. Фармацевтическая композиция по п.16, составленная для местного, парентерального или ингаляционного введения, необязательно для внутрикожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутривенного, подкожного, внутриартериального, перорального, сублингвального, ингаляционного или трансдермального введения.
18. Способ лечения субъекта, нуждающегося в деградации внеклеточной ДНК, деградации внеклеточного хроматина, деградации внеклеточной ловушки (ЕТ) и/или деградации внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET), причем способ включает введение терапевтически эффективного количества композиции по п.16 или 17.
19. Способ по п.18, где:
- у субъекта имеется мутация с потерей функции в гене D1L3; и/или
 - субъект имеет патологическое состояние, выбранное из хронической нейтрофилии, агрегации нейтрофилов или лейкостаза, тромбоза или окклюзии сосудов, ишемически-реперфузионного повреждения, хирургического или травматического повреждения ткани, острой или хронической воспалительной реакции или заболевания, аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, метаболического заболевания, системного воспаления, воспалительного заболевания дыхательных путей, воспалительного заболевания почек, воспалительного заболевания, связанного с трансплантированной тканью, и рака; и/или
 - субъект имеет или подвержен риску возникновения окклюзии NET в системе протоков, при этом патологическое состояние необязательно выбрано из панкреатита, холангита, конъюнктивита, мастита, синдрома сухого глаза, нарушения проходимости семявыносящего протока и заболевания почек; и/или
 - у субъекта есть или существует риск накопления NET на эндотелиальных поверхностях;
 - необязательно, где вариант D1L3 представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность альбумина и который вводят субъекту парентерально, причем введение осуществляется приблизительно раз в неделю.



Фиг. 1

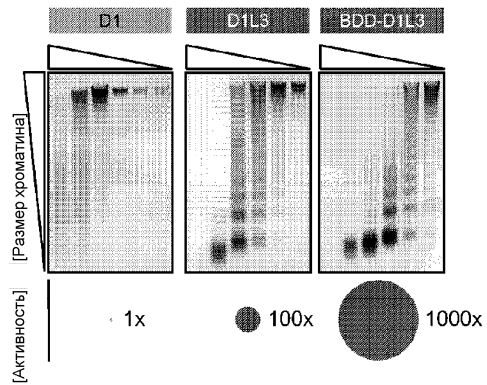


Фиг. 2

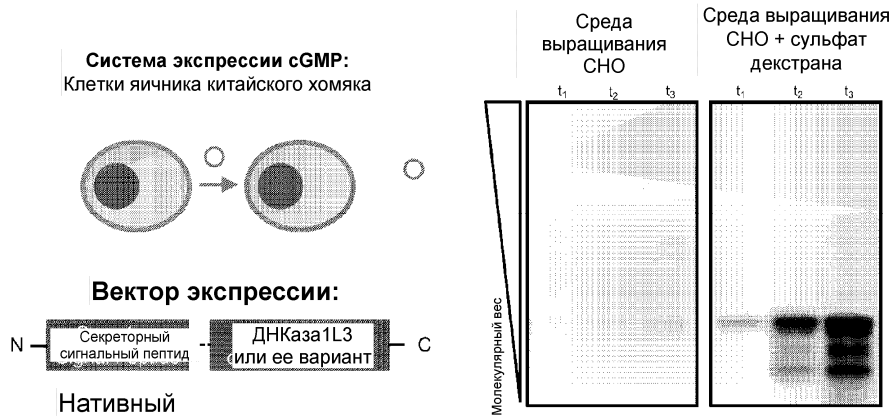


Фиг. 3

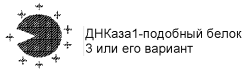
Исходная кДНК	С-концевая аминокислотная последовательность	Относительная величина
Дикий тип ДНКаза1L3	K291_S305del	54%
	K292_S305del	17%
	S293_S305del	29%
Основной домен удален ДНКаза1L3	F275Y F279_K280delinsVM Q282_S305delinsK	100%



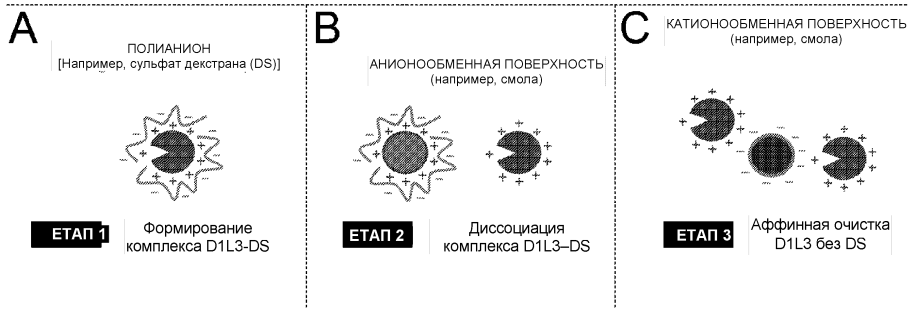
Фиг. 4



Фиг. 5



Захват ДНКазы1L3 полианионами



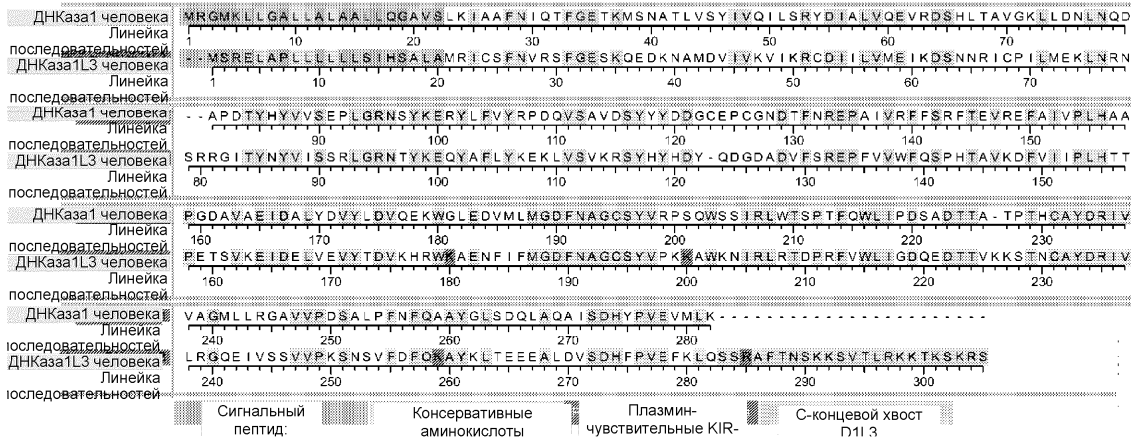
Фиг. 6

Мутация идентифицированных сайтов расщепления трипсином

#	AA в D1L3 (SEQ ID NO: 4)	Аминокислотная замена:	D1 (SEQ ID NO:1) Мутация структурного блока
1	R22	R22A/V/S, R22H/Q/E	M21_R22delinsLK
2	R29	R29A/V/S, R29H/Q/E	V28_S30delinsIQT
3	R51	R51A/V/S, R51H/Q/E	Не применяется (консервативный остаток)
4	R66	R66A/V/S, R66H/Q/E	N64_I70delinsHLTAVGK
5	R80	R80A/V/S, R80H/Q/E	R77_I83delinsQDAPD
6	R81	R81A/V/S, R81H/Q/E	R77_I83delinsQDAPD
7	R95	R95A/V/S, R95H/Q/E	Не применяется (консервативный остаток)
8	K99	R99A/V/S, R99H/Q/E	Не применяется (консервативный остаток)
9	R115	R115A/V/S, R115H/Q/E	V113_R115delinsAVD
10	K147	K147A/V/S, K147H/Q/E	K147_D148delinsRE
11	K163	K163A/V/S, K163H/Q/E	K163A
12	K180	K180A/V/S, K180H/Q/E	K180_A181delinsGL
11	R208	R208A/V/S, R208H/Q/E	R208W
12	R212	R212A/V/S, R212H/Q/E	R212T
13	R235	K235A/V/S, K235H/Q/E	Не применяется (консервативный остаток)
14	R239	K239A/V/S, K239H/Q/E	L238_R239delinsVA
15	K250	K250A/V/S, K250H/Q/E	K250D
16	K262	K262A/V/S, K262H/Q/E	K262G

Выбор аминокислотной замены:
Расстояния Грэнтэма
 Arg (R) / His (H): 29
 Arg (R) / Glu (E): 54
 Arg (R) / Gln (Q): 53
 Lys (K) / His (E): 32
 Lys (K) / Gln (H): 54
 Lys (K): Glu (E): 56

Фиг. 7

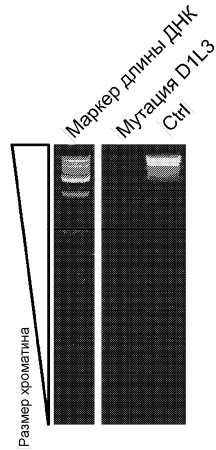


Фиг. 8

Мутация прогнозируемых сайтов расщепления плазмином

#	AA в D1L3 (SEQ ID NO: 4)	Аминокислотная замена:	D1 (SEQ ID NO:1) Мутация структурного блока
1	K180	K180A, K180H/Q/E	K180_A181delinsGL
2	K200	K200A, K200H/Q/E	P198_A201delinsRPSQ
3	K259	K259A, K259H/Q/E	A259A
4	R285	R285A, R285H/Q/E	Не применяется (отсутствует в D1)

Фиг. 9



Описание сайтов расщепления плазмина с мутацией в D1L3:

- Мутация 1: K180_A181delinsGL
- Мутация 2: P198_A201delinsRPSQ
- Мутация 3: K259A
- Мутация 4: R285A

Фиг. 10

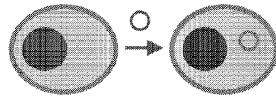
Мутация идентифицированных сайтов расщепления плазмином

#	AA в D1L3 (SEQ ID NO: 4)	Аминокислотная замена:	D1 (SEQ ID NO:1) Мутация структурного блока
1	R22	R22H/Q/E	M21_R22delinsLK
2	R29	R29H/Q/E	V28_S30delinsQT
3	K45	K45H/Q/E	Не применяется (консервативный остаток)
4	K47	K47H/Q/E	K47_K50delinsQILS
5	K74	K74H/Q/E	M72_K74delinsLDN
6	R81	R81H/Q/E	R77_I83delinsQDAPD
7	R92	R92H/Q/E	S91_R92delinsEP
8	K107	K107H/Q/E	K107_L110delinsRPDQ
9	K176	K176H/Q/E	K176_R178delinsQEK
10	R212	R212H/Q/E	R212T
11	K226	R226H/Q/E	V225_S228delinsATP
12	K227	K227H/Q/E	V225_S228delinsATP
13	K250	K250H/Q/E	K250D
14	K259	K259H/Q/E	K259A
15	K262	K262H/Q/E	K262G

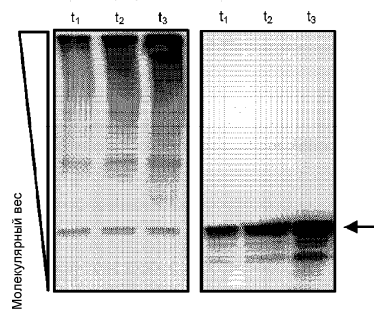
Выбор аминокислотной замены:
Расстояния Грэнтэма
Arg (R) / His (H): 29
Arg (R) / Glu (E): 54
Arg (R) / Gln (Q): 53
Lys (K) / His (E): 32
Lys (K) / Gln (H): 54
Lys (K) / Glu (E): 56

Фиг. 11

А Система экспрессии сGMP:
Клетки яичника китайского хомяка



В Невосстанавливающие условия | Восстанавливающие условия



Фиг. 12

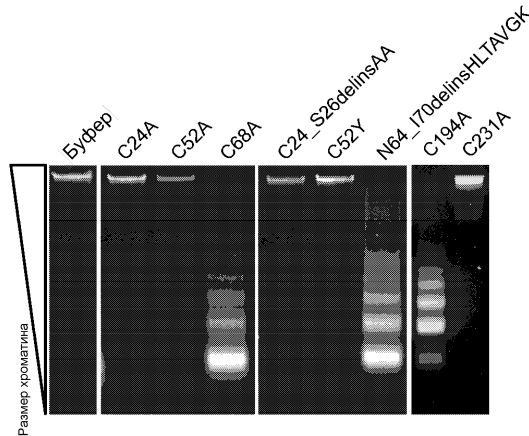


Фиг. 13

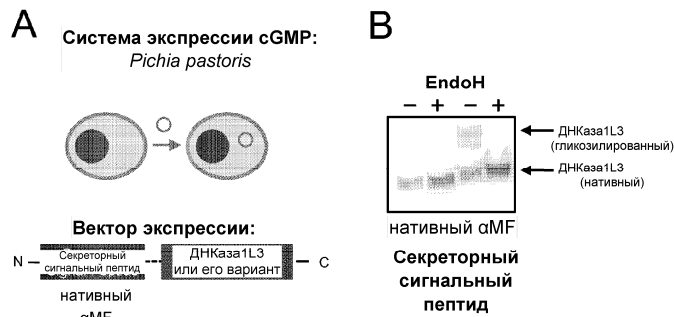
Мутация идентифицированных сайтов расщепления плазмином

#	AA в D1L3 (SEQ ID NO: 4)	Аминокислотная замена:	D1 (SEQ ID NO:1) Мутация структурного блока
1	C24	C24A/S/G	C24_S25delinsAA
2	C52	C52A/S/G	C52Y
3	C68	C68A/S/G	N64_I70delinsHLTAVGK
4	C194	C194A/S/G	Не применяется (консервативный остаток)
5	C231	C231A/S/G	Не применяется (консервативный остаток)

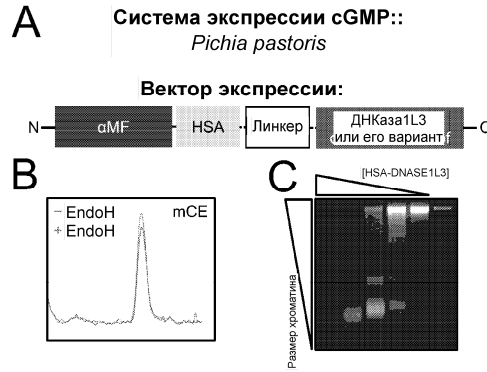
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

SEQ ID NO:	Вектор экспрессии			Уровень экспрессии (отн. единицы)
SEQ ID NO: 14			BDD-D1L3	4.3±0.5
SEQ ID NO: 17	HSA	-	BDD-D1L3	4.3±0.4
SEQ ID NO: 18	HSA	L1	BDD-D1L3	12±1.9
SEQ ID NO: 19	HSA	L2	BDD-D1L3	32±3.2
SEQ ID NO: 20			BDD-D1L3	<1
SEQ ID NO: 21			BDD-D1L3	1.8±0.2
SEQ ID NO: 4			D1L3	1.1±0.1
SEQ ID NO: 22	HSA	L2	D1L3	22±1.3

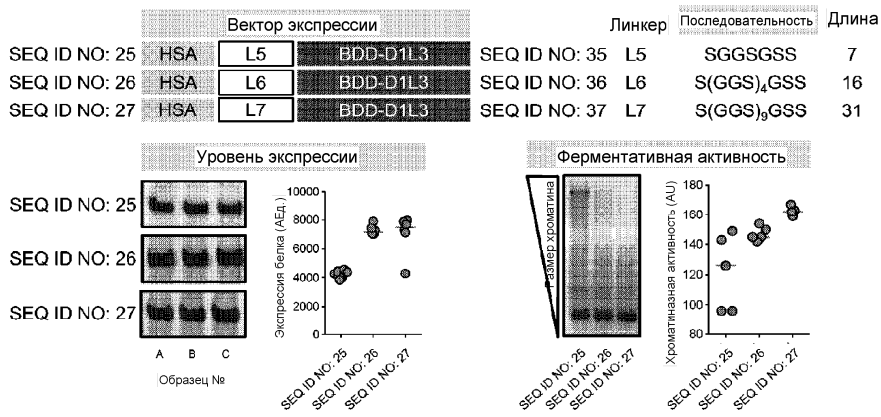
Линкер	Последовательность	Длина	
SEQ ID NO: 31	L1	GGGGS	5 AA
SEQ ID NO: 32	L2	(GGGGS) ₃	15 AA

Фиг. 18

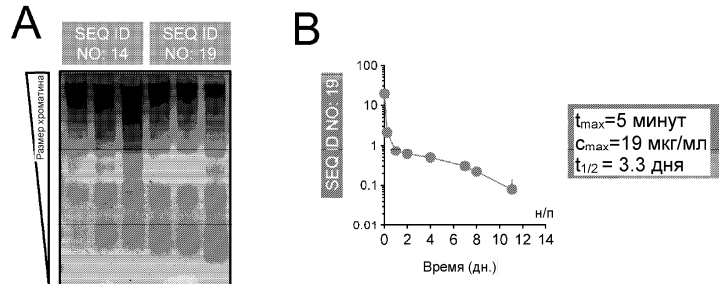
SEQ ID NO:	Вектор экспрессии			Уровень экспрессии (отн. единицы)
SEQ ID NO: 22	HSA	L2	D1L3	17±5.5
SEQ ID NO: 23	HSA	L3	D1L3	22±6.9
SEQ ID NO: 24	HSA	L4	D1L3	11±4.9

Линкер	Последовательность	Длина	Свойство
SEQ ID NO: 32	L2	(GGGGS) ₃	Гибкий
SEQ ID NO: 33	L3	(AP) ₇	Жесткий
SEQ ID NO: 34	L4	A(EAAAK) ₂ A	Жесткий

Фиг. 19



Фиг. 20

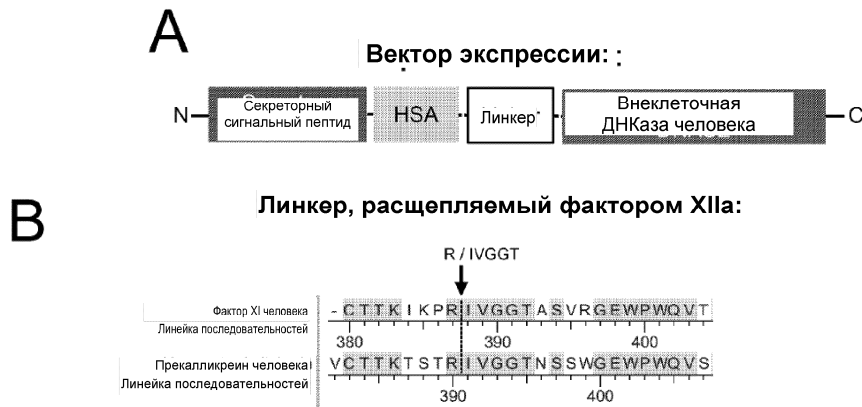


Фиг. 21

SEQ ID NO:	Вектор экспрессии	Уровень экспрессии (отн. единицы)
SEQ ID NO: 27	HSA - L7 - BDD-D1L3	32±5.9
SEQ ID NO: 28	HSA - L7 - BDD-D1L3 - L8 - HSA	30±8.3

SEQ ID NO:	Линкер	Последовательность	Длина
SEQ ID NO: 37	L7	S(GGS) ₉ GSS	31
SEQ ID NO: 38	L8	(GGS) ₉ GS	29

Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24