(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090525 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.05

(22) Дата подачи заявки
2018.08.20

(51) Int. Cl. ***C12N 9/22*** (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДНКазы И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ

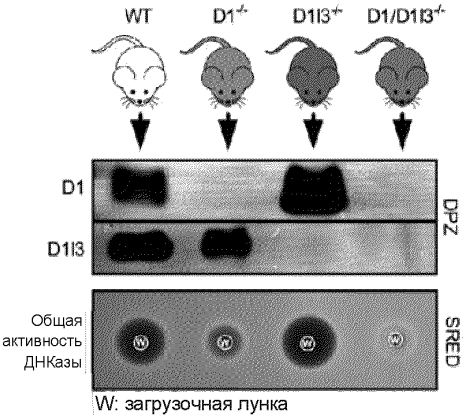
(31) **62/547,220; 62/611,166**
(32) **2017.08.18; 2017.12.28**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/047084**
(87) **WO 2019/036719 2019.02.21**
(88) **2019.03.28**

(71) Заявитель:
НЬЮТРОЛИС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фукс Тобиас А., Хименес-Алькасар Мигель, Гебель Джозефина (ранее Биттерлинг Джозефина), Энглерт Ханна (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к сконструированным белкам ДНКаз (в том числе ДНКаза1-подобному ферменту 3 и ДНКазе1), которые используются для лечения состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ). В некоторых аспектах изобретение относится к композициям и способам для профилактики или лечения окклюзии сосудов с участием НВЛ. Как показано в настоящем изобретении, НВЛ участвуют в неканоническом механизме окклюзии сосудов, который не зависит от фибрина или тромбоцитов.



202090525 A1

202090525 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561910EA/032

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДНКАЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ

ПРИОРИТЕТЫ

По этой заявке испрашивается приоритет заявок на патент США № 62/611166, поданной 28 декабря 2017 г., и 62/547220, поданной 18 августа 2017 г., каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылок.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Воспаление представляет собой необходимый ответ хозяина для борьбы с проникающих микробов и заживления поврежденных тканей. Неконтролируемое и персистирующее воспаление вызывает повреждение тканей при большом количестве воспалительных заболеваний. Нейтрофилы при остром воспалении являются доминирующими лейкоцитами. Во время инфекции нейтрофилы генерируют нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ), решетки филаментов ДНК, декорированных токсичными гистонами и ферментами, которые иммобилизируют и нейтрализуют бактерии. Востребованность НВЛ в защите хозяина иллюстрируется фактом, что у нескольких патогенных бактерий внеклеточные ДНКазы служат в качестве факторов вирулентности. Тем не менее, аномальным образом высвобожденные НВЛ могут нанести вред клеткам-хозяевам ввиду их цитотоксической, противовоспалительной и протромботической активности. Следует отметить, что НВЛ часто связаны с воспалительным или ишемическим повреждением органа, а терапевтическая инфузия ДНКаз ограничивает повреждение хозяина в различных животных моделях.

Образование внеклеточной ловушки (ВЛ) не ограничиваются нейтрофилами, поскольку другие лейкоциты, а именно моноциты, макрофаги, базофилы, эозинофилы и тучные клетки, также высвобождают ВЛ. Кроме того, раковые клетки, в том числе клетки острого промиелоцитарного лейкоза (APL), и поврежденные эндотелиальные клетки могут создавать филаменты ДНК, которые имеют подобные ВЛ свойства.

То, каким образом хозяин разрушает НВЛ in vivo для ограничения повреждения ткани во время эпизодов воспаления, изучено плохо. Было показано, что ДНКаза1 (D1) в сыворотке расщепляет остов ДНК НВЛ in vitro. В кровообращении были выявлены другие внеклеточные ДНКазы, в том числе ДНКаза1-подобный фермент 3 (D1L3), которые могут расщеплять хроматин, связанный с внеклеточными микрочастицами.

D1 и D1L3 образуют, вместе с ДНКаза1-подобным ферментом 1 (D1L1) и ДНКаза1-подобным ферментом 2 (D1L2), семейство белков ДНКазы1, группу гомологичных секретируемых ферментов-ДНКаз, которые экспрессируются у людей и обеспечивают потенциальные лекарственные средства для связанных с НВЛ болезнями. Однако физические, ферментативные и фармакокинетические свойства этих ферментов являются не идеальными для терапии.

Настоящее изобретение относится к сконструированным ДНКазам, в том числе

ДНКаза1-подобному ферменту 3 и ДНКазе1, для терапии, в том числе для профилактики или лечения окклюзии сосудов, которые могут возникнуть в результате высвобождения НВЛ во время острых воспалительных эпизодов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к сконструированным белкам ДНКаз (в том числе ДНКаза1-подобному ферменту 3 и ДНКазе1), которые используются для лечения состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ). В некоторых аспектах, изобретение относится к композициям и способам для профилактики или лечения окклюзии сосудов с участием НВЛ. Как показано в настоящем изобретении, НВЛ участвуют в неканоническом механизме окклюзии сосудов, который не зависит от фибрина и тромбоцитов.

В некоторых аспектах изобретение относится к вариантам ДНКаза1-подобного фермента 3 (D1L3), сконструированным, чтобы иметь более подходящие для терапии физические, фармакодинамические и/или ферментативные свойства, например, для уменьшения или профилактики накопления НВЛ у субъекта. В отдельных вариантах осуществления фермент D1L3 имеет преимущества при производстве, обеспечивая продуцирование рекомбинантного фермента, подходящего для применения в терапии. В различных вариантах осуществления изобретение относится к рекомбинантному варианту D1L3, содержащему одно или более изменений аминокислотного состава, приводящих к одному или более гликозилированиям, инактивации сигнала внутриядерной локализации и/или делеции всего или части С-концевого хвоста.

В различных вариантах осуществления вариант белка D1L3 имеет повышенную по сравнению с белком D1L3 дикого типа стабильность белка, повышенную устойчивость к ингибированию протеазами, повышенную биологическую доступность и по существу такую же или более высокую разрушающую ДНК и/или хроматин и/или НВЛ активность (in vitro или in vivo). В различных вариантах осуществления вариант D1L3 имеет одно или более из следующих свойств по сравнению с D1L3 дикого типа (например, SEQ ID NO:2): одинаковую или по существу одинаковую (или более высокую) активность разрушения депротеинизированной ДНК («оголенной» ДНК), одинаковую или по существу одинаковую (или более высокую) активность разрушения хромосомной ДНК (хроматина), устойчивость к протеазам, увеличенный период полувыведения из кровотока и более высокие уровни продуцирования с помощью систем экспрессии in vitro (например, клеток яичника китайского хомяка и/или *Pichia pastoris*).

В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит одну или множество замен блоков из ДНКазы1 человека (SEQ ID NO:1), описанных в настоящем изобретении в качестве замен структурных блоков.

В некоторых аспектах, изобретение относится к вариантам ДНКазы1 (D1), сконструированным, чтобы иметь более подходящие для терапии физические, фармакодинамические и/или ферментативные свойства, например, для уменьшения или профилактики накопления НВЛ у субъекта. В отдельных вариантах осуществления

фермент D1 имеет преимущества при производстве, обеспечивая продуцирование рекомбинантного фермента, подходящего для применения в терапии. В различных вариантах осуществления сконструированный вариант D1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична зрелому ферменту с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, с одной или более аминокислотными заменами, присоединениями (в том числе вставками) или делециями, приводящими к одному или более из мутировавшего сайта связывания ДНК, мутировавшего сайта связывания хроматина, мутировавшего сайта связывания актина, мутировавшего сайта гликозилирования, присоединения сигнала внутриядерной локализации (например, имеющим сходство или идентичность с NLS1 или NLS2 D1L3), и/или С-концевому домену, схожему или идентичному С-концевому хвосту D1L3.

В различных вариантах осуществления вариант D1 конструируют таким образом, чтобы иметь одну или более из следующих характеристик относительно фермента дикого типа: одинаковую или более высокую активность разрушения депротеинизированной ДНК («оголенной» ДНК), более высокую активность разрушения хромосомной ДНК (хроматина), схожую или улучшенную устойчивость к протеазам, устойчивость к актину, схожее или улучшенное проникновение из крови в мочу и/или желчь и более высокие уровни продуцирования в системах экспрессии in vitro (например, клетках яичника китайского хомяка и/или *Pichia pastoris*).

Варианты D1, описанные в настоящем изобретении, могут иметь комбинацию точечных мутаций, в том числе присоединение катионных остатков, и/или могут содержать одну или более замен блоков из D1L3 (SEQ ID NO:2). Подобные замены блоков описаны в настоящем изобретении и названы «заменами структурных блоков».

В некоторых аспектах изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим варианты D1L3 и/или D1 или полинуклеотиды или векторы, кодирующие эти варианты, и фармацевтически приемлемый носитель. В различных вариантах осуществления композицию составляют для парентерального введения или введения ингаляционным способом. В отдельных вариантах осуществления композицию составляют для внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутрисуставного, внутримышечного, местного или подкожного введения. В отдельных вариантах осуществления композиция содержит и D1L3, и D1, каждый из которых необязательно представляет собой сконструированные варианты, описанные в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления композиция содержит химерный белок, содержащий последовательности блоков из как D1, так и D1L3. Приводимые в качестве примера замены блоков между D1 и D1L3 показаны на ФИГ. 31.

В дополнительных аспектах изобретение относится к способу конструирования фермента ДНКазы путем продуцирования химерных последовательностей. Например, в этих аспектах способ включает обеспечивание выравнивания белок-белок донорных и реципиентных ферментов ДНКаз; определения вариабельных аминокислотных последовательностей для переноса («структурный блок»). Вариабельная аминокислота или

аминокислоты фланкируют одной или более консервативными аминокислотами в донорных и реципиентных ферментах ДНКазы (против хода транскрипции и по ходу транскрипции структурного блока). Эти структурные блоки могут быть обменены между реципиентными и донорными белками. Химерный фермент затем рекомбинантно продуцируют.

В дополнительных аспектах изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции для снижения или профилактики накопления нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). В этих вариантах осуществления в изобретении используют генетически модифицированную мышь, дефицитную по активности D1 и D1L3, и гетерологичную экспрессию полинуклеотида G-CSF (например, в клетках печени) или индуцируют устойчивую эндогенную экспрессию G-CSF (например, посредством повторного введения микробных соединений). У этой мышиной модели накапливаются НВЛ и быстро развиваются связанные с НВЛ окклюзии сосудов. В этих вариантах осуществления изобретение включает введение потенциального ингибитора НВЛ или потенциального фермента ДНКазы (в том числе варианта D1L3 или D1 в соответствии с этим раскрытием) генетически модифицированной мыши, и выбор ингибитора НВЛ или фермента ДНКазы, что снижает накопление НВЛ. Выбранный ингибитор или фермент составляют в виде лекарственной форме для введения пациенту-человеку.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в разрушении нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ). В соответствии с этим раскрытием способ включает введение терапевтически эффективного количества D1L3 и/или D1 и/или их вариантов. Вариант D1L3 или D1 может быть введен в виде фармацевтических композиций, содержащих рекомбинантный белок, или в некоторых вариантах осуществления кодирует ДНК или РНК, или в отдельных вариантах осуществления векторы, содержащие то же самое.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению заболеваний или состояний, характеризующихся присутствием или накоплением НВЛ. Подобные заболевания или состояния включают, но без ограничения этим, заболевания, связанные с хронической нейтрофилией (например, ростом количества нейтрофилов), агрегацией нейтрофилов и лейкостазом, тромбозом и окклюзией сосудов (например, серповидно-клеточной болезнью), ишемически-реперфузионным повреждением (например, заворотом средней кишки, перекрутом семенного канатика, ишемией-реперфузией конечностей, ишемией-реперфузией жизненно-важных органов, трансплантацией органов), хирургическим и травматическим повреждением тканей, острой или хронической воспалительной реакцией или болезнью, аутоимунным заболеванием (например, системной красной волчанкой (СКВ), волчаночным нефритом, ревматиодным артритом, васкулитом, системным склерозом), кардиоваскулярной болезнью (например, инфарктом миокарда, инсультом, атеросклерозом, венозным тромбоэмболизмом, в том числе тромболитической терапией), метаболическим заболеванием (например, диабетом),

системным воспалением (например, синдромом системной воспалительной реакции (SIRS), сепсисом, септическим шоком, рассеянной внутрисосудистой коагуляцией (DIC) и тромботической микроангиопатией (TMA)), воспалительными заболеваниями дыхательных путей (например, муковисцидозом, хронической обструктивной болезнью легких (COPD), острым повреждением легких (ALI), вызванным курением повреждением легких, синдромом острого посттрансфузионного повреждения легких (TRALI), острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) и астмой, ателектазом, бронхитом, эмпиемой), воспалительными заболеваниями почек (острыми и хроническими заболеваниями почек, в том числе острой почечной недостаточностью (AKI) и хронической болезнью почек (CKD), воспалительными заболеваниями, связанными с трансплантированной тканью (например, реакцией трансплантат против хозяина) и раком (например, лейкемией, метастазированием опухоли и солидными опухолями).

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску окклюзии протоков в системе протоков. Не имеющие ограничительного характера примеры системы протоков или органа или ткани, содержащих систему протоков, включают желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень. Таким образом, настоящее изобретение является применимым для лечения субъекта, который имеет панкреатит, холангит, конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек.

В других вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску накапливания НВЛ на эндотелиальных поверхностях (например, спайки, вызванные хирургическим вмешательством), коже (например, раны/рубцы, язвы) или в синовиальных соединениях (например, подагра, артрит). В качестве примера, НВЛ могут способствовать образованию спаек, вызванных хирургическим вмешательством, например, после инвазивной медицинской процедуры. Настоящее изобретение может быть введено во время хирургического вмешательства для предотвращения или ингибирования образования спаек, вызванных хирургическим вмешательством. В некоторых случаях D1, D1L3 (в том числе их варианты) или комбинация D1 и D1L3 (или их вариантов), как описано в данном документе, могут вводиться местно в кожу для предотвращения или лечения ран и/или рубцов. В иных случаях, D1, D1L3 или их варианты или комбинации, как описано в данном документе, могут вводиться в синовиальные соединения для предотвращения или лечения подагры и артрита.

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску окклюзии сосудов, содержащих НВЛ.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению заболеваний, которые поддаются лечению с помощью фермента ДНКазы, в том числе D1 и

стрептодорназы. Подобные заболевания или состояния включают тромбоз, инсульт, сепсис, повреждение легких, атеросклероз, вирусную инфекцию, серповидно-клеточную болезнь, инфаркт миокарда, воспаление среднего уха, заживление ран, поражение печени, эндокардит, инфекцию печени, панкреатит, первичную дисфункцию трансплантата, ишемию/реперфузию конечностей, поражение почек, коагуляцию крови, индуцированное квасцами воспаление, гепаторенальное повреждение, плевральные экссудации, гемоторакс, внутрипеченочные тромбы, постпневматическую анемию, язвы, отоларингологические состояния, инфекции ротовой полости, незначительные повреждения, синусит, послеоперационные ринопластики, бесплодие, мочевой катетер, обработку раны, тест кожной реакции, пневмококковый менингит, подагру, ножные язвы, муковисцидоз, синдром Картагенера, астму, лобарный ателектаз, хронический бронхит, бронхоэктаз, волчанку, первичную цилиарную дискинезию, бронхиолит, эмпиему, плевральные инфекции, рак, синдром сухого глаза, инфекции нижних дыхательных путей, хронические гематомы, болезнь Альцгеймера и обструктивное заболевание легких.

В еще одном отличном варианте осуществления изобретение относится к способу рекомбинантного продуцирования D1 или D1L3 или их вариантов с применением системы экспрессии, происходящей не от млекопитающих, например, от *Pichia pastoris*. В отдельных вариантах осуществления *Pichia pastoris* кодирует фермент ДНКазу с нативным сигнальным пептидом, делая возможной секрецию из клеток-хозяев.

Другие объекты, варианты осуществления и преимущества настоящего изобретения очевидны из подробного описания ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1A - ФИГ. 1F иллюстрируют, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 в кровообращении разрушают НВЛ in vitro и исследуют ДНК-разрушающую активность сыворотки от мышей дикого типа, ДНКаза1-/- (D1-/-), ДНКаза1l3-/- (D1L3-/-), ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- (D1/D1L3-/-) мышей. ФИГ. 1A представляет детектирование активности ДНКазы1 (D1), ДНКазы1l3 (D1L3) и общей ДНКазы с помощью зимографических анализов DPZ и SRED. ФИГ. 1B представляет изображения, а ФИГ. 1C представляет количественное определение ДНК-окрашивания НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с сывороткой из указанных генотипов (N=6). Масштабная линейка: 50 мкм. ФИГ. 1C иллюстрирует анализ DPZ и SRED сыворотки от D1/D1L3-/- мышей, которые стабильно экспрессируют плазмиду с ДНКазой1 (D1), ДНКазой1l3 (D1L3) или контрольную плазмиду (Ктрл). ФИГ. 1E иллюстрирует изображения, а ФИГ. 1F иллюстрирует количественное определение ДНК-окрашивания НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с буфером или сывороткой от D1/D1L3-/- мышей, которые экспрессируют D1, D1L3 или Ктрл (N=5). Масштабная линейка: 50 мкм. Изображения являются репрезентативными для двух или более независимых экспериментов. Статистические данные: (ФИГ. 1C и ФИГ. 1F) однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони; § $P < 0,001$ по сравнению со всеми другими группами.

ФИГ. 2A-ФИГ. 2I иллюстрируют, что для того, чтобы переносить хроническую

нейтрофилию, требуется ДНКаза1 или ДНКаза1l3. Хроническую нейтрофилию индуцировали путем инъекции плазмиды экспрессии G-CSF (CSF3). Контроли получали пустую плазмиду (Ктрл). ФИГ. 2A иллюстрирует количество нейтрофилов в крови мышей дикого типа и контролей спустя 2 недели (N=3-6). ФИГ. 2B иллюстрирует НВЛ-подобные структуры (стрелка) при ДНК-окрашивании мазков крови от мышей дикого типа спустя 1 неделю (N=3). Масштабная линейка: 20 мкм. ФИГ. 2C иллюстрирует выживаемость мышей дикого типа (N=7), ДНКаза1-/- (D1-/-, N=6), ДНКаза1l3-/- (D1L3-/-, N=6), ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-, N=6) и контролей (Ктрл, N=4). ФИГ. 2D иллюстрирует выживаемость D1/D1L3-/- мышей, которые коэкспрессируют CSF3 с ДНКазой1 (CSF3/D1, N=5), ДНКазой1l3 (CSF3/D1L3, N=6) и контролей (CSF3/Ктрл, N=4). ФИГ. 2E-2I демонстрируют смертность при хронической нейтрофилии (N= 4). ФИГ. 2E иллюстрирует изменение периферической температуры тела. ФИГ. 2F представляет фотографии плазмы и мочи. ФИГ. 2G представляет концентрацию гемоглобина в крови. ФИГ. 2H представляет изображения мазков крови. Стрелки указывают на шизоциты. Масштабная линейка: 20 мкм. ФИГ. 2I иллюстрирует концентрация ЛДГ в плазме. UT: не получавшие лечение мыши (N=5-6). Изображения являются репрезентативными для трех или более мышей. Статистические данные: (ФИГ. 2A, 2H, 2I) однофакторный и (ФИГ. 2E) двухфакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони (ФИГ. 2B) t-критерий Стьюдента (ФИГ. 2C, 2D), логарифмический ранговый критерий; # $P < 0,01$, § $P < 0,001$ по сравнению со всеми другими группами или исходным уровнем (BL).

ФИГ. 3A-ФИГ. 3G иллюстрируют, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 предотвращают окклюзию сосудов с помощью сгустков НВЛ при хронической нейтрофилии. Гистологический анализ ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-), которые коэкспрессируют CSF3 с ДНКазой1 (CSF3/D1, N=4), ДНКазой1l3 (CSF3/D1L3, N=4) или контрольной плазмидой (CSF3/Ктрл, N=4). ФИГ. 3A представляет окрашивание легких гематоксилином-эозином (H&E). Масштабные линейки: 500 мкм (общий вид), 25 мкм (детально). ФИГ. 3B иллюстрирует количественное определение кровеносных сосудов в легких, окклюзированных гематоксилин-положительными сгустками в поле зрения (FOV). Не получавшие лечение мыши дикого типа (UTWT, N=4), не получавшие лечение D1/D1L3-/- мыши (UT; N=4). ФИГ. 3C иллюстрирует иммуноокрашивание окклюзированных кровеносных сосудов для нейтрофильной маркерной миелопероксидазы (MPO) и хроматина. ФИГ. 3D и 3E демонстрирует иммуноокрашивание для фактора фон Виллебранда (ФФВ), фибрина и ДНК. Были обнаружены три типа сгустков НВЛ (α, ФФВ+/фибрин-; β, ФФВ+/фибрин+; γ, ФФВ-/фибрин-). ФИГ. 3F представляет количественное определение ФФВ и фибрина в НВЛ-сгустках. Данные представлены в виде среднего значения ± СО, n=108. ФИГ. 3G иллюстрирует выживаемость D1/D1L3-/- мышей, которые экспрессируют CSF3, получавших лечение с помощью IgG (N=4), антитромбоцитарного IgG (N=5) и дабигатрана (N=5). Масштабные линейки: 50 мкм. Изображения являются репрезентативными для трех или более мышей. (ФИГ. 3C, 3D, 3E)

пунктирная линия обозначает стенку сосуда. Статистические данные: (ФИГ. 3B) однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони; § $P < 0,001$ по сравнению со всеми другими группами, (ФИГ. 3G) логарифмический ранговый критерий; $P > 0,05$ антитромбоцитарного IgG или дабигатрана по сравнением с IgG.

ФИГ. 4A-ФИГ. 4I иллюстрируют, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 защищают хозяина от повреждения при сепсисе. Мыши дикого типа (N=5) и мыши с комбинированным дефицитом по ДНКазе1 и ДНКазе1l3 (D1/D1L3-/-), которые экспрессируют ДНКазу1 (D1, N=7), ДНКазу1l3 (D1L3, N=8) или контрольную плазмиду (Ктрл, N=11), получают лечение с помощью липополисахарида и убитых нагреванием *E. coli* для индуцирования сепсиса. ФИГ. 4A иллюстрирует время выживаемости мышей с признаками сепсиса. ФИГ. 4B иллюстрирует концентрацию гемоглобина в крови. ФИГ. 4C иллюстрирует фотографии плазмы и мочи. ФИГ. 4D представляет концентрацию ЛДГ в плазме. ФИГ. 4E иллюстрирует количественное определение шизоцитов в крови в поле зрения (FOV). ФИГ. 4F иллюстрирует количественное определение окклюзированных кровеносных сосудов в легких в FOV. ФИГ. 4G иллюстрирует окрашивание легких гематоксилином-эозином (H&E). Указатели стрелок указывают на окклюзированные кровеносные сосуды. Масштабные линейки: 500 мкм. ФИГ. 4H и 4I демонстрирует окрашивание H&E частично и полностью окклюзированного кровеносного сосуда. Стрелки указывают на НВЛ, покрывающие межклеточное пространство. На вставках представлен общий вид. Масштабные линейки: 50 мкм. Статистические данные: (ФИГ. 4A) логарифмический ранговый критерий; # $P < 0,01$ по сравнению со всеми другими группами, (ФИГ. 4B-4F) однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони; § $P < 0,001$, # $P < 0,01$.

ФИГ. 5A-ФИГ. 5E демонстрируют мышиную модель хронической нейтрофилии. Четырехнедельным мышам дикого типа инъецируют плазмиду экспрессии CSF3 (CSF3) или пустую контрольную плазмиду (Ктрл). ФИГ. 5A иллюстрирует уровни G-CSF в плазме (N=3-6). BL: исходный уровень, перед инъецированием; Ктрл: мыши, которые экспрессируют контрольную плазмиду без CSF3 в течение 2 недель (N=4-5). ФИГ. 5B иллюстрирует иммуноокрашивание для нейтрофильной эластазы легких, почек и печени. Масштабные линейки: 200 мкм. ФИГ. 5C иллюстрирует фотографии и массы селезенки (N=5-6). Масштабная линейка: 1 см. ФИГ. 5D иллюстрирует массу тела мышей в указанные моменты времени (N=3-5). ФИГ. 5E иллюстрирует количества нейтрофилов и уровни АлАТ, АсАТ, АМК и креатинина в цельной крови и плазме спустя 2 недели после инъекции. Изображения являются репрезентативными для трех или более мышей. Статистические данные: (ФИГ. 5A, 5C) однофакторный и (ФИГ. 5D) двухфакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони и (ФИГ. 5E) t-критерий Стьюдента; # $P < 0,01$, § $P < 0,001$ по сравнению с (ФИГ. 5A) BL или (ФИГ. 5C) UT.

ФИГ. 6A-ФИГ. 6D демонстрируют, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 предотвращают

образование сгустков НВЛ и повреждение органа в печени и почках при хронической нейтрофилии. Анализ ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-), которые коэкспрессируют CSF3, контрольную плазмиду (CSF3/Ктрл, N=4) с ДНКазой1 (CSF3/D1, N=4) или с ДНКазой1l3 (CSF3/D1L3, N=4). Контроли включают не получавших лечение мышей дикого типа (UTWT, N=4) и не получавших лечение D1/D1L3-/- мышей (UT; N=4). ФИГ. 6A иллюстрирует уровни аланин- и аспартатаминотрансферазы (АлАТ, АсАТ) в плазме. ФИГ. 6B иллюстрирует уровни азота мочевины (АМК) и креатинина в плазме крови. ФИГ. 6C представляет количественное определение внутрисосудистых богатых гематоксилином сгустков в печени на срезе и в почках в поле зрения (FOV). ФИГ. 6D представляет H&E окрашивания печени и почек. Масштабные линейки: 500 мкм (общие виды), 50 мкм (детально). Изображения являются репрезентативными для трех или более мышей. Статистические данные: (ФИГ. 6A, 6B, 6C) однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони; # $P < 0,01$, § $P < 0,001$ по сравнению со всеми другими группами.

ФИГ. 7A-ФИГ. 7C демонстрируют, что гематоксилин-положительные сгустки состоят из НВЛ. Анализ легких от ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-) с хронической нейтрофилией (D1/D1L3-/- + CSF3/Ктрл) показан на ФИГ. 3A-3G. ФИГ. 7A представляет окрашивание с помощью гематоксилина и эозина (H&E), для ДНК и для хроматина последовательных срезов легких. Масштабные линейки: 200 мкм. ФИГ. 7B представляет иммуноокрашивание окклюзированного кровеносного сосуда на хроматин, CRAMP (связанный с кателином антимикробный пептид) и ДНК. Масштабные линейки: 50 мкм. ФИГ. 7C представляет иммуноокрашивание окклюзированного кровеносного сосуда на хроматин, цитруллинированный гистон 3 (citH3) и ДНК. Масштабные линейки: 50 мкм. Изображения являются репрезентативными для трех или более мышей.

ФИГ. 8A и **ФИГ. 8B** демонстрируют, что НВЛ человека образует сгустки in vitro. ФИГ. 8A представляет фотографию сгустка НВЛ (стрелка), полученного с помощью PMA-активированных нейтрофилов человека in vitro. Необработанные нейтрофилы (UT) или нейтрофилы, активированные в присутствии рекомбинантной ДНКазы1 человека (PMA+D1) служат в качестве контролей. Масштабные линейки: 5 мм. ФИГ. 8B представляет окрашивания легких гематоксилином-эозином (H&E) и иммуноокрашивание на хроматин и нейтрофильную маркерную миелопероксидазу (MPO) in vitro полученных сгустков НВЛ. Масштабные линейки: 200 мкм. Изображения являются репрезентативными для трех или более независимых экспериментов.

ФИГ. 9A и **ФИГ. 9B** демонстрируют тот факт, что разрушение НВЛ коррелирует с активностью заболевания при STEC-HUS. ФИГ. 9A иллюстрирует изображения и ФИГ. 9B иллюстрирует количественное определение ДНК-окрашивания НВЛ, полученных in vitro, после инкубирования с буфером, плазмой от нормальных здоровых доноров (N=7) или плазмой, собранной при остром болезненном состоянии (Acute) и при ремиссии (Rem.) 11 пациентов с STEC-HUS. Масштабная линейка: 50 мкм. Статистические данные: однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием

множественного сравнения по методу Бонферрони; § $P < 0,001$ по сравнению со всеми другими группами.

ФИГ. 10 представляет таблицу описаний тканей человека от различных обследованных пациентов, таких как количество пациентов, причина смерти, как указано в отчете о вскрытии (ARDS, острый респираторный дистресс-синдром). Пол и возраст пациента. Тип анализируемой ткани. Ткани анализировали в три этапа: первый, выявление богатых гематоксилином сгустков/агрегатов при окрашивании гематоксилином-эозином; второй, выявление НВЛ в богатых гематоксилином сгустках путем иммуноокрашивания для хроматина и миелопероксидазы (MPO); третий, выявление локализации сгустков НВЛ в пределах структуры легких.

ФИГ. 11A-ФИГ. 11D демонстрируют, что НВЛ человека образует сгустки in situ. Ткань легкого собирают при вскрытии от двух пациентов с сепсисом (пациент №6 и №7 на ФИГ. 10). ФИГ. 11A иллюстрирует H&E окрашивание двух богатых гематоксилином внутрисосудистых сгустков в ткани легкого от пациента №6. ФИГ. 11B иллюстрирует иммуноокрашивание последовательных срезов на хроматин и миелопероксидазу (MPO) левого кровеносного сосуда, показанного на панели A. ФИГ. 11C иллюстрирует H&E окрашивание кровеносного сосуда в ткани легкого от пациента №7, иллюстрирует богатые гематоксилином внутрисосудистые сгустки. ФИГ. 11D иллюстрирует иммуноокрашивание последовательных срезов для хроматина и MPO. Стрелки указывают на сгустки НВЛ. Масштабная линейка: 50 мкм.

ФИГ. 12 иллюстрирует НВЛ-сгустки, которые окклюдируют кровеносные сосуды у мышей с признаками сепсиса. Иммуноокрашивание полностью окклюзированного кровеносного сосуда у мышей ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- с признаками сепсиса для ДНК, хроматина и миелопероксидазы (MPO). Окрашивания ДНК и хроматина НВЛ (стрелки) выглядят тусклее, чем ядерные окрашивания (звездочки) и покрывают межклеточное пространство. Масштабные линейки: 10 мкм.

ФИГ. 13A-ФИГ. 13F иллюстрируют, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 разрушают НВЛ различными способами. ФИГ. 13A представляет ДНК-окрашивание PFA-фиксированных НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с сывороткой от мышей дикого типа, ДНКаза1-/- (D1-/-), ДНКаза1l3-/- (D1L3-/-), ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-). Данные являются репрезентативными для ≥3 независимых экспериментов. Масштабная линейка: 50 мкм. ФИГ. 13B иллюстрирует концентрацию внеклеточных фрагментов ДНК, высвобожденных из PFA-фиксированных НВЛ после инкубирования с сывороткой от мышей дикого типа, D1-/-, D1L3-/- и D1/D1L3-/- мышей. ФИГ. 13C иллюстрирует ДНК-окрашивание нефиксированных НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с носителем, рекомбинантной мышиной ДНКазой1 (rmD1) или рекомбинантной мышиной ДНКазой1l3 (rmD1L3). ФИГ. 13D иллюстрирует концентрацию внеклеточных фрагментов ДНК, высвобожденных из нефиксированных НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с носителем, rmD1 или rmD1L3. ФИГ. 13E иллюстрирует ДНК-окрашивание PFA-фиксированных НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с

носителем, rmD1 или rmD1L3. ФИГ. 13F иллюстрирует концентрацию внеклеточных фрагментов ДНК, высвобожденных из PFA-фиксированных НВЛ, полученных in vitro после инкубирования с носителем, rmD1 или rmD1L3. Статистические данные, полученные с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони; § $P < 0,0001$.

ФИГ. 14A-ФИГ. 14G представляют активность ДНКазы1 и ДНКазы1l3 в кровообращении людей и мышей. ФИГ. 14A-ФИГ. 14E демонстрируют активность ДНКазы в плазме человека и мышиной плазме, количественно определяемую с помощью SRED. ФИГ. 14A иллюстрирует то, что добавление плазмы от нормальных здоровых доноров (НЗД) с поликлональными антителами против ДНКазы1 человека (α-hДНКаза1), но не с IgG, блокирует разрушающую ДНК активность зависимым от концентрации способом (*: $p < 0,05$ по сравнению с IgG). ФИГ. 14B иллюстрирует то, что плазма, добавленная с 200 мкг/мл α-hДНКазы1 и гепарином, ингибитором ДНКазы1l3, блокирует остаточную активность ДНКазы в плазме, добавленной с 200 мкг/мл α-hДНКазы1 (*: $p < 0,05$ по сравнению с НЗД). ФИГ. 14C-ФИГ. 14E представляет сравнение активности ДНКазы в серийных разведениях плазмы от мышей и НЗД. ФИГ. 14C иллюстрирует то, что общая активность ДНКазы мышей дикого типа является приблизительно в 10 раз более высокой, чем у НЗД. ФИГ. 14D иллюстрирует то, что активность ДНКазы1 в плазме от ДНКаза1l3-/- мышей является приблизительно в 10 раз более высокой, чем в плазме человека, в которую добавляли 500 мкг/мл гепарина. (E активность ДНКазы1l3 в плазме ДНКаза1-/- мышей является приблизительно в 10 раз более высокой, чем в плазме человека, с добавлением 200 мкг/мл α-hДНКазы1. (F, G) In vitro разрушение НВЛ иллюстрируется на ФИГ. 14F и ФИГ. 14G. ФИГ. 14F иллюстрирует активированные нейтрофилы, инкубированные с плазмой от НЗД самой по себе или с добавлением 200 мкг/мл α-hДНКазы1, с плазмой от ТМА пациентов, и с плазмой от мышей дикого типа, ДНКаза1-/- и DKO мышей (Масштабные линейки: 200 мкм). ФИГ. 14G иллюстрирует внеклеточную ДНК в супернатантах активированных нейтрофилов, инкубированных с плазмой из указанных источников (§: $p < 0,001$ по сравнению с НЗД). In vitro разрушение НВЛ плазмой человека зависит от ДНКазы1, так как ДНКазы1l3 в плазме человека не достаточно для разрушения НВЛ.

ФИГ. 15A-ФИГ. 15C демонстрируют летальное течение хронической нейтрофилии у альтернативной линии ДНКаза1/ДНКазаl3-/- мышей. Альтернативную линию ДНКаза1-/- мышей (см. способы в Примере 1) скрещивали с ДНКаза1l3-/- мышами, чтобы получить мышей с комбинированным дефицитом. ФИГ. 15A представляет кривые выживаемости нейтрофилии у мышей дикого типа (N=9), ДНКаза1-/- (D1-/-, N=5), и ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей (D1/D1L3-/-, N=5). Хроническую нейтрофилию индуцируют путем инъекции плазмиды экспрессии CSF3 (CSF3). ФИГ. 15B представляет окрашивания легких гематоксилином и эозином (H&E) срезов легких. Стрелка указывает на гематоксилин-положительные сгустки у D1/D1L3-/- мышей. Масштабная линейка: 500 мкм. ФИГ. 15C представляет выживаемость D1/D1L3-/- мышей, которые коэкспрессируют CSF3 с контрольной плазмидой (CSF3/Ктрл, N=6), с ДНКазой1 (CSF3/D1, N=5), или с ДНКазой1l3

(CSF3/D1L3, N=6). Статистические данные: логарифмический ранговый критерий; § $P < 0,001$.

ФИГ. 16А-ФИГ. 16В демонстрируют скрининг-подход для определения гиперактивных вариантов ДНКазы1 и ДНКазы1L3 in vitro. ФИГ. 16А иллюстрирует библиотеку ДНКаз, которая включает ДНКазу1L3 дикого типа (I, D1L3), ДНКазу1 дикого типа (II, D1) и их варианты. Варианты D1 и D1L3 были сконструированы путем переноса аминокислот от D1L3 к D1 (III, $D1^V$) и от D1 к D1L3 (IV, $D1L3^V$). Активность ДНКазы тестировали с применением разрушения высокомолекулярной (ВМ) ДНК, дцДНК и хроматина, в качестве субстрата. На ФИГ. 16В зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, D1, 0,0005 нг). D1 разрушает дцДНК приблизительно в 100 раз более эффективно, чем D1L3. Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. D1L3 разрушает хроматин приблизительно в 100 раз более эффективно, чем D1. При соотношении 10:1 или 1:1 (масса/масса) D1 и D1L3 демонстрируют синергические эффекты в разрушении хроматина.

ФИГ. 17 иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (SEQ ID NO: 1) и ДНКазы1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Выделены сигнальный пептид, консервативные аминокислоты, дополнительные остатки аргинина и лизина в вариабельных областях D1L3 и С-концевой хвост D1L3. Линейки последовательностей указывают положение аминокислот.

ФИГ. 18 иллюстрирует список остатков аргинина и лизина, которые присутствуют только в ДНКазе1L3. Указана соответствующая аминокислота в ДНКазе1 и аминокислотная замена в ДНКазе1. Числа в скобках обозначают положение аминокислоты в зрелом белке без сигнального пептида. Остатки аргинина и лизина, которые расположены в С-концевом хвосте D1L3, показаны на дорожках 29-37. В этой заявке протестировало 22 из 37 возможных вариантов ДНКазы1.

ФИГ. 19 иллюстрирует исследование вариантов ДНКазы1 с единичными аминокислотными заменами аргинина и лизина, приведенными на ФИГ. 18. Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Аминокислотные замены, которые приводят к повышению разрушающей хроматин активности, выделены синим. Образцы без подобного эффекта показаны голубым.

ФИГ. 20 иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (SEQ ID NO: 1), ДНКазы1 мыши (SEQ ID NO: 3), ДНКазы1 крысы (SEQ

ID NO: 4) и ДНКазы1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Линейки последовательностей указывают положение аминокислот. Сигнальные пептиды выделены серым. Выделены катионные аминокислотные остатки (аргинин: R, лизин: K), которые присутствуют в ДНКазе1 мыши/крысы и ДНКазе1L3 человека, но не в ДНКазе1 человека. Четыре таких остатка R/K показаны в ДНКазе1 мыши (Q31R, Q49K, Q79R, W209R). ДНКаза1 крысы содержит два дополнительных остатка R/K (Q177K, G262K).

ФИГ. 21A-ФИГ. 21B иллюстрируют сравнение между ДНКазой1 мыши и человека. (ФИГ. 21A) Зимография демонстрирует разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Мышиная ДНКаза1 (mD1) и ДНКаза1 человека (D1) демонстрируют схожие уровни разрушающей дцДНК активности. Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Мышиная ДНКаза1 (mD1) иллюстрирует большую разрушающую хроматин активность, чем ДНКаза1 человека (D1). (ФИГ. 21B) Генная терапия с ДНКазой1 человека обеспечивает только частичную защиту от летальной окклюзии сосудов из-за НВЛ. Хроническая нейтрофилия с сопутствующим внутрисосудистым образованием НВЛ была индуцирована экспрессией в печени *Csf3*, который кодируется с помощью G-CSF. Данные демонстрируют кривую выживаемости *Csf3*-экспрессирующих *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Животным инъецировали *Csf3* и пустой контрольный вектор (*Ктрл*, N=6), со смесью *Csf3* и ДНКазы1 человека (*чДНКазы1*, N=12) и с *Csf3* и мышиной ДНКазой1 (*чДНКазой1*, N=5). *P*-величины рассчитывали с применением логарифмического рангового критерия.

ФИГ. 22A-ФИГ. 22B иллюстрируют исследование вариантов ДНКазы1 человека, подобных вариантам грызунов, in vivo и in vitro. (ФИГ. 20A) Генная терапия с подобными таковым у грызунов вариантами ДНКазы1 обеспечивает полную защиту от летальной окклюзии сосудов из-за НВЛ. Хроническая нейтрофилия с сопутствующим внутрисосудистым образованием НВЛ была индуцирована экспрессией в печени *Csf3*, который кодируется с помощью G-CSF. Данные демонстрируют кривую выживаемости *Csf3*-экспрессирующих *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Животным инъецировали *Csf3* и пустой контрольный вектор (*Ктрл*, N=6) со смесью *Csf3* и ДНКазы1 человека (*чДНКаза1*, N=12), как показано на ФИГ. 21. Третья группа *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей получала инъекцию с *Csf3* и геном, кодирующим подобный мышиному вариант ДНКазы1, который содержит 4 аминокислотные мутации Q31R/Q49K/Q79R/W209R (*Q31R/Q49K/Q79R/W209R*, N=6). Четвертая группа *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей получала инъекцию с *Csf3* и геном, кодирующим подобный крысиному вариант ДНКазы1, который содержит 6 аминокислотных мутаций Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R и G262K (*Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K*, N=6). *P*-величины рассчитывали с применением логарифмического рангового критерия. (ФИГ. 22B) Зимография демонстрировала

разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Подобный мышиному вариант ДНКазы1 человека (Q31R/Q49K/Q79R/W209R) и подобный крысиному вариант ДНКазы1 человека (Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K) демонстрируют схожую дцДНК, но большую, чем ДНКаза1 дикого типа человека, разрушающую хроматин активность.

ФИГ. 23 иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (D1, SEQ ID NO: 1) и ДНКазы1L3 человека (D1L3, SEQ ID NO: 2). Линейки последовательности обозначают положения аминокислот. Выделены аминокислоты D1 с опубликованными мутациями. D1L3 человека содержит три мутации, которые связаны с мутацией с приобретением функции в ДНКазе1 человека (Q31R/T227K/A136F), и четыре мутации, которые не связаны с повышенной активностью.

ФИГ. 24A-24B демонстрируют исследование вариантов ДНКазы1 ($D1^V$) с мутациями Q31R, T227K и/или A136F. **(**ФИГ. 24A**)** Анализировали супернатанты культуры трансфицированных клеток HEK293. Клетки HEK трансфицировали ДНКазой1 (D1) дикого типа, а ДНКаза1L3 (D1L3) служила в качестве контроля. Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. $D1^V$, который характеризуется тремя аминокислотными мутациями Q31R/T227K/A136F, имеет схожую разрушающую дцДНК активность, но большую способность для разрушения хроматина, чем D1 и $D1^V$, которые имеют Q31R, T227K, A136F или Q31R/T227K. **(**ФИГ. 24B**)** Генная терапия гиперактивным $D1^V$ обеспечивает полную частичную защиту от летальной окклюзии сосудов из-за НВЛ. Хроническая нейтрофилия с сопутствующим внутрисосудистым образованием НВЛ была индуцирована экспрессией в печени Csf3, который кодируется с помощью G-CSF. Данные демонстрируют кривую выживаемости *Csf3*-экспрессирующих *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Животным инъецировали *Csf3* и пустой контрольный вектор (*Ктрл*, N=6) со смесью *Csf3* и ДНКазы1 человека (*чДНКаза1*, N=12), как показано на ФИГ. 21. В дополнение, группа *ДНКазы1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей получают инъекцию с *Csf3* и геном, кодирующим вариант ДНКазы1 человека, который содержит тройную аминокислотную мутацию Q31R/T227K/A136F (*Q31R/T227K/A136F*, N=6). *P*-величины рассчитывали с применением логарифмического рангового критерия.

ФИГ. 25 иллюстрирует сравнение ДНКазы1 дикого типа (D1) и вариантов ДНКазы1

($D1^V$), имеющих мутации Q31R/T227K/A136F. Очищенные белки анализировали в указанных количествах. Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, 0 нг). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Вариант ДНКазы1, имеющий мутации Q31R/T227K/A136F, разрушает хроматин приблизительно в 10-20 раз более эффективно, чем ДНКаза1 дикого типа.

ФИГ. 26 иллюстрирует сравнение вариантов ДНКазы1 ($D1^V$) с аминокислотными мутациями A164K, A136F, и A164K/A136F с ДНКазой1 дикого типа (D1) и дикого типа (D1L3). Анализировали супернатанты культуры трансфицированных клеток HEK. Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Варианты ДНКазы1, имеющие A136F/A164K, разрушают хроматин более эффективно.

ФИГ. 27A-ФИГ. 27B иллюстрируют разработку варианта ДНКазы1 с мутацией A226_T227insK. (ФИГ. 26A) Выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (SEQ ID NO: 1) и ДНКазы1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Линейки последовательности обозначают положения аминокислот. Выделены критические остатки аргинина в ДНКазе1L3. Общие между ДНКазой1 и ДНКазой1L3 аминокислоты выделены и служат в качестве якорей для замены последовательности аминокислот ATP ДНКазы1 на VKKS ДНКазы1L3. (ФИГ. 26B) Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). В гель загружали варианты ДНКазы1 дикого типа (D1), ДНКазы1 ($D1^V$), которые имеют мутации A226_T227insK, T227K и A226_P228delinsVKKS. A226_T227insK, но не A226_P228delinsVKKS, связан со сниженной разрушающей дцДНК активностью.

ФИГ. 28 иллюстрирует структуру ДНКазы1 человека [4AWN]. Выделены N-концевой бета-лист и C-концевой бета-лист, и мотив S272/D273/H274, который является консервативным среди членов семейства белков D1.

ФИГ. 29 иллюстрирует концептуальную идею конструирования структурного блока гомологичных белков. Технология переносит одну или несколько вариабельных аминокислот, которые фланкированы консервативной одной или несколькими

вариабельными аминокислотами, между донорским и реципиентным белком.

ФИГ. 30 иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 и ДНКазы1L3 мыши (SEQ ID NO: 3 и 34), крысы (SEQ ID NO: 4 и 35), шимпанзе (SEQ ID NO: 36 и 37) и человека (SEQ ID NO: 1 и 2). N-концевой сигнальный пептид и консервативные аминокислоты выделены. Вариабельные аминокислоты не выделены и служат в качестве структурных блоков, которые могут быть перенесены с ДНКазы1 на ДНКазу1L3 и наоборот. Сокращения: AA, аминокислота.

ФИГ. 31A-ФИГ. 31B демонстрируют списки структурных блоков в ДНКазе1 человека (D1) и ДНКазе1L3 человека (D1L3). ФИГ. 31A иллюстрирует аминокислоты, которые являются консервативными в D1 и D1L3, которые служат в качестве N- и C-якорей, соответственно. Структурные блоки являются вариабельными аминокислотами в D1 и D1L3. Показаны мутации, которые переносят структурные блоки с D1L3 на D1. ФИГ. 31B иллюстрирует N- и C-якори в D1L3. Приведены мутации, которые переносят структурные блоки с D1 на D1L3. AA: аминокислота.

ФИГ. 32 иллюстрирует применение конструирования структурного блока гомологичных белков. В этой заявке используется в качестве начального этапа скрининга перенос структурных блоков между гомологичным донорным и реципиентным белком. Дополнительные необязательные этапы представляют перенос отдельных структурных блоков, с последующим переносом отдельных аминокислот. На конечном этапе (не показан) несколько аминокислот, структурных блоков и кластеры структурных блоков могут быть объединены, чтобы дегенерировать химерный фермент.

ФИГ. 33 иллюстрирует исследование вариантов ДНКазы1 ($D1^V$) с использованием строительных блоков из ДНКазы1L3 (D1L3). Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. Замены структурных блоков, которые приводят к повышению разрушающей хроматин активности, выделены темным оттенком. Образцы без подобного эффекта показаны светлым тоном. Вариант ДНКазы1, который имеет комбинацию структурных блоков 11, 12-14, 26, 41-48 и 49, иллюстрирует схожую разрушающую хроматин активность, что и ДНКаза1L3 дикого типа.

ФИГ. 34A-ФИГ. 34B иллюстрируют разработку варианта ДНКаза1L3 без C-концевого хвоста ДНКазы1L3 дикого типа. ФИГ. 34A иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (SEQ ID NO: 1) и ДНКазы1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Линейки последовательности обозначают положения аминокислот. Выделен C-концевой хвост ДНКазы1L3, а ее сигнал внутриядерной локализации взят в рамку. Обозначены общие между ДНКазой1 и ДНКазой1L3 аминокислоты. Аминокислоты, расположенные после консервативного мотива SDH, были

заменены кластером структурных блоков (СБ) 60-62 между ДНКазой1 и ДНКазой1L3. ФИГ. 34B иллюстрирует зимографию, которая демонстрирует разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. В гель загружали ДНКазу1 дикого типа (D1), вариант ДНКазы1 ($D1^V$), который имеет кластер СБ 60-62 от D1, вариант ДНКазы1L3 ($D1L3^V$), который имеет кластер СБ 60-62 от D1, а $D1L3^V$ с двумя мутациями (K301A, K303A) была создана, чтобы инактивировать NLS2. $D1L3^V$ с кластером СБ 60-62 от D1 демонстрирует повышенную разрушающую хроматин активность по сравнению с D1L3 дикого типа.

ФИГ. 35A-ФИГ. 35B иллюстрируют результаты разработки гликозилированных вариантов ДНКазы1L3ы ($D1L3^V$). ФИГ. 35A иллюстрирует выравнивание аминокислотной последовательности ДНКазы1 человека (SEQ ID NO: 1) и ДНКазы1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Линейки последовательности обозначают положения аминокислот. Выделены мотивы гликозилирования N40-X-T42 и N128-X-T130 ДНКазы1. Сайты являются частью структурного блока (СБ) 4 и кластером структурного блока (СБ) 23-25. Выделены соответствующие общие между ДНКазой1 и ДНКазой1L3 аминокислоты. (ФИГ. 35B) Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, Ктрл). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. В гель загружали ДНКазу1L3 дикого типа (D1L3), вариант ДНКазы1L3 ($D1L3^V$), который имеет СБ 4 от D1, и вариант ДНКазы1L3 ($D1L3^V$), который имеет кластер СБ 23-25 от D1. Вестерн-блоттинг (WB) с антителами против D1L3 обнаружил, что $D1L3^V$ демонстрирует повышенные количества более крупных белков. Оба гликозилированные варианты ДНКазы1L3 ($D1L3^V$) сохранили свою способность разрушать хроматин.

ФИГ. 36A-ФИГ. 36F иллюстрируют терапевтический эффект ДНКазы1L3 (SEQ ID NO: 2) и ее варианта (SEQ ID NO: 17) против НВЛ in vivo. ФИГ. 36A иллюстрирует H&E окрашивание сердца мыши по обогащенному гематоксилином и плотному сгустку НВЛ внутри сердечной камеры. ФИГ. 36B иллюстрирует временную шкалу, начинающуюся с индукции НВЛ, приводящей к окклюзии сосудов из-за НВЛ и смерти. Гематурия и гипотермия являются внешними признаками сгустков НВЛ in vivo. (ФИГ. 36C) Схема экспериментального конструирования: *Csf3* экспрессируется в *ДНКазе1*$^{-/-}$*ДНКазе1l3*$^{-/-}$ для индуцирования сосудистых сгустков НВЛ. Мышей, которые демонстрировали гематурию и гипотермию, рандомизировали путем инъекции носителя (N=3), дорназы альфа(D1, N=3), очищенной ДНКазы1L3 (D1L3, N=3) или очищенного варианта ДНКазы1L3 (SEQ ID NO:

17, D1L3^{V}, N=3). Спустя 30 минут собирали легкие и сыворотку. Терапия с помощью D1L3 или D1L3^{V}, но не физиологическим раствором или D1, значительно снижала окклюзию сосудов из-за НВЛ в легких (ФИГ. 36D) и повышала уровни ДНК в сыворотке (ФИГ. 36E). ФИГ. 36F иллюстрирует олигонуклеосомы в сыворотке, полученной от мышей, получающих терапию с D1L3. Мыши, получавшие D1L3^{V}, демонстрировали меньшие моно- и ди-нуклеосомы. Изоляты ДНК из сыворотки мышей, получавших терапию с D1, демонстрировали нечеткие мазки ДНК различных размеров, тогда как ДНК не смогли выделить из сыворотки мышей, которым инъецировали носитель.

ФИГ. 37A-ФИГ. 37C иллюстрируют терапевтический эффект варианта ДНКазы1L3 (SEQ ID NO: 17) в крысиной модели ишемически-реперфузионного (IR) повреждения. (ФИГ: 37A) Схема экспериментального опыта: Одно яичко самцов крыс дикого типа подвергали перекруту семенного канатика. Процедура приводит к ишемическому повреждению тканей. Мышей рандомизировали. Осуществляли раскручивание семенного канатика с последующей инъекцией носителя (N=6), дорназы альфа (D1, N=6) или очищенного варианта ДНКазы1L3 (SEQ ID NO: 17, D1L3^{V}, N=6). Не подвергавшееся воздействию и ишемизированное яичко собирали спустя 7 дней. ФИГ. 37B иллюстрирует то, что терапия с D1L3^{V}, но не физиологическим раствором или D1, значительно снижала атрофию ишемизированного яичка. ФИГ. 37C количественно определяли макроскопическое повреждение тканей. Все не подвергавшееся лечению яички имеют коричневый оттенок и васкуляризированные, что указывает на здоровую ткань (Ктрл, показатель: 0). Перекрут семенного канатика с последующей реперфузией повреждает ткань, которая становится белесоватой (IR, показатель: 4). Терапия с D1L3^{V}, но не физиологическим раствором или D1, существенно снижала повреждение тканей и 4/6 яичек не демонстрируровали признаки повреждения. Масштабная линейка: 1 см.

ФИГ. 38A-ФИГ. 38C иллюстрируют экспрессию уровней ДНКазы1, ДНКазы1L3 и их вариантов. (ФИГ. 38A) Стабильные пулы клеток CHO, продуцирующих ДНКазу1 (D1) дикого типа, ее вариант (D1^{V}, SEQ ID NO: 7), D1L3 дикого типа и ее вариант (D1L3^{V}, SEQ ID NO: 17) культивировали в биореакторах. Образцы периодически собирали и анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Определяли экспрессию D1 и D1^{V}, но обнаружены только низкие уровни D1L3 и D1L3^{V}. (ФИГ. 38B) Достигали устойчивую экспрессию D1L3 и D1L3^{V} у *Pichia pastoris*. (ФИГ. 38C) Зимография демонстрировала разрушающую дцДНК активность в виде темных кругов. Разрушающая дцДНК активность коррелирует с диаметром. Образцы без активности демонстрируют нагруженную лунку в виде маленькой черной точки (например, D1L3, 0,0005 нг). Электрофорез в агарозном геле (AGE) ДНК, выделенной из расщепленного хроматина, иллюстрирует сдвиг с высокомолекулярной ДНК к ДНК с более низкой молекулярной массой или низкомолекулярной ДНК, что коррелирует с разрушающей хроматин активностью. D1L3^{V} разрушает хроматин приблизительно в 10 раз более эффективно, чем D1L3.

ФИГ. 39 иллюстрирует определенные варианты ДНКазы в соответствии с этим раскрытием. Перечислены аминокислотные мутации в ДНКазе1 и ДНКазе1L3 с

сигнальным пептидом, а также в зрелых белках без сигнального пептида. Мутации, которые были сгенерированы с применением конструирования структурных блоков, обозначают с помощью «+», а структурные блоки указаны в скобках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к сконструированным белкам ДНКаз, членам семейства белков ДНКазы1 (в том числе ДНКаза1-подобному ферменту 3 и ДНКазе1), которые используются для лечения состояний, характеризующихся накоплением и/или высвобождением нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ). В некоторых аспектах, изобретение относится к композициям и способам для профилактики или лечения окклюзии сосудов с участием НВЛ. Как показано в настоящем изобретении, НВЛ участвуют в неканоническом механизме окклюзии сосудов, который не зависит от фибрина и тромбоцитов.

В рамках изобретения, термин «нейтрофильная внеклеточная ловушка» или «НВЛ» соответствует любой внеклеточной ловушке («ВЛ»), содержащей внеклеточную ДНК, образованной такими клетками, как, но без ограничения этим, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, раковые клетки, поврежденные клетки (например, поврежденные эндотелиальные клетки) и т. д. Если из контекста не следует иное, термины НВЛ и ВЛ используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо.

Существуют два внеклеточных фермента ДНКаз, обнаруженные в кровообращении людей и мышей, ДНКаза1 (D1) и ДНКаза1-подобный фермент 3 (D1L3). Эти ферменты могут быть несовершенными по своей способности и механизму разрушать НВЛ in vitro и in vivo и обнаруживаются в относительно низких концентрациях у людей и мышей. Природные ферменты не обладают идеальными физическими, ферментативными и/или фармакодинамическими свойствами в случае рекомбинантной терапии и особенно в случае системной терапии.

D1 и D1L3 принадлежат, наряду с ДНКаза1-подобным ферментом 1 (D1L1) и ДНКаза1-подобным ферментом 2 (D1L2), к семейству белков ДНКазы1. D1 и D1L3 экспрессируются во множестве видов, в том числе у людей, приматов и грызунов. У людей и мышей D1 и D1L3 демонстрируют сходство белка на 49-52%. Однако, несмотря на их гомологию, D1 и D1L3 различаются по клеточному происхождению, чувствительности к ингибиторам и аффинности к субстрату. D1 предпочтительно расщепляет депротеинизированную ДНК (например, бактериальную ДНК, плазмидную ДНК), тогда как D1L3 нацеливается на хроматин, комплекс ДНК и гистонов, который обычно обнаруживается в ядре эукариотических клеток. Активность D1 ингибируется при связывании с мономерным актином и чувствительна к физиологическим концентрациям солей. Кроме того D1 гликозилирован в положении N40 (соответствует N18 в зрелом ферменте без сигнального пептида) и N128 (N106), что делает фермент устойчивым к инактивации сывороточными протеазами. Напротив, у D1L3 отсутствует гликозилирование и сайты связывания актина, что вызывает его восприимчивость к нескольким протеазам и устойчивость к актину, соответственно.

В некоторых аспектах, изобретение относится к вариантам D1L3, сконструированным, чтобы иметь более подходящие для терапии физические, фармакодинамические и/или ферментативные свойства, например, для уменьшения или профилактики накопления НВЛ у субъекта. В различных вариантах осуществления изобретение относится к рекомбинантному варианту белка D1L3, содержащему: одно или более гликозилирований, одно или более изменений аминокислотного состава, приводящих к повышенной аффинности к субстрату, инактивации сигнала внутриядерной локализации, делеции всего или части С-концевого хвоста, пегилированию и слиянию с белком или функциональной группой носителя. В различных вариантах осуществления вариант D1L3 имеет повышенную стабильность белка, повышенную устойчивость к протеазам, повышенную биологическую доступность, увеличенный период полувыведения из кровообращения и/или по существу одинаковую или более высокую разрушающую ДНК и/или хроматин и/или НВЛ активность, более высокие уровни продуцирования с помощью систем экспрессии in vitro (например, клеток яичника китайского хомяка и/или *Pichia pastoris*) по сравнению с белком D1L3 дикого типа SEQ ID NO:2.

В различных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности последовательности по отношению к ферменту, определенному аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, с одной или более аминокислотными модификациями по сравнению с SEQ ID NO:2, как описано в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с ферментом ДНКазой, определенной SEQ ID NO:2.

В рамках изобретения, при упоминании идентичности последовательности с ферментами ДНКазы дикого типа, и если не указано иное, последовательности соответствуют зрелым ферментам, в которых отсутствует сигнальный пептид. Кроме того, если не указано иное, для ясности положения аминокислот нумеруют относительно полностью транслированной последовательности ДНКазы, включающей сигнальный пептид. Соответственно, например, ссылка на идентичность последовательности с ферментом SEQ ID NO:2 соответствует проценту идентичности со зрелым ферментом, имеющим M21 на N-конце. Аналогичным образом, ссылка на идентичность последовательности с ферментом SEQ ID NO:1 (D1 человека) соответствует проценту идентичности со зрелым ферментом, имеющим L23 на N-конце.

Сходство последовательностей нуклеотида и аминокислоты, т. е. процент идентичности последовательностей, может быть определено посредством выравниваний последовательностей, как известно в данной области техники. Подобные выравнивания могут быть выполнены с помощью нескольких известных в данной области техники алгоритмов, таких как математический алгоритм Карлина и Артшульца (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), программу hmmalign (HMMER package, http://hmmer.wustl.edu/) или алгоритм CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson,

T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80). Приводимые в качестве примера алгоритмы включены в программы BLASTN и BLASTP Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. При использовании программ BLAST, соответствующие программы используют параметры по умолчанию.

В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный вариант белка D1L3 содержит одну или более консенсусных последовательностей гликозилирования, например, NX(T/S). Фермент дикого типа (SEQ ID NO:2) человека не содержит консенсусную последовательность гликозилирования. Однако, конструирование консенсусной последовательности гликозилирования в D1L3 может обеспечить гликозилирование (и устойчивость к протеазам) без существенного влияния на активность фермента. В отдельных вариантах осуществления консенсусная последовательность гликозилирования содержит замену D38N и замену N40T или N40S, и/или замену A127N и замену V129T или V129S из последовательности дикого типа (например, SEQ ID NO:2). В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный фермент D1L3 имеет один, два, три или четыре сайта гликозилирования. Консенсусная последовательность может быть введена в белок в положении, которое не влияет на ее ферментативную активность, и в некоторых вариантах осуществления находится рядом с частями фермента, которые важны для поддержания структуры фермента (например, такими как аминокислоты 25-289, и в отдельных вариантах осуществления в пределах аминокислот 24-150).

В отдельных вариантах осуществления изобретение относится к ферменту ДНКазе, содержащему аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности фермента, определенной SEQ ID NO:2, при этом фермент имеет замену аспарагина в положении, соответствующему положению 38 и/или положению 127 SEQ ID NO:2, а N38 и/или N127 гликозилированы. В отдельных вариантах осуществления замену в положении 38 и/или 127 осуществляют посредством замены структурного блока из SEQ ID NO:1, как описано в настоящем изобретении.

В различных вариантах осуществления варианты D1L3, имеющие одно или более гликозилирований, проявляют повышенную устойчивость к разрушению сывороточной протеазой и/или повышенный период полувыведения из сыворотки, по сравнению с белком D1L3 дикого типа (SEQ ID NO:2).

В отдельных вариантах осуществления вариант белка D1L3 содержит инактивацию сигнала внутриядерной локализации (NLS). D1L3 имеет два сайта внутриядерной локализации (nuclear localization sites, NLS1, NLS2), оба из которых нацеливают фермент на ядро во время апоптоза. Действительно, D1L3 требуется для фрагментация ядерной ДНК в апоптотических и некротических клетках *in vivo*. NLS1 расположен возле N-конца (около положений аминокислот 80-96 по сравнению с SEQ ID NO: 2). NLS2 (положения аминокислот 291-304 по сравнению с SEQ ID NO: 2) интегрирован в пределы С-концевого хвоста (положения аминокислот 283-305 по сравнению с SEQ ID NO: 2), что является уникальным для D1L3, и отсутствует в D1. С-концевой хвост, как полагают, необходим для

того, чтобы D1L3 разрушал различные субстраты внеклеточной ДНК, а именно инкапсулированную липидом ДНК и хроматин в апоптотических телах. Липиды инкапсулируют ДНК во время трансфекций. Вкратце, кДНК, депротеинизированная ДНК и катионные липиды образуют комплекс, который проникает через плазматическую мембрану клеток-мишеней. D1L3 мешает трансфекциям, а С-концевой хвост имеет решающее значение для этой функции. Физиологическими субстратами D1L3 являются апоптотические тела, внеклеточные липидные везикулы, заполненные хроматином из апоптотических клеток. С-концевой хвост позволяет D1L3 проникать сквозь липидные мембраны апоптотических тел и разрушает нагрузку хроматина. Также считается, что С-концевой хвост необходим для разрушения безлипидного внеклеточного хроматина с помощью D1L3. Таким образом, С-концевой хвост, молекулярный признак, уникальный для D1L3, по-видимому, ответственен за различные аффинности D1 и D1L3 к субстрату.

Инактивация одного или более NLS улучшает доступность и/или активность фермента в кровообращении. В отдельных вариантах осуществления инактивацию NLS осуществляют путем удаления всего или части NLS1 и/или NLS2. В отдельных вариантах осуществления NLS инактивируют путем замены и/или делеции аминокислот в NLS1 и/или NLS2. В отдельных вариантах осуществления NLS2 удаляют, полностью или частично. В отдельных вариантах осуществления вариант белка D1L3 содержит делецию всего или части С-концевого хвоста и/или замену одной или более аминокислот в С-концевом хвосте.

В конкретном варианте осуществления вариант D1L3 содержит одну или более, например 1, 2, 3, 4, 5 или более, аминокислотных замен, присоединений (например, вставок) или делеций в домене NLS1. Домен NLS2 или его часть могут быть удалены. В конкретном варианте осуществления вариант белка D1L3 содержит одну или более, например 1, 2, 3, 4, 5 или более, аминокислотных замен, присоединений или делеций в домене С-концевого хвоста. С-концевой хвост домен или его часть могут быть удалены. В различных вариантах осуществления вариант белка D1L3 содержит одну или более, например 1, 2, 3, 4, 5 или более, аминокислотных замен, присоединений или делеций в домене NLS2, который расположен в домене С-концевого хвоста. Домен NLS2 или его часть в варианте белка D1L3 могут быть удалены.

В различных аспектах, изобретение относится к технологии конструирования белка, которая основана на переносе одной аминокислоты или нескольких смежных аминокислот, называемых «структурным блоком», между двумя членами семейства белков, такими как члены семейства белков ДНКазы1 для создания ферментативно активных вариантов членов семейства белков ДНКазы1 (в том числе вариантов D1 и D1L3). «Структурный блок» определяют с помощью аминокислот, которые являются вариабельными между двумя или более членами семейства белков ДНКазы1. Эти вариабельные аминокислоты фланкированы аминокислотами, которые являются консервативными между двумя или более членами семейства белков ДНКазы1 («якорями»). Вариабельная отдельная аминокислота или несколько непосредственно следующих одна за другой аминокислот («структурные блоки») являются заменяемыми между членами семейства белков ДНКазы1

путем введения их между консервативной отдельной аминокислотой или несколькими непосредственно следующими одна за другой аминокислотами («якорями»).

Этот подход упоминается в настоящем изобретении как «конструирование белков структурных блоков». Если переносят три или более аминокислот, дополнительно может быть заменено вплоть до 1/3 аминокислот. Например, там, где переносят три или шесть аминокислот в качестве структурного блока, один или до двух остатков, соответственно, могут быть замещены дополнительно. В отдельных вариантах осуществления переносят четыре или более аминокислот в качестве замены структурного блока, и вплоть до 25% перенесенных аминокислот замещают дополнительно, например консервативными или неконсервативными аминокислотными модификациями. Например, где переносят четыре, восемь или двенадцать аминокислот, в замене структурного блока могут быть дополнительно заменены одна, две или три аминокислоты (соответственно).

В различных аспектах (в том числе в связи с вариантами осуществления, описанными выше), вариант D1L3 содержит по меньшей мере одну замену структурного блока от D1. ФИГ. 31 иллюстрирует 62 замены структурных блоков между D1 и D1L3.

Приводимые в качестве примера замены структурных блоков, происходящих от D1, включают одну или более из:

замены 1-20 (MSRELAPLLLLLLSIHSALA) SEQ ID NO:2 на 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) из SEQ ID NO:1; замены 21-25 (MRICS) SEQ ID NO:2 на 23-27 (LKIAA) из SEQ ID NO:1; замены 28-30 (VRS) SEQ ID NO:2 на 30-32 (IQT) из SEQ ID NO:1; замены 33-34 (ES) SEQ ID NO:2 на 35-36 (ET) из SEQ ID NO:1; замены 36-45 (QEDKNAMDVI) SEQ ID NO:2 на 38-47 (MSNATLVSYI) из SEQ ID NO:1; замены 47-51 (KVIK) SEQ ID NO:2 на 49-53 (QILS) из SEQ ID NO:1; замены 52 (C) SEQ ID NO:2 на 54 (Y) из SEQ ID NO:1; замены 54-58 (IILVM) SEQ ID NO:2 на 56-60 (IALVQ) из SEQ ID NO:1; замены 60-61 (IK) SEQ ID NO:2 на 62-63 (VR) из SEQ ID NO:1; замены 63-70 (SNNRICPI) SEQ ID NO:2 на 65-72 (SHLTAVGK) из SEQ ID NO:1; замены 72-74 (MEK) SEQ ID NO:2 на 74-76 (LDN) из SEQ ID NO:1; замены 77-84 (RNSRRGIT) SEQ ID NO:2 на 79-84 (QDAPDT) из SEQ ID NO:1; замены 86 (N) SEQ ID NO:2 на 86 (H) из SEQ ID NO:1; замены 88-89 (VI) SEQ ID NO:2 на 88-89 (VV) из SEQ ID NO:1; замены 91-92 (SR) SEQ ID NO:2 на 91-92 (EP) из SEQ ID NO:1; замены 96-97 (NT) SEQ ID NO:2 на 96-97 (NS) из SEQ ID NO:1; замены 101 (Q) SEQ ID NO:2 на 101 (R) из SEQ ID NO:1; замены 103 (A) SEQ ID NO:2 на 103 (L) из SEQ ID NO:1; замены 105 (L) SEQ ID NO:2 на 105 (V) из SEQ ID NO:1; замены 107-110 (KEKL) SEQ ID NO:2 на 107-110 (RPDQ) из SEQ ID NO:1; замены 113-116 (VKRS) SEQ ID NO:2 на 113-116 (AVDS) из SEQ ID NO:1; замены 118 (H) SEQ ID NO:2 на 118 (Y) из SEQ ID NO:1; замены 120 (H) SEQ ID NO:2 на 120 (D) из SEQ ID NO:1; замены 122-127 (YQDGDA) SEQ ID NO:2 на 122-128 (GCEPCGN) из SEQ ID NO:1; замены 129 (V) SEQ ID NO:2 на 130 (T) из SEQ ID NO:1; замены 131 (S) SEQ ID NO:2 на 132 (N) из SEQ ID NO:1; замены 135-136 (FV) SEQ ID NO:2 на 136-137 (AIV) из SEQ ID NO:1; замены 138 (W) SEQ ID NO:2 на 139 (R) из SEQ ID NO:1; замены 140-143 (QSPH) SEQ ID NO:2 на 141-144 (FSRF) из SEQ ID NO:1; замены 145-148 (AVKD) SEQ ID NO:2 на 146-149 (EVRE) из SEQ ID NO:1;

замены 150 (V) SEQ ID NO:2 на 151 (A) из SEQ ID NO:1; замены 152 (I) SEQ ID NO:2 на 153 (V) из SEQ ID NO:1; замены 156-157 (TT) SEQ ID NO:2 на 157-158 (AA) из SEQ ID NO:1; замены 159-161 (ETS) SEQ ID NO:2 на 160-162 (GDA) из SEQ ID NO:1; замены 163 (K) SEQ ID NO:2 на 164 (A) из SEQ ID NO:1; замены 167 (E) SEQ ID NO:2 на 168 (A) из SEQ ID NO:1; замены 169-170 (VE) SEQ ID NO:2 на 170-171 (YD) из SEQ ID NO:1; замены 173 (T) SEQ ID NO:2 на 174 (L) из SEQ ID NO:1; замены 176-178 (KHR) SEQ ID NO:2 на 177-179 (QEK) из SEQ ID NO:1; замены 180-181 (KA) SEQ ID NO:2 на 181-182 (GL) из SEQ ID NO:1; замены 183-186 (NFIF) SEQ ID NO:2 на 184-187 (DVML) из SEQ ID NO:1; замены 198-201 (PKKA) SEQ ID NO:2 на 199-202 (RPSQ) из SEQ ID NO:1; замены 203-204 (KN) SEQ ID NO:2 на 204-205 (SS) из SEQ ID NO:1; замены 208 (R) SEQ ID NO:2 на 209 (W) из SEQ ID NO:1; замены 210 (D) SEQ ID NO:2 на 211 (S) из SEQ ID NO:1; замены 212 (R) SEQ ID NO:2 на 213 (T) из SEQ ID NO:1; замены 214 (V) SEQ ID NO:2 на 215 (Q) из SEQ ID NO:1; замены 218 (G) SEQ ID NO:2 на 219 (P) из SEQ ID NO:1; замены 220-221 (QE) SEQ ID NO:2 на 221-222 (SA) из SEQ ID NO:1; замены 225-228 (VKKS) SEQ ID NO:2 на 226-228 (ATP) из SEQ ID NO:1; замены 230 (N) SEQ ID NO:2 на 230 (H) из SEQ ID NO:1; замены 238-240 (LRG) SEQ ID NO:2 на 238-240 (VAG) из SEQ ID NO:1; замены 241-246 (QEIVSS) SEQ ID NO:2 на 241-246 (MLLRGA) из SEQ ID NO:1; замены 250 (K) SEQ ID NO:2 на 250 (D) из SEQ ID NO:1; замены 252-254 (NSV) SEQ ID NO:2 на 252-254 (ALP) из SEQ ID NO:1; замены 256 (D) SEQ ID NO:2 на 256 (N) из SEQ ID NO:1; замены 259-260 (KA) SEQ ID NO:2 на 259-260 (AA) из SEQ ID NO:1; замены 262 (K) SEQ ID NO:2 на 262 (G) из SEQ ID NO:1; замены 264-267 (TEEE) SEQ ID NO:2 на 264-267 (SDQL) из SEQ ID NO:1; замены 269-271 (LDV) SEQ ID NO:2 на 269-271 (QAI) из SEQ ID NO:1; замены 275 (F) из SEQ ID NO:2 на 275 (Y) из SEQ ID NO:1; замены 279-280 (FK) SEQ ID NO:2 на 279-280 (VM) из SEQ ID NO:1; и замены 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) SEQ ID NO:2 на 282 (K) из SEQ ID NO:1.

Эти замены структурных блоков, происходящих от D1, приводят к вариантам D1L3, которые имеют одну или более из следующих мутаций: M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F_136VdelinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156_T157delinsAA, E159_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169_E170delinsYD, T173L, K176_R178delinsQEK, K180_A181delinsGL, N183_F186delinsDVML, P198_A201delinsRPSQ, K203_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220_E221delinsSA, V225_S228delinsATP, N230H, L238_R239delinsVA, Q241_S246delinsMLLRGA, K250D, N252_V254delinsALP, D256N, K259_A260delinsAA, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM, Q282_S305delinsK.

Термин «delins» относится к делеции между двумя указанными аминокислотами и включению их со вставкой аминокислоты или последовательности аминокислот в сайт делеции. Например, обозначение E91_P92delinsSR означает, что аминокислоты от E91 до P92 удаляют и вставляют в сайт делеции аминокислоты SR (например, получаемая аминокислотная последовательность будет содержать S91 и R92).

Термин «ins» соответствует вставке аминокислот между двумя указанными аминокислотами. Например, обозначение E91_P92insSR означает, что аминокислоты SR вставляют между E91 и P92, что приводит к образованию последовательности E91, S92, R93, и P94.

Множественные мутации в одном ферменте разделяют с помощью «/», например T227K/A136F или R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит одну или более смежных замен структурных блоков. Например, вариант D1L3 может содержать в сравнении с SEQ ID NO:2 мутацию F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 может содержать в сравнении с SEQ ID NO:2 мутацию Q36_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19). В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 может содержать в сравнении с SEQ ID NO:2 мутацию Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20).

В приводимом в качестве примера варианте осуществления вариант D1L3 содержит 2 или 3 замены, выбранные из мутаций в сравнении с SEQ ID NO:2: Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N, F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK.

Таким образом, в отдельных вариантах осуществления изобретение относится к ферменту ДНКазе, содержащему аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности фермента, определенной SEQ ID NO:2, и содержит по меньшей мере одну замену структурного блока из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1. Замены структурных блоков между SEQ ID NO: 1 и 2 проиллюстрированы и пронумерованы на **ФИГ. 31**. Например, в отдельных вариантах осуществления фермент содержит мутацию F275Y/F279_K280delinsVM/ Q282_S305delinsK, которая необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В отдельных вариантах осуществления фермент содержит мутации Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T или S131N и необязательно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

Приводимые в качестве примера варианты D1L3 включают варианты, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID No: 17-20. Изобретение в отдельных вариантах осуществления содержит производные, имеющие от 1 до 10 (например, от 1 до 5) аминокислотных вставок, делеций или замен по сравнению с любыми из SEQ ID NO:17-

20. В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит одну или более дополнительных блочных аминокислотных замен из гомологичной ДНКазы (например, из D1). Подобные замены блоков могут заменять по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислот. В отдельных вариантах осуществления замены блоков заменяют от 2 до 20 аминокислот, например, от 3 до 15 аминокислот или от 3 до 10 аминокислот, сопоставимым структурным блоком из гомологичной ДНКазы.

Сконструированные варианты белка D1L3 могут содержать одну или более дополнительных аминокислотных замен, присоединений (вставок), делеций или усечений в аминокислотной последовательности D1L3 человека (SEQ ID NO: 2). Аминокислотные замены могут включать консервативные и/или неконсервативные замены.

Например, «консервативные замены» могут быть сделаны, например, на основе сходства по полярности, заряду, размеру, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природе участвующих аминокислотных остатков. Встречающиеся в природе 20 аминокислот могут быть сгруппированы в следующие шесть стандартных групп аминокислот: (1) гиброфобные: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. «Консервативные замены» определяются как замены аминокислоты другой аминокислотой, приведенной в той же группе из шести стандартных групп аминокислот, показанных выше. Например, обмен Asp на Glu сохраняет один отрицательный заряд в модифицированном полипептиде. В дополнение, глицин и пролин могут заменять друг друга на основании их способности разрушать α-спирали. В рамках изобретения, «неконсервативные замены» определяются как замены аминокислоты другой аминокислотой, приведенной в другой группе из шести стандартных групп (1)-(6) аминокислот, приведенных выше.

В отдельных вариантах осуществления вариант белка DlL3 содержит N-концевое или С-концевое слияние с функциональной группой, увеличивающей период полувыведения, такой как альбумин, трансферрин, Fc или эластин-подобный белок. Смотри US 9458218, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки. В отдельных вариантах осуществления D1L3 димеризуют с помощью шарнирной области иммуноглобулина. Например, сконструированные ферменты, описанные в настоящем изобретении, могут также содержать гибридный домен Fc (например, шарнирный участок и домены CH2 и домены CH3 иммуноглобулина). В других случаях, сконструированный белок D1L3 подвергают слиянию с альбумином, например альбумином человека или его фрагментом. Смотри WO 2015/066550; US 9221896, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки. Альбумин может быть соединен с N-концом или С-концом сконструированного белка D1 и может необязательно содержать аминокислотный линкер. В отдельных вариантах осуществления D1L3 и D1 вместе димеризуются с помощью шарнирной области Fc, создавая димерную молекул с синергетическими функциональными свойствами для разрушения НВЛ.

В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный вариант белка D1L3 содержит одну или более полиэтиленгликолевых (ПЭГ) функциональных групп, которые могут быть конъюгированы на одном или более положениях или С-конце. В отдельных вариантах осуществления нативная аминокислота в этом положении замещена аминокислотой, которая имеет боковую цепь, подходящую для сшивания с гидрофильными функциональными группами, для облегчения связывания гидрофильной функциональной группы с пептидом. В других вариантах осуществления аминокислоту, модифицированную таким образом, что она содержит гидрофильную группу, добавляют с пептидом на С-конце. Цепь(и) ПЭГ может(могут) иметь молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 500 до приблизительно 40000 Дальтон. В отдельных вариантах осуществления цепь(и) ПЭГ имеет(ют) молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Дальтон. В отдельных вариантах осуществления цепь(и) ПЭГ имеет(ют) молекулярную массу от приблизительно 10000 до приблизительно 20000 Дальтон.

В различных вариантах осуществления вариант белка D1L3 имеет повышенную стабильность белка, повышенную доступность в сыворотке и по существу одинаковую или более высокую разрушающую НВЛ активность (что определяют в vitro или in vivo) по сравнению с белком D1L3 дикого типа. В различных вариантах осуществления вариант D1L3 имеет одно или более из следующих свойств по сравнению с D1L3 дикого типа: более высокую активность разрушения депротеинизированной ДНК («оголенной» ДНК), одинаковую или по существу одинаковую (например, по меньшей мере 50%) активность разрушения хромосомной ДНК, устойчивость к протеазам, повышенный период полувыведения и более высокие уровни продуцирования с помощью систем экспрессии in vitro (например, клеток яичника китайского хомяка и/или *Pichia pastoris*).

Фрагментация ДНК может быть измерена с применением способов, известных специалистам в данной области техники, таких как гель-электрофорез и анализы активности ДНКазы. Способы количественной оценки НВЛ, разрушения НВЛ и активности фрагментации ДНК описаны, например, у Hakkim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2010, 107(21):9813-9818; Napirei et al. *Biochem J*, 2005, 389: 355-364. Fuchs et al., *J Cell Biol*, 2007, 176(2):231-241, Sisirak et al. *Cell*, 2016, 166:88-101, и Jiménez-Alcázar et al. *J Thromb* Haemost, 2015, 13, 732-742.

В некоторых аспектах изобретение относится к вариантам ДНКазы1 (D1), сконструированным, чтобы иметь более подходящие для терапии физические, фармакодинамические и/или ферментативные свойства, например, для уменьшения или профилактики накопления НВЛ у субъекта. В отдельных вариантах осуществления вариант является более пригодным для рекомбинантной экспрессии, тем самым обеспечивая значительные производственные преимущества. В различных вариантах осуществления сконструированный вариант D1 содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной зрелому ферменту, определенному аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, с одной или более аминокислотными заменами, присоединениями или делециями, приводящими к одному или более из

мутировавшего сайта связывания ДНК, присоединения сайта связывания хроматина, мутировавшего сайта связывания актина, мутации сайта гликозилирования, присоединения сигнала внутриядерной локализации (например, имеющего сходство или идентичность с NLS1 или NLS2 D1L3), и/или С-концевой домен, схожий с С-концевым хвостом D1L3. Вариант D1 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности фермента, определенной SEQ ID NO:1, с одной или более аминокислотными модификациями по сравнению с SEQ ID NO:1, как описано в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления вариант D1L3 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98% идентичностью ферменту SEQ ID NO:1.

В различных вариантах осуществления вариант D1 содержит одну или более аминокислотных замен, присоединений, делеций или усечений в аминокислотной последовательности D1 человека (SEQ ID NO: 1). В отдельных вариантах осуществления аминокислотные замены могут включать консервативные и/или неконсервативные замены, описанные выше. Например, вариант D1 может иметь от 1 до 20 (или от 1 до 10 или от 1 до 5) аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с ферментом SEQ ID NO:1.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 содержит одну или более дополнительных блочных аминокислотных замен из гомологичной ДНКазы (например, из D1L3). Каждая из подобных замен блоков может заменять от 1 до 24 аминокислот, например от 3 до 15 аминокислот или от 3 до 10 аминокислот, из гомологичной ДНКазы. В отдельных вариантах осуществления вариант D1 содержит от 2 до 5 замен блоков из гомологичной ДНКазы (например, D1L3). В некоторых вариантах осуществления переносят 2 или 3 непосредственно следующие одна за другой замены структурных блоков.

В различных вариантах осуществления вариант D1 конструируют таким образом, чтобы содержать одну или более из следующих характеристик по сравнению с ферментом дикого типа: по существу одинаковую или более высокую активность разрушения депротеинизированной ДНК («оголенной» ДНК) (например, по меньшей мере 50% или более высокую), более высокую активность разрушения хромосомной ДНК, схожую или улучшенную устойчивость к протеазам, устойчивость к актину, повышенный период полувыведения из сыворотки, улучшенное проникновение из крови в мочу или желчь, или комбинацию подобных свойств.

В отдельных вариантах осуществления сконструированный фермент D1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50% (или по меньшей мере 70%, 80%, 90%) идентичности последовательности с С-концевым доменом белка D1L3 дикого типа (например, аминокислоты 283-305 SEQ ID NO:2).

В отдельных вариантах осуществления фермент D1 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 50% или по меньшей мере 75% идентичности последовательности с NLS1 D1L3 дикого типа (аминокислоты 35-51 SEQ ID NO:2), сигнал внутриядерной локализации 2 (NLS2), который имеет существенную

идентичность последовательности с NLS2 белка D1L3 дикого типа (аминокислоты 296-304 SEQ ID NO:2).

В различных аспектах, рекомбинантный вариант D1 содержит одну или более замен структурных блоков, выбранных из: замены 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) из SEQ ID NO:1 на 1-20 (MSRELAPLLL LLLSIHSALA) из SEQ ID NO:2; замены 23-27 (LKIAA) из SEQ ID NO:1 на 21-25 (MRICS) из SEQ ID NO:2; замены 30-32 (IQT) из SEQ ID NO:1 на 28-30 (VRS) из SEQ ID NO:2; замены 35-36 (ET) из SEQ ID NO:1 на 33-34 (ES) из SEQ ID NO:2; замены 38-47 (MSNATLVSYI) из SEQ ID NO:1 на 36-45 (QEDKNAMDVI) из SEQ ID NO:2; замены 49-52 (QILS) из SEQ ID NO:1 на 47-50 (KVIK) из SEQ ID NO:2; замены 54 (Y) из SEQ ID NO:1 на 52 (C) из SEQ ID NO:2; замены 56-60 (IALVQ) из SEQ ID NO:1 на 54-58 (IILVM) из SEQ ID NO:2;замены 62-63 (VR) из SEQ ID NO:1 на 60-61 (IK) из SEQ ID NO:2; замены 65-72 (SHLTAVGK) из SEQ ID NO:1 на 63-70 (SNNRICPI) из SEQ ID NO:2; замены 74-76 (LDN) из SEQ ID NO:1 на 72-74 (MEK) из SEQ ID NO:2; замены 79-84 (QDAPDT) из SEQ ID NO:1 на 77-84 (RNSRRGIT) из SEQ ID NO:2; замены 86 (H) из SEQ ID NO:1 на 86 (N) из SEQ ID NO:2; замены 88-89 (VV) из SEQ ID NO:1 на 88-89 (VI) из SEQ ID NO:2; замены 91-92 (EP) из SEQ ID NO:1 на 91-92 (SR) из SEQ ID NO:2; замены 96-97 (NS) из SEQ ID NO:1 на 96-97 (NT) из SEQ ID NO:2; замены 101 (R) из SEQ ID NO:1 на 101 (Q) из SEQ ID NO:2; замены 103 (L) из SEQ ID NO:1 на 103 (A) из SEQ ID NO:2; замены 105 (V) из SEQ ID NO:1 на 105 (L) из SEQ ID NO:2; замены 107-110 (RPDQ) из SEQ ID NO:1 на 107-110 (KEKL) из SEQ ID NO:2; замены 113-116 (AVDS) из SEQ ID NO:1 на 113-116 (VKRS) из SEQ ID NO:2; замены 118 (Y) из SEQ ID NO:1 на 118 (H) из SEQ ID NO:2, замены 120 (D) из SEQ ID NO:1 на 120 (H) из SEQ ID NO:2; замены 122-128 (GCEPCGN) из SEQ ID NO:1 на 122-127 (YQDGDA) из SEQ ID NO:2, замены 130 (TF) из SEQ ID NO:1 на 129 (V) из SEQ ID NO:2; замены 132 (N) из SEQ ID NO:1 на 131 (S) из SEQ ID NO:2; замены 136-137 (AI) из SEQ ID NO:1 на 135-136 (FV) из SEQ ID NO:2; замены 139 (R) из SEQ ID NO:1 на 138 (W) из SEQ ID NO:2; замены 141-144 (FSRF) из SEQ ID NO:1 на 140-143 (QSPH) из SEQ ID NO:2; замены 146-149 (EVRE) из SEQ ID NO:1 на 145-148 (AVKD) из SEQ ID NO:2; замены 151 (A) из SEQ ID NO:1 на 150 (V) из SEQ ID NO:2; замены 153 (V) из SEQ ID NO:1 на 152 (I) из SEQ ID NO:2; замены 157-158 (AA) из SEQ ID NO:1 на 156-157 (TT) из SEQ ID NO:2; замены 160-162 (GDA) из SEQ ID NO:1 на 159-161 (ETS) из SEQ ID NO:2; замены 164 (A) из SEQ ID NO:1 на 163 (K) из SEQ ID NO:2; замены 168 (A) из SEQ ID NO:1 на 167 (E) из SEQ ID NO:2; замены 170-171 (YD) из SEQ ID NO:1 на 169-171 (VE) из SEQ ID NO:2; замены 174 (L) из SEQ ID NO:1 на 173 (T) из SEQ ID NO:2; замены 177-179 (QEK) из SEQ ID NO:1 на 176-178 (KHR) из SEQ ID NO:2; замены 181-182 (GL) из SEQ ID NO:1 на 180-181 (KA) из SEQ ID NO:2; замены 184-187 (DVML) из SEQ ID NO:1 на 183-187 (NFIF) из SEQ ID NO:2; замены 199-202 (RPSQ) из SEQ ID NO:1 на 198-201 (PKKA) из SEQ ID NO:2; замены 204-205 (SS) из SEQ ID NO:1 на 203-204 (KN) из SEQ ID NO:2; замены 209 (W) из SEQ ID NO:1 на 208 (R) из SEQ ID NO:2; замены 211 (S) из SEQ ID NO:1 на 210 (D) из SEQ ID NO:2; замены 213 (T) из SEQ ID NO:1 на 212 (R) из SEQ ID NO:2; замены 215 (Q) из SEQ ID NO:1 на 214 (V) из SEQ ID NO:2; замены 219 (P) из SEQ ID NO:1 на 218 (G) из SEQ ID

NO:2; замены 221-222 (SA) из SEQ ID NO:1 на 220-221 (QE) из SEQ ID NO:2; замены 226-228 (ATP) из SEQ ID NO:1 на 225-228 (VKKS) из SEQ ID NO:2; замены 230 (H) из SEQ ID NO:1 на 230(N) из SEQ ID NO:2; замены 238-239 (VA) из SEQ ID NO:1 на 238-239 (LR) из SEQ ID NO:2; замены 241-246 (MLLRGA) из SEQ ID NO:1 на 241-246 (QEIVSS) из SEQ ID NO:2; замены 250-251 (D) из SEQ ID NO:1 на 250-251 (K) из SEQ ID NO:2; замены 252-254 (ALP) из SEQ ID NO:1 на 252-254 (NSV) из SEQ ID NO:2; замены 256 (N) из SEQ ID NO:1 на 256 (D) из SEQ ID NO:2; замены 259-260 (AA) из SEQ ID NO:1 на 259-260 (KA) из SEQ ID NO:2; замены 262 (G) из SEQ ID NO:1 на 262 (K) из SEQ ID NO:2; замены 264-267 (SDQ) из SEQ ID NO:1 на 264-267 (TEEE) из SEQ ID NO:2; замены 269-271 (QAI) из SEQ ID NO:1 на 269-271 (LDV) из SEQ ID NO:2; замены 275 (Y) из SEQ ID NO:1 на 275 (F) из SEQ ID NO:2; замены 279-280 (VM) из SEQ ID NO:1 с 279-280 (FK) из SEQ ID NO:2; и замены 282 (K) из SEQ ID NO:1 на 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) из SEQ ID NO:2.

Эти замены структурных блоков от D1L3 приводят к вариантам D1, которые имеют одну или более из следующих мутаций: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136_I137delinsFV, R139W, F141_F144delinsQSPH, E146_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157_A158delinsTT, G160_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170_D171delinsVE, L174T, Q177_K179delinsKHR, G181_L182delinsKA, D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA, S204_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N, V238_A239delinsLR, M241_A246delinsQEIVSS, D250K, A252_P254delinsNSV, N256D, A259_A260delinsKA, G262K, S264_L267delinsTEEE, Q269_I271delinsLDV, Y275F, V279_M280delinsFK, K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный вариант D1 содержит следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: Y275F, V279_M280delinsFK и K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16). Подобные варианты содержат С-концевой хвост и демонстрируют более высокую аффинность к ДНК-липидным комплексам.

В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный вариант D1 содержит следующие аминокислотные модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT (например, SEQ ID NO: 10); H86N и/или V88_V89delinsVI и/или E91_P92delinsSR (например, SEQ ID NO: 11, которая содержит все три); A136_I137delinsFV (например, SEQ ID NO: 12); R199_Q202delinsPKKA и/или S204_S205delinsKN, и/или W209R, и/или S211D, и/или T213R, и/или Q215V, и/или P219G, и/или S221_A222delinsQE (например, SEQ ID NO: 13, которая содержит все восемь); и A226_P228delinsVKKS (например, SEQ ID NO: 14).

В отдельных вариантах осуществления, в которых вариант D1 содержит замену H86N, вариант содержит по меньшей мере одну модификацию присоединением, такую как замена структурного блока или другая точечная мутация, описанные в настоящем изобретении (такую как присоединение катионной аминокислоты или замена, которая приводит к устойчивости к актину).

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 содержит по меньшей мере две смежные, непосредственно следующие одна за другой замены структурных блоков, которые приводят к мутациям, по сравнению с SEQ ID NO:1 : H86N/V88_V89delinsVI (например, SEQ ID NO: 11); R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE (например, SEQ ID NO: 13); Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16).

В отдельных вариантах осуществления изобретение относится к ферменту ДНКазе, содержащему аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности фермента, определенной SEQ ID NO:1, и содержит по меньшей мере одну замену структурного блока из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, где фермент ДНКаза имеет повышенную хроматин-разрушающую активность по сравнению с ферментом ДНКазой SEQ ID NO:1. В отдельных вариантах осуществления фермент содержит по меньшей мере две смежные замены структурных блоков из SEQ ID NO:2. Замены структурных блоков между D1 (SEQ ID NO:1) и D1L3 (SEQ ID NO:2) проиллюстрированы на **ФИГ. 31**.

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит следующую модификацию по сравнению с SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит следующую модификацию по сравнению с SEQ ID NO:1: H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: A136_I137delinsFV и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит две или более из следующих модификаций по сравнению с SEQ ID NO:1: R199_Q202delinsPKKA и/или S204_S205delinsKN и/или W209R и/или S211D и/или T213R и/или Q215V и/или P219G и/или S221_A222delinsQE и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 (которая содержит все восемь).

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: A226_P228delinsVKKS и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит две или более из

следующих модификаций по сравнению с SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT, и/или H86N, и/или V88_V89delinsVI, и/или E91_P92delinsSR, и/или A136_I137delinsFV, и/или R199_Q202delinsPKKA, и/или S204_S205delinsKN, и/или W209R, и/или S211D и/или T213R, и/или Q215V, и/или P219G, и/или S221_A222delinsQE, и/или A226_P228delinsVKKS и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15**.**

В отдельных вариантах осуществления фермент содержит две или более следующие модификацию по сравнению с SEQ ID NO:1:Y275F и/или V279_M280delinsFK и/или K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16**.**

Приводимые в качестве примера варианты D1 включают варианты, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16. Изобретение в отдельных вариантах осуществления содержит производные, имеющие от 1 до 10 (например, от 1 до 5) аминокислотных вставок, делеций или замен по сравнению с любыми из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В отдельных вариантах осуществления вариант D1 содержит одну или более дополнительных блочных аминокислотных замен из гомологичной ДНКазы (например, из D1L3). Подобные замены блоков могут заменять от 2 до 20 аминокислот, например от 3 до 15 аминокислот или от 3 до 10 аминокислот варианта D1, на аминокислоты структурного блока из гомологичной ДНКазы (например, D1L3, SEQ ID NO:2). Замены структурных блоков между D1 и D1L3 проиллюстрированы на **ФИГ. 31**. В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97% идентичной SEQ ID NO:15.

В различных вариантах осуществления фермент проявляет одно или более свойств, выбранных из: схожей или более высокой аффинности к депротеинизированной ДНК, по сравнению с ферментом SEQ ID NO:1, более высокой активности разрушения хроматина, по сравнению с ферментом SEQ ID NO:1, ферментативной активности, которая является устойчивой к ингибированию актином по сравнению с ферментом SEQ ID NO:1, и их комбинации.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 содержит N-концевое или C-концевое слияние с функциональной группой, увеличивающей период полувыведения, такой как альбумин, трансферрин, Fc или эластин-подобный белок, как описано для D1L3. В отдельных вариантах осуществления фермент D1 димеризуют с помощью шарнирной области иммуноглобулина.

В различных вариантах осуществления вариант D1 проявляет одно или более свойств, выбранных из: одинаковой или более высокой активности разрушения депротеинизированной ДНК («оголенной» ДНК), более высокой активности разрушения хромосомной ДНК (хроматина), схожей или улучшенной устойчивости к протеазам, устойчивости к актину, схожего или улучшенного проникновения из крови в мочу и/или желчь и более высоких уровней продуцирования в системах экспрессии in vitro (например,

клеток яичника китайского хомяка и/или *Pichia pastoris*), и их комбинации.

В различных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности фермента, определенной SEQ ID NO:1, и содержит замену, вставку или присоединение одного или более остатков аргинина и/или лизина, при этом фермент ДНКаза имеет повышенную хроматин-разрушающую активность по сравнению с ферментом SEQ ID NO:1. В отдельных вариантах осуществления один или более остатков аргинина и/или лизина представляют собой аминокислотные замены, выбранные из замен в положениях, соответствующих положениям 31, 41, 49, 52, 68, 76, 79, 81, 92, 109, 114, 115, 164, 177, 181, 200, 201, 204, 209, 213, 227, 239, 250, 259, 262 и 280 SEQ ID NO:1. Приводимые в качестве примера модификации в этих положениях включают Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K и K280M. В различных вариантах осуществления фермент содержит замену и/или вставку по меньшей мере двух или по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех или по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести остатков аргинина и/или лизина. В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит аргинин или лизин в одном или более положениях, соответствующим положениям 31, 49, 76, 79, 92, 109, 164, 177, 200, 201, 204, 209, 213 и 262 SEQ ID NO:1, которые необязательно выбраны из Q31R, Q49R, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, W209R и G262K. Эти положения/замены могут самостоятельно обеспечить более высокую активность, в том числе активность разрушения хроматина.

В различных вариантах осуществления, если фермент содержит замены Q31R или T227K, фермент содержит по меньшей мере две аминокислотные модификации, выбранные из Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K и K280M. В отдельных вариантах осуществления аминокислотные замены включают Q31R и T227K по сравнению с SEQ ID NO:1.

В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза имеет аргинин или лизин в положениях, соответствующих положениям 31, 49, 79, и 209 SEQ ID NO:1, и может необязательно содержать следующие аминокислотные замены: Q31R, Q49K, Q79R и W209R. Эти положения несут аргинин или лизин у D1 мыши, но не у D1 человека дикого типа, и могут переносить хроматин-разрушающую активность в D1 человека.

В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза имеет аргинин или лизин в положениях, соответствующих положениям 31, 49, 79, 177, 209, и 262 SEQ ID NO:1, и может необязательно содержать аминокислотные замены Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K. Четыре из этих положений несут аргинин или лизин у D1 крысы, но не у D1 человека дикого типа, и вместе могут переносить разрушающую хроматин

активность в D1 человека.

В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза имеет остаток лизина или аргинина в положениях, соответствующих положениям 31 и 227 SEQ ID NO:1.

В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза имеет лизин или аргинин в положении, соответствующем положению 164 SEQ ID NO:1, которое необязательно содержит лизин (A164K).

В различных вариантах осуществления сконструированный белок D1 содержит одну или более аминокислотных модификаций (например, замен, присоединений и делеций) в сайте связывания актина (например, замену A136, такую как A136F) и тем самым препятствуя или предотвращая связывание актина. Таким образом, сконструированный белок D1 может быть резистентным к актину или по существу резистентным к актину. Смотри Ulmer et al., *PNAS USA* Vol. 93, pp 8225-8229 (1996). В связи с этим, в различных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит аминокислотную замену в положении 136 по сравнению с SEQ ID NO:1 и необязательно содержит A136F. Мутации в D1 обеспечивающие устойчивость к актину, такие как мутации в положении 136 (например, A136F или замена другой объемной, гидрофобной, циклической или ароматической аминокислоты в этом положении), могут сочетаться с любой другой мутацией, описанной в настоящем изобретении, в том числе присоединением катионных остатков или заменами структурных блоков.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 является устойчивым к ингибированию актином и способен разрушать хроматин. Например, вариант D1 может содержать следующие аминокислотные замены: Q31R, T227K и A136F по сравнению с SEQ ID NO:1. В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит следующие аминокислотные замены: A164K и A136F.

В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКаза содержит консенсусную последовательность гликозилирования, которая содержит замену N40S и/или замену N128S по сравнению с SEQ ID NO:1. Например, в некоторых вариантах осуществления фермент содержит аминокислотные замены: Q31R, N40S, A136F, N128S и T227K по сравнению с SEQ ID NO:1.

В различных вариантах осуществления вариант D1 содержит одну или более аминокислотных модификаций (например, замен, присоединений, вставок и делеций) в сайтах гликозилирования и тем самым повышая аффинность к инкапсулированной в липиды ДНК. Таким образом, сконструированный белок D1 может разрушать липид-инкапсулированную ДНК в реакциях трансфекции. Смотри Wilber et al., *Mol Ther* 6, 35-42 (2002).

В различных вариантах осуществления вариант D1 является гликозилированным или может быть негликозилированным, особенно в том случае, в котором не требуется длительный период полувыведения из кровообращении. Изменения аминокислотного состава, описанные в настоящем изобретении, могут быть осуществлены в контексте гликозилированных или негликозилированных вариантов.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 является устойчивым к ингибированию актином и способен разрушать хроматин внутри липидных везикул. Приводимые в качестве примера варианты D1 содержат одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из: Q31R, T227K, A136F, N40D или N40A и N128D или N128S, с аминокислотами, пронумерованными в соответствии с SEQ ID NO:1. В подобных вариантах могут отсутствовать сайты гликозилирования, которые выгодны с точки зрения производства.

В отдельных вариантах осуществления вариант D1 является устойчивым к ингибированию актином и способен разрушать хроматин внутри липидных везикул и содержит аминокислотные модификации Q31R, T227K, A136F, N40D и N128D по сравнению с SEQ ID NO:1.

Другие модификации D1 могут быть такими, как описано у Pan et al. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11701-11708 и в US 2014/0199329, полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Сконструированный вариант D1 может иметь повышенный или увеличенный период полувыведения из сыворотки, по сравнению с белком D1 дикого типа (SEQ ID NO:1). В отдельных вариантах осуществления сконструированный D1 содержит гибридный домен Fc (например, шарнирную область и/или CH2 домены и домены CH3 иммуноглобулина). В отдельных вариантах осуществления сконструированный D1 гибридизуют с альбумином, например альбумином человека или его фрагментом. Альбумин может быть присоединен к N-концу или C-концу сконструированного фермента D1, необязательно через аминокислотный линкер.

В некоторых аспектах, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим рекомбинантные варианты D1L3 и/или D1 или полинуклеотиды или векторы, кодирующие то же самое, и фармацевтически приемлемый носитель. В различных вариантах осуществления рекомбинантный вариант белка D1L3 составляют в виде препарата для парентерального введения или введения ингаляционным способом. В отдельных вариантах осуществления композицию составляют для внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутрисуставного, внутримышечного, местного или подкожного введения или другим путем, описанным в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления композиция содержит и D1L3, и D1, каждый из которых необязательно представляет собой сконструированные варианты, описанные в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления рекомбинантный вариант D1L3 и рекомбинантный вариант D1 составляют для парентерального введения или введения ингаляционным способом

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» содержит, но без ограничения этим, любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности ингредиентов и не является токсичным для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом физиологические растворы, воду, эмульсии, такие как

водно-масляные эмульсии, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т. д. Подобные носители могут быть составлены стандартными способами и могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно, композиции являются стерильными. Эти композиции также могут содержать такие вспомогательные вещества, как консервант, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых средств.

Пути введения включают, например: внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрисуставный, внутривенный, подкожный, внутриартериальный, пероральный, сублингвальный, ингаляционный или чрескожный. В отдельных вариантах осуществления введение осуществляют перорально или путем парентеральной инъекции или инфузии. В отдельных вариантах осуществления путь введения является местным, в том числе как глазные капли или ополаскиватель.

В дополнительных иных аспектах изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции для снижения или профилактики накопления нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). В этих вариантах осуществления в изобретении используют генетически модифицированную мышь, дефицитную по активности D1 и D1L3, и гетерологичную экспрессию полинуклеотида G-CSF (например, в клетках печени) или индукцию устойчивой эндогенной экспрессии G-CSF (например, посредством повторного введения микробных соединений). У этой мышиной модели накапливаются НВЛ и быстро развиваются связанные с НВЛ окклюзии сосудов. В этих вариантах осуществления изобретение включает введение потенциального ингибитора НВЛ или потенциального фермента ДНКазы (в том числе варианта D1L3 или D1 в соответствии с этим раскрытием) генетически модифицированной мыши, и выбор ингибитора НВЛ или фермента ДНКазы, что снижает накопление НВЛ. Выбранный ингибитор или фермент составляют в виде препарата (как описано) для введения пациенту-человеку.

Специалист в данной области техники признает стандартные способы создания двойных нокаутных *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Подробные описания можно найти в, например, Европейской патентной заявке № EP 17152528.0.

В некоторых аспектах, изобретение относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в разрушении нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ). Способ включает введение терапевтически эффективного количества D1L3 и/или D1 (который может содержать варианты, описанные в настоящем изобретении, или в некоторых вариантах осуществления один или более ферментов дикого типа, в том числе для комбинированной терапии D1L3 и D1) в соответствии с этим раскрытием. D1L3 или D1 могут быть введены в виде фармацевтических композиций, содержащих рекомбинантный белок, или в некоторых вариантах осуществления, содержащих кодирующую ДНК или РНК, или векторы, содержащие то же самое.

В отдельных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически

эффективного количества D1L3 или его варианта и D1 или его варианта. D1L3 или его вариант и D1 или его вариант могут быть введены в одной фармацевтической композиции или в различных фармацевтических композициях. В отдельных вариантах осуществления соотношение D1L3 или его варианта к D1 или его варианту лежит в диапазоне от 100:1 до 1:100 по массе или от 10:1 до 1:10 по массе и составляет необязательно приблизительно 1:1.

В отдельных вариантах осуществления субъект демонстрирует нарушенное разрушение НВЛ и/или демонстрирует патологическое накопление НВЛ. В отдельных вариантах осуществления субъект имеет хроническое или острое воспалительное заболевание. В отдельных вариантах осуществления субъект имеет острую или хроническую инфекцию.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению заболеваний или состояний, характеризующихся присутствием или накоплением НВЛ. Подобные заболевания или состояния включают, но без ограничения этим, заболевания, связанные с хронической нейтрофилией (например, ростом количества нейтрофилов), агрегацией нейтрофилов и лейкостазом, тромбозом и окклюзией сосудов (например, серповидно-клеточной болезнью), ишемически-реперфузионным повреждением (например, заворотом средней кишки, перекрутом семенного канатика, ишемией-реперфузией конечностей, ишемией-реперфузией жизненно-важных органов, трансплантацией органов), хирургическим и травматическим повреждением тканей, острой или хронической воспалительной реакцией или болезнью, аутоимунным заболеванием (например, системной красной волчанкой (СКВ), волчаночным нефритом, ревматиодным артритом, васкулитом, системным склерозом), кардиоваскулярной болезнью (например, инфарктом миокарда, инсультом, атеросклерозом, венозным тромбоэмболизмом, в том числе тромболитической терапией), метаболическим заболеванием (например, диабетом), системным воспалением (например, синдромом системной воспалительной реакции (SIRS), сепсисом, септическим шоком, рассеянной внутрисосудистой коагуляцией (DIC) и тромботической микроангиопатией (TMA)), воспалительными заболеваниями дыхательных путей (например, муковисцидозом, хронической обструктивной болезнью легких (COPD), острым повреждением легких (ALI), вызванным курением повреждением легких, синдромом острого посттрансфузионного повреждения легких (TRALI), острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS) и астмой, ателектазом, бронхитом, эмпиемой), воспалительными заболеваниями почек (острыми и хроническими заболеваниями почек, в том числе острой почечной недостаточностью (AKI) и хронической болезнью почек (CKD), воспалительными заболеваниями, связанными с трансплантированной тканью (например, реакцией трансплантат против хозяина) и раком (например, лейкемией, метастазированием опухоли и солидными опухолями).

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску НВЛ, которые вызывают окклюзии систем протоков. Настоящее изобретение может быть введено субъекту с целью лечения панкреатита, холангита, конъюнктивита, мастита, синдрома сухого глаза, нарушения проходимости семявыносящего протока или болезнью почек. В

подобных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта. Например, субъекту может быть введен фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2, и фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:1. В отдельных вариантах осуществления ферменты содержат аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2, и аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:1.

В отдельных вариантах осуществления система протоков представляет собой желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, выводной проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень. Например, субъект может иметь панкреатит, холангит (например, первичный склерозирующий холангит), конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек. В отдельных вариантах осуществления фермент ДНКазу вводят путем внутривенного, внутриартериального или внутрибрюшинного введения. В различных вариантах осуществления ДНКаза при применении, например внутривенно, будет присутствовать в ферментативно активной форме в различных системах протоков, например в желчной жидкости.

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску накапливания НВЛ на эндотелиальных поверхностях (например, спайках, вызванных хирургическим вмешательством), коже (например, раны/рубцы) или в синовиальных соединениях (например, подагра и артрит). Настоящее изобретение может быть введено субъекту с целью лечения состояния, которое характеризуется накоплением НВЛ на эндотелиальной поверхности, такого как, но без ограничения этим, спайки после хирургического вмешательства. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение может быть введено субъекту с целью лечения состояния, которое характеризуется накоплением НВЛ на коже, такого как, но без ограничения этим, раны и шрамы. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение может быть введено субъекту с целью лечения состояния, которое характеризуется накоплением НВЛ в синовиальных соединениях, такого как, но без ограничения этим, подагра и артрит.

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску окклюзии сосудов, содержащих НВЛ. В подобных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта. Например, субъекту может быть введен фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80%

или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2. В отдельных вариантах осуществления фермент содержит аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2. В отдельных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:1, такого как фермент, который определен SEQ ID NO:1.

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет состояние, которое относится к НВЛ, как описано в WO 2016/118476 и US 9642822, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

В различных вариантах осуществления субъект имеет заболевание, которое лечат или лечили с помощью ДНКаз дикого типа, в том числе D1 и стрептодорназы. Подобные заболевания или состояния включают тромбоз, инсульт, сепсис, повреждение легких, атеросклероз, вирусную инфекцию, серповидно-клеточную болезнь, инфаркт миокарда, воспаление среднего уха, заживление ран, поражение печени, эндокардит, инфекцию печени, панкреатит, первичную дисфункцию трансплантата, ишемию/реперфузию конечностей, поражение почек, коагуляцию крови, индуцированное квасцами воспаление, гепаторенальное повреждение, плевральные экссудации, гемоторакс, внутрипеченочные тромбы, постпневматическую анемию, язвы, отоларингологические состояния, инфекции ротовой полости, незначительные повреждения, синусит, послеоперационные ринопластики, бесплодие, мочевой катетер, обработку раны, тест кожной реакции, пневмококковый менингит, подагру, ножные язвы, муковисцидоз, синдром Картагенера, астму, лобарный ателектаз, хронический бронхит, бронхоэктаз, волчанку, первичную цилиарную дискинезию, бронхиолит, эмпиему, плевральные инфекции, рак, синдром сухого глаза, инфекции нижних дыхательных путей, хронические гематомы, болезнь Альцгеймера и обструктивное заболевание легких.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к лечению заболеваний или состояний, характеризующихся дефицитом D1, дефицитом D1L3 и дефицитом D1 и D1L3. В некоторых случаях, субъект имеет мутацию в гене *ДНКазы1* и/или *ДНКазы1l3*. Подобные субъекты могут также иметь аутоимунное заболевание (например, СКВ, системный склероз) или воспалительное заболевание. В некоторых случаях, субъект имеет приобретенный ингибитор D1(например, антитело против ДНКазы1 и актин) и/или D1L3 (например, антитело против ДНКазы1l3). Подобные субъекты могут также иметь аутоимунное заболевание (например, СКВ, системный склероз) или воспалительное заболевание (например, сепсис и ишемически-реперфузионное повреждение).

В отдельных вариантах осуществления субъект имеет муковисцидоз, а композицию ДНКазы вводят посредством ингаляционной доставки.

В различных вариантах осуществления, например если субъект подвержен риску или проявляет симптомы связанной с НВЛ окклюзии сосудов, белок или композиция (например, содержащие D1L3, D1 или вариант D1L3 или D1, в том числе варианты,

описанные в настоящем изобретении) могут быть введены внутривенно, внутримышечно, подкожно или внутриартериально.

В различных вариантах осуществления субъект проверяют на разрушающую НВЛ активность крови, плазмы или сыворотки. Например, субъект может проверяться в течение от приблизительно одной недели до приблизительно четырех недель, для уменьшения риска окклюзии сосудов или протоков из-за НВЛ, или связанного с НВЛ повреждения органов. В отдельных вариантах осуществления субъект может получать от одного до четырех введений в течение от одной недели до одного месяца (или 1-2 недель), при необходимости для предотвращения или снижения внутрисосудистого накопления НВЛ (в том числе связанных с НВЛ внутрисосудистых окклюзий) во время острой инфекции или воспалительного события. В других вариантах осуществления субъект может получать непрерывную инфузию в течение от одного часа до одного месяца (или 1-2 недель). В некоторых случаях, субъект может получать по меньшей мере одну, например 1, 2, 3, 4 или более инфузий ежедневно, например (без ограничения этим), в случае такого критического заболевания, как сепсис, инсульт или инфаркт миокарда.

Лечение заболевания или состояний, связанных с НВЛ, может включать введение варианта D1, варианта D1L3 или комбинации, содержащей вариант D1 и вариант D1L3. В отдельных вариантах осуществления вводят два или более из вариантов белка D1, описанных в настоящем изобретении. В отдельных вариантах осуществления вводят два или более из вариантов белка D1L3, описанных в настоящем изобретении.

Представленные варианты белка D1 и варианты белка D1L3 могут быть введены в качестве профилактической терапии, такой как перед появлением одного или более симптомов заболевания или состояния.

В рамках изобретения, термин «лечение» или «получать лечение», или «получивший лечение» соответствует терапевтическому лечению, при котором цель состоит в том, чтобы замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое состояние, расстройство или болезнь, или получить полезные или желательные клинические результаты. Полезные или желательные клинические результаты включают, но без ограничения этим, частичное снятие симптомов; уменьшение степени состояния, расстройства или заболевания; стабилизацию (*m. e.*, не ухудшение) статуса состояния, расстройства или заболевания; задержку наступления или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; облегчение состояния, расстройства или заболевания; и ремиссию (либо частичную, либо полную), независимо от того, обнаруживаемые они или не обнаруживаемые, или усиление или улучшение состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает выявление клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. В других вариантах осуществления термин «лечение», или «получать лечение», или «получивший лечение» соответствует профилактическим мерам, при которых целью является задержка наступления или снижение тяжести нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, такого как, например, у пациента, который предрасположен к заболеванию (например, человека, который несет

генетический маркер заболевания, такого как волчанка).

В способах по изобретению терапию используют для обеспечения положительного терапевтического ответа относительно заболевания или состояния. Под «положительным терапевтическим ответом» подразумевают положительную динамику заболевания или состояния и/или положительную динамику в симптомах, связанных с заболеванием или состоянием. Например, положительный терапевтический ответ будет означать одну или более из следующих положительных динамик при заболевания: (1) редукцию нейтрофильных внеклеточных ловушек; (2) редукцию внутрисосудистых сгустков; (3) редукцию сгустков в протоках; (4) редукцию накопления НВЛ в синовиальных соединениях; (5) повышение разрушения нейтрофильных внеклеточных ловушек; (6) повышение разрушения внеклеточной депротеинизированной ДНК; (7) повышение разрушения внеклеточной хромосомной ДНК или связанной с белком ДНК; (8) повышение разрушения нейтрофильных внеклеточных ловушек в присутствии аутоантител; (9) редукцию воспаления в ткани/органе; (10) редукцию повреждения ткани/органа; (11) редукцию атрофии ткани/органа; (12) повышение уровня выживаемости пациента; и (13) некоторого успокоения одного или более симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

Положительные терапевтические ответы при любом заболевании или состоянии могут быть определены по стандартизированным критериям ответа, характерным для этой заболевания или состояния. Клинический ответ может оцениваться на предмет изменений окклюзии сосудов и присутствие НВЛ с применением методов скрининга, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ), ультразвуковое сканирование, гистологический анализ и подсчет НВЛ в кровообращении. В дополнение к этим положительным терапевтическим ответам субъект, который подвергают прохождению терапии, может испытывать положительный эффект улучшения симптомов, связанных с болезнью.

Режимы дозировки устанавливают для того, чтобы обеспечить оптимальный требуемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить в соответствии с показаниями терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде стандартных лекарственных форм для упрощения введения и унификации дозирования. Стандартная лекарственная форма, в рамках изобретения, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту, которая кодирует дикий тип или вариант D1L3 или D1, описанные в настоящем изобретении, который может найти применение для генной терапии. Генная терапия может быть полезна при хроническом заболевании, таком

как генетический дефицит D1L3 и/или D1 (например, вредная мутация). В различных вариантах осуществления вектор экспрессии содержит ДНК или РНК. В различных вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой вектор экспрессии млекопитающего.

В отдельных вариантах осуществления векторы экспрессии содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую варианты белка и функционально связанную с областью контроля экспрессии или комплементарной ей областью, которая функционирует в клетке-хозяине (например, прокариотической, эукариотической или клетке млекопитающего). Область контроля экспрессии способна управлять экспрессией функционально связанных блокирующих и/или стимулирующих средств, кодирующих нуклеиновую кислоту, таким образом, что блокирующее и/или стимулирующее средство продуцируется в клетке человека, трансформированной с вектором экспрессии.

Области контроля экспрессии представляют собой регуляторные полинуклеотиды (иногда упоминаемые в настоящем изобретении как элементы), такие как промоторы и энхансеры, которые влияют на экспрессию функционально связанной нуклеиновой кислоты. Область контроля экспрессии вектора экспрессии изобретения способна экспрессировать функционально связанную кодирующую нуклеиновую кислоту в клетке человека. В отдельном варианте осуществления область контроля экспрессии придает индуцибельную экспрессию функционально связанной нуклеиновой кислоте. Сигнал (иногда называемый стимулом) может увеличивать или уменьшать экспрессию нуклеиновой кислоты, функционально связанной с такой областью контроля экспрессии. Подобные области контроля экспрессии, которые повышают экспрессию в ответ на сигнал часто называют индуцибельными. Подобные области контроля экспрессии, которые понижают экспрессию в ответ на сигнал часто называют репрессируемыми. Обычно, величина увеличения или уменьшения, присущая таким элементам, пропорциональна количеству присутствующего сигнала; чем больше количество сигнала, тем больше увеличение или уменьшение экспрессии.

Функционирующие в клетках человека системы экспрессии хорошо известны в данной области техники и включают вирусные системы. Как правило, функционирующий в клетке человека промотор представляет собой любую последовательность ДНК, способную связывать РНК-полимеразу млекопитающего и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности по ходу транскрипции (3') в мРНК. Промотор будет иметь область инициации транскрипции, которая обычно располагается проксимально к 5'-концу кодирующей последовательности, и обычно ТАТА-бокс, расположенный на 25-30 пар оснований против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции. Предполагается, что ТАТА-бокс направляет РНК-полимеразу II к началу синтеза РНК в правильном сайте. Промотор также обычно будет содержать промоторный элемент (энхансерный элемент) против хода транскрипции, обычно расположенный в пределах 100-200 пар оснований против хода транскрипции ТАТА-бокса. Промоторный элемент против хода транскрипции определяет скорость, с которой запускается транскрипция и может действовать в любой

ориентации. Особое использование в качестве промоторов представляют собой промоторы из вирусных генов млекопитающих, поскольку вирусные гены, которые часто экспрессируются на высоком уровне, имеют широкий спектр хозяев. Примеры включают ранний промотор SV40, промотор LTR вируса опухоли молочной железы мышей, главный поздний промотор аденовируса, промотор вируса простого герпеса и промотор CMV.

Где это уместно, также могут быть использованы такие средства доставки генов, как, *например*, последовательности интеграции. В данной области техники известно множество последовательностей интеграции (*смотри*, *например*, Nunes-Duby *et al.*, Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk *et al.*, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). К ним относятся рекомбиназы и транспозазы. Примеры включают Cre (Sternberg и Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), лямбда (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp (Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R (Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31 (*см.*, *например*, Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004), «спящая красавица», транспозазы семейства mariner (Plasterk *et al.*, выше) и компоненты для интегрирования таких вирусов, как AAV, ретровирусов и антивирусов, имеющих компоненты, которые обеспечивают интеграцию вирусов, такие как последовательности LTR ретровирусов или лентивируса и последовательности ITR AAV (Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). В дополнение, могут применяться стратегии прямой и адресной генетической интеграции для вставки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей химерные слитые белки, в том числе CRISPR/CAS9, цинковый палец, TALEN и технологии редактирования генов мегануклеазами.

Все цитируемые ссылки полностью включены в настоящий документ посредством ссылок во всей своей полноте.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: ДНКазы хозяина предотвращают окклюзия сосудов нейтрофильными внеклеточными ловушками

Тромбоциты и сгустки фибрина закупоривают кровеносные сосуды при гемостазе и тромбозе. Здесь сообщается о неканоническом механизме окклюзии сосудов вследствие нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), волокон антимикробных ДНК, высвобождаемых активированными нейтрофилами. Было показано, что две ДНКазы, ДНКаза1 и ДНКаза1-подобный фермент 3, разрушают НВЛ в кровообращении во время эпизодов воспаления у мышей. В отсутствии обеих ДНКаз, внутрисосудистые НВЛ образуют сгустки, которые закупоривают кровеносные сосуды и вызывают повреждение организма. Окклюзии сосудов у пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями связаны с дефектом, разрушающим НВЛ ex vivo, и образованием внутрисосудистых сгустков НВЛ. ДНКаза1 и ДНКаза1-подобный фермент 3 экспрессируются независимо и, таким образом, обеспечивают двойную защиту хозяина от вредных действий НВЛ при воспалении.

Воспаление представляет собой важный ответ хозяина для борьбы с вторгающимися

микробами и заживления поврежденных тканей (1). Неконтролируемое и персистирующее воспаление вызывает повреждение тканей при большом количестве воспалительных заболеваний. Нейтрофилы при остром воспалении являются доминирующими лейкоцитами. Во время инфекции нейтрофилы генерируют внеклеточные ловушки (НВЛ), решетки ДНК-филаментов, декорированных токсичными гистонами и ферментами, которые иммобилизируют и нейтрализуют бактерии (2). Релевантность НВЛ в защите хозяина иллюстрируется фактом, что у нескольких патогенных бактерий внеклеточные ДНКазы служат в качестве факторов вирулентности (3, 4). Тем не менее, высвобожденные по ошибке НВЛ могут нанести вред клеткам-хозяевам из-за их цитотоксической, противовоспалительной и протромботической активности (5-7). Следует отметить, что НВЛ часто связаны с воспалительным или ишемическим повреждением органов, а терапевтическая инфузия ДНКаз ограничивает поражение хозяина в различных животных моделях (8, 9).

То, каким образом хозяин разрушает НВЛ in vivo для ограничения повреждения ткани во время эпизодов воспаления изучено плохо. Исследования ранее показали, что ДНКаза1 в сыворотке расщепляет ДНК-остов НВЛ in vitro (10). Была проанализирована сыворотка от мышей дикого типа путем зимографии и обнаружены две ферментативно активные ДНКазы, ДНКаза1 и ДНКаза1-подобный фермент 3 [(ДНКаза1l3) (ФИГ. 1A). Оба фермента являются членами семейства белков ДНКазы1, но различаются по своему происхождению и аффинности к субстрату. ДНКаза1 экспрессируется некроветворными тканями и, предпочтительно, расщепляет депротеинизированную ДНК (11,12). ДНКаза1l3, также известная как ДНКаза γ, секретируется иммунными клетками и воздействует на комплексы ДНК-белок, такие как нуклеосомы (11,13). Были созданы мыши, которые испытывают недостаток разрушающей ДНК активности в сыворотке из-за комбинированного дефицита ДНКазы1 и ДНКазы1l3 (ФИГ. 1A). In vitro созданные НВЛ остаются интактными после воздействия ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- сыворотки, тогда как сыворотка от мышей дикого типа, ДНКаза1-/- и ДНКаза1l3- /- мышей разрушает НВЛ (ФИГ. 1B и ФИГ. 1C). Была использована гепатоцит-специфическая экспрессия плазмид в сочетании с гидродинамической доставкой генов для стабильной экспрессии кДНК ДНКазы1 или ДНКазы1l3 в печени ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей. Учитывая, что оба фермента содержат сигнальную последовательность секреторного белка (11), этот подход восстанавливает активность ДНКазы1 или ДНКазы1l3 в кровообращении (ФИГ. 1D) и способность сыворотки от ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей разрушать НВЛ (ФИГ. 1E и ФИГ. 1F). Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что два независимо экспрессированных фермента хозяина, ДНКаза1 и ДНКаза1l3, разрушают НВЛ in vitro.

Чтобы проверить требование к ДНКазе1 и ДНКазе1l3 разрушать НВЛ in vivo, была поставлена цель длительно стимулировать мышей дикого типа, ДНКаза1-/-, ДНКаза1l3-/- и ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). G-CSF служит триггером нейтрофилии, отличительной чертой острого воспаления, и стимулирует субпопуляцию нейтрофилов к спонтанному высвобождению

НВЛ ex vivo (14). Была клонирована кДНК CSF3, которая кодирует G-CSF, в гепатоцит-специфической плазмиде экспрессии. Гидродинамическая инъекция мышам дикого типа плазмид CSF3 приводит к длительно повышенным уровням G-CSF в плазме (ФИГ. 5A). Следовательно, количество нейтрофилов в крови постоянно повышено, а в мазках крови были обнаружены спонтанно образованные НВЛ (ФИГ. 2A и ФИГ. 2B). Кроме того, наблюдалось повышенное количество остаточных нейтрофилов в жизненно-важных органах и спленомегалия (ФИГ. 5B и ФИГ. 5C). Важно отметить, что мыши дикого типа, которым инъецировали CSF3, росли нормально, у них не развивалось повреждение органов и у них не было макроскопических признаков дистресса или аномального поведения (ФИГ. 5D и ФИГ. 5E). В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что хроническая нейтрофилия с сопутствующим образованием НВЛ у мышей дикого типа переносится хорошо.

Далее, CSF3 стабильно экспрессируется в печени ДНКаза1-/-, ДНКаза1l3-/- и ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей. Мыши с отдельным дефицитом ДНКазы1 или ДНКазы1l3 не демонстрируют признаки дистресса (не показаны), тогда как все мыши с комбинированной недостаточностью умирают в течение 6 дней после инъекции CSF3 (ФИГ. 2C). ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мыши, получавшие контрольную плазмиду, которые испытывают недостаток CSF3, выживали без каких-либо отклонений (ФИГ. 2C, не показано). ДНКаза1 или ДНКаза1l3 коэкспрессируются с CSF3 у ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей для индуцирования нейтрофилии и НВЛ и одновременно с этим восстанавливает ДНКазу1 или ДНКазу1l3 в кровообращении. Экспрессия любой ДНКазы была достаточной для того, чтобы ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мыши выживали без каких-либо признаков дистресса (ФИГ. 2D). ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мыши, которые коэкспрессируют *CSF3* с контрольной плазмидой, которые испытывают недостаток *ДНКазы1* и *ДНКазы1l3*, умирают в течение 5 дней после доставки гена (ФИГ. 2D). Смертности у этих мышей предшествовала быстро прогрессирующая гипотермия, о чем свидетельствовало сильное снижение периферической температуры тела в течение 8 часов перед летальным исходом (ФИГ. 2E). Гипотермия сопровождалась гемолитической анемией с красноватой плазмой и мочой и снижала гемоглобин в крови (ФИГ. 2F и ФИГ. 2G). Обильные шизоциты в мазках крови указывали на то, что гемолитическая анемия была вызвана фрагментацией эритроцитов (ФИГ. 2H). Кроме того, были обнаружены повышенные уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме, трансаминаз печени и маркеров повреждения почек: азот мочевины и креатинин в крови, что указывает на множественное повреждение органов (ФИГ. 2I, ФИГ. 6A и ФИГ. 6B). Коэкспрессия *ДНКазы1* или *ДНКазы1l3* с *CSF3* поддерживает температуру тела и целостность эритроцитов и органов (от ФИГ. 2E до ФИГ. 2I; ФИГ. 6A и ФИГ. 6B). В заключение, эти данные указывают на то, что при хронической нейтрофилии для предотвращения поражения хозяина требуются либо ДНКаза1, либо ДНКаза1l3.

Гистологический анализ ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей с хронической нейтрофилией демонстрирует внутрисосудистые гематоксилин-положительные сгустки с

захваченными эритроцитами, которые полностью или частично закупоривают кровеносные сосуды в легких, печени и почках (ФИГ. 3A и B; ФИГ. 6C и ФИГ. 6D). Экспрессия ДНКазы1 или ДНКазы1l3 в кровообращении предотвращает эти окклюзии сосудов. Гематоксилин-положительные сгустки демонстрируют обильное окрашивание в светло-фиолетовый цвет, которое спорадически испещрено темно-фиолетовым окрашиванием отдельных ядер лейкоцитов, предполагая, что деконденсированная ДНК является основным компонентом сгустка (ФИГ. 3A). Учитывая, что распад ядра и развертывание плотно упакованного хроматина является отличительной чертой образования НВЛ (*15*), окрашивали гематоксилин-положительные сгустки на маркеры НВЛ. Наблюдали устойчивое окрашивание с помощью флуоресцентных интеркалирующих в двухцепочечные ДНК красителей и антител против хроматина. (ФИГ. 7A). Совместное размещение деконденсированного хроматина с ферментом миелопероксидазой, возникшим из гранул нейтрофилов, антимикробными кателицидиновыми пептидами и цитруллинированными гистонами НВЛ-идентифицирующего маркера подтвердили, что сгустки состоят из НВЛ (ФИГ. 3C, ФИГ. 7B и ФИГ. 7C). Для идентификации компонентов канонических тромбов, окрашивали сгустки НВЛ на фибрин и фактор фон Виллебранда (ФФВ), белок размещался в секреторных пузырьках тромбоцитов и эндотелии сосудов. Сгустки НВЛ были очень неоднородны по их содержанию ФФВ и фибрина (ФИГ. 3D и ФИГ. 3E). Сечения сгустков НВЛ были в среднем на 46% покрыты ФФВ, тогда как 9% сгустков НВЛ на ФФВ не окрашивались (ФИГ. 3E и ФИГ. 3F). Фибрин в значительной степени отсутствовал и был обнаружен менее чем в 23% окклюзированных сосудов (ФИГ. 3E). Эти данные соответствуют выводам о том, что НВЛ служат фибрин-независимым каркасом для иммобилизации тромбоцитов и эритроцитов *in vitro* (*6*). Отсутствие ФФВ и фибрина в некоторых сгустках предполагает, что для окклюзии сосудов может быть достаточно НВЛ. Чтобы подтвердить этот факт, была поставлена цель создать сгустки НВЛ из чистых нейтрофилов *in vitro*. Из крови выделяли нейтрофилы и индуцировали образование НВЛ, подвергая клетки воздействию сдвигающего усилия, имитирующего кровоток. В этой установке наблюдали макроскопически видимые и чувствительные к ДНКазе сгустки (ФИГ. 8A), которые напоминали внешний вид сгустков НВЛ внутри сосудистой сети мыши (ФИГ. 8B). В таких условиях из кровообращения элиминировали тромбоциты и фармакологически ингибированный тромбин с целью блокирования образования фибрина у экспрессирующих *CSF3* ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей. В отличие от экспрессии ДНКазы1 или ДНКазы1l3, антитромботическое лечение не может предотвратить смертность у этих животных (ФИГ. 3H). В совокупности, данные говорят о том, что сгустки НВЛ являются достаточными, чтобы нарушить проходимость кровеносных сосудов при хронической нейтрофилии у ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей.

Образование сгустков НВЛ у ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей связано с особенностями индуцированных инфекциями тромботических микроангиопатий (ТМА) и рассеянной внутрисосудистой коагуляции у пациентов, в том числе шизоцитами, гемолитической анемией и недостаточностью органов вследствие окклюзии сосудов.

Анализировали плазму от ТМА пациентов с гемолитико-уремическим синдромом, вызванным инфекцией с продуцированием токсина Шига *Escherichia coli* [STEC-HUS, (*16*)]. Сепсис и септический шок являются частым осложнением у этих пациентов (*17*). Полученные НВЛ *in vitro* остаются интактными после воздействия плазмы, собранной у пациента в остром болезненном состоянии, тогда как плазма от пациентов в ремиссии разрушает НВЛ (ФИГ. 9A и ФИГ. 9B). Данные указывают на приобретенный и временный дефект по разрушению НВЛ, таким образом расширяя предыдущие отчеты (*18,19*). Следует отметить, что пациентов с STEC-HUS эффективно лечили с помощью режима, который включает инфузию плазмы от здоровых доноров (*17*), с источником ДНКаз, который потенциально восстанавливает разрушение НВЛ.

Большие агрегаты НВЛ, как сообщается, образуются в синовиальной жидкости и протоках поджелудочной железы пациентов (*21,22*), но еще не были описаны в других тканях. Поэтому была поставлена цель определить внутрисосудистые агрегаты НВЛ у пациентов с тяжелыми воспалительными заболеваниями. Обследовали ткань легкого, собранную при вскрытии от пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом и/или сепсисом (ФИГ. 10). Были определены гематоксилин-положительные сгустки в кровеносных сосудах двух пациентов с сепсисом (ФИГ. 11A и ФИГ. 11C). В обоих случаях, сгустки состоят из хроматина и МРО (ФИГ. 11B и ФИГ. 11D), что указывает на то, что НВЛ может образовывать внутрисосудистые сгустки у человека с сепсисом.

Сепсис представляет собой потенциальный и быстрый триггер внутрисосудистого образования НВЛ у мышей (*7*). Поэтому было предположено, что дефект разрушения НВЛ может усугубить болезнь. Действительно, наблюдали, что мыши с комбинированной недостаточностью ДНКазы1 и ДНКазы1l3, но не мыши дикого типа, очень чувствительны к низким дозам липополисахарида и убитых нагреванием *E. coli* (ФИГ. 4A). Так же как и у нейтрофильных ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей, анализ крови ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей с сепсисом демонстрирует гемолитическую анемию и гематурию (ФИГ. 4B и ФИГ. 4C), наряду с повышенными уровнями ЛДГ в плазме и шизоцитами в мазках крови (ФИГ. 4D и ФИГ. 4E). Кроме того, были обнаружены обильные частично или полностью окклюзированные кровеносные сосуды в легких (ФИГ. 4F и ФИГ. 4G). Детальный анализ частично окклюзированных сосудов выявил сгустки НВЛ в просвете сосудов (ФИГ. 4H). В полностью окклюзированных сосудах сгустки НВЛ переполнены инкапсулированными эритроцитами и лейкоцитами (ФИГ. 4I; ФИГ. 12A и ФИГ. 12B). Важно отметить, что экспрессия *ДНКазы1* или *ДНКазы1l3* в печени ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей предотвращает окклюзию сосудов и восстанавливает фенотип дикого типа. В совокупности эти данные указывают на то, что циркулирование ДНКазы1 или ДНКазы1l3 предотвращает образование сгустков НВЛ и повреждение хозяина при сепсисе.

Таким образом, в то время как тромбоциты и фибрин образуют гемостатические сгустки и патологические тромбы (*23*), наши данные вводят сгустки НВЛ в качестве неканонического механизма окклюзии сосудов в воспалительных состояниях. Подобно нитям фибрина, НВЛ являются очень большими и стабильными молекулами (*6*). В высоких

концентрациях, таких как хроническая нейтрофилия или септицемия, внутрисосудистые НВЛ могут образовывать сгустки, размер которых достаточен для того, чтобы нарушить проходимость кровеносных сосудов и, следовательно, вызвать повреждение эритроцитов и органов. Чтобы поддерживать целостность крови и тканей при воспалении, хозяин независимо экспрессирует ДНКазу1 и ДНКазу1l3 как систему двойной защиты от внутрисосудистых НВЛ. Однако приобретенные и генетические дефекты в этих факторах хозяина могут задержать разрушение НВЛ и, таким образом, спровоцировать болезнь. Приобретенные дефекты могут включать ингибирование ДНКазы-1 мономерным актином, высвобожденным из поврежденной ткани, и инактивацию ДНКазы1l3 сывороточными протеазами (*11*). Мутации в ДНКазе1 и ДНКазе1l3 выявляли у пациентов и связывали с системной красной волчанкой (СКВ), системным аутоиммунным заболеванием (*24,25*). Интересно, что у мышей с дефицитом DNase1 и DNase1l3 с возрастом спонтанно развивается СКВ-подобная болезнь (*13,26*). НВЛ состоят из известных аутоантигенов и нейтрофилов, у пациентов СКВ имеется повышенная способность для высвобождения НВЛ (*27*). Сниженная эффективность выведения может увеличивать период полувыведения НВЛ и, таким образом, стимулировать аутоиммунное заболевание (*10,27*). В заключение следует отметить, что дефекты в ДНКазах хозяина могут вызывать вредные действия НВЛ во множестве воспалительных заболеваний.

Следовательно, опосредованное ДНКазой1 и ДНКазой1l3 разрушение НВЛ относится к привлекательной терапевтической возможности для пациентов, страдающих от воспалительных состояний. Чтобы проверить, разрушают ли ДНКаза1 и ДНКаза1l3 НВЛ с помощью одинаковых или с помощью различных механизмов, сшивали белки в НВЛ с применением фиксатора. Зафиксированные НВЛ эффективно разрушались ДНКаза1l3-/- сывороткой, но были устойчивы к разрушению ДНКаза1-/- сывороткой (ФИГ. 13A и ФИГ. 13B). В соответствии с этими результатами, воздействие на НВЛ рекомбинантной ДНКазы1 или ДНКазы1l3 показало, что обе ДНКазы разрушают интактные НВЛ (ФИГ. 13C и ФИГ. 13D), тогда как зафиксированные НВЛ устойчивы к активности ДНКазы1l3 (ФИГ. 13E и ФИГ. 13F). В совокупности, эти полученные in vitro данные говорят о том, что ДНКаза1 и ДНКаза1l3 разрушают НВЛ посредством различных способов.

Наконец, сравнивали активность ДНКазы1 и ДНКазы1l3 в кровообращении мышей и людей. Чтобы дифференцировать активности ДНКазы1 и ДНКазы1l3, создавали антитела против ДНКазы1 человека (α-hДНКазы1), которые блокируют активность ДНКазы1 в плазме от нормальных здоровых доноров (НЗД) (ФИГ. 14A). Гепарин представляет собой известный ингибитор ДНКазы1l3, и его применяли для блокирования ДНК-разрушающей активности с помощью ДНКазы1l3 (ФИГ. 14B). Плазма мышей демонстрирует приблизительно в 10 раз более высокую общую активность ДНКазы (ФИГ. 14C), активность ДНКазы1 (ФИГ. 14D) и активность ДНКазы1l3 (ФИГ. 14E), чем плазма человека. Кроме того, ДНКаза1l3 в плазме мыши, но не в плазме человека, эффективно разрушает НВЛ (ФИГ. 14F и ФИГ. 14G). Данные говорят о том, что концентрация ДНКазы1l3 в кровообращении человека не является достаточной для разрушения НВЛ.

Таким образом, включение опосредованного ДНКазой1l3 разрушения НВЛ у пациентов является новой и перспективной терапевтической стратегией в случае воспалительных заболеваний.

Материалы и методы

Плазма пациента

Образцы цитратной плазмы получали от пациентов во время вспышки STEC-HUS 2011 в Германии (*16*). Критериями для включения в наше исследование были положительное выявление STEC/энтерогеморрагических *E. Coli* или кровавого поноса, количества тромбоцитов ≤150 × 109 /л или снижения на ≥25% в течение 1 недели, признаков гемолиза (ЛДГ выше границы нормы, гаптоглобин ниже границы нормы или присутствие шизоцитов) и этапа острой почечной недостаточности ≥1.

Ткань человека

Ткани человека фиксировали при комнатной температуре в течение ночи в 5% забуференном фосфатом формалине. Все ткани собирали при вскрытии и первоначально передавали для диагностических целей и изучали в соответствии с государственными этическими принципами. Причина смерти пациентов указана на ФИГ. 10.

Мыши

Все мыши имели генетическую наследственность C57BL/6. Скрещивали ранее описанных ДНКаза1-/- и ДНКаза1-подобный фермент 3-/- мышей (*26,28*) для создания ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей. Недавно сообщалось, что эта линия ДНКаза1-/- мышей содержит нецелевую мутацию в перекрывающемся гене *Trap1/Hsp75 ДНКазы1*, который кодирует митохондриальный шаперон (*29*). Поэтому для получения ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей для контрольных экспериментов была включена альтернативная ДНКаза1-/- линия (*30*) (ФИГ. 15A-ФИГ. 15C)

Детектирование ДНКазы1 способом денатурирующей электрофорезной зимографии в полиакриламидном геле (DPZ)

DPZ осуществляли таким образом, как описано ранее с модификациями (*19*). Вкратце, полиакриламидные гели в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) готовили с 4% (об./об.) концентрирующих гелей без ДНК и 10% (об./об.) сепарирующих гелей, содержащих 200 мкг/мл ДНК семенников лосося (Sigma- Aldrich, Германия). Для детектирования ДНКазы1 смешивали 0,5 мкл мышиной сыворотки с 14,5 мкл воды и 5 мкл гелевого загрузочного буфера с SDS (BioRad, Германия). Смесь кипятили в течение 5 минут и нагружали на гели. Электрофорез осуществляли при 120 В с применением трис-глицинового электрофорезного буфера (25 мМ Трис, 192 мМ глицина, 0,1% (мас./об.) SDS, pH 8,7). После электрофореза белки повторно сворачивали, инкубируя гели в течение ночи при 37°C в буфере для рефолдинга, содержащем 5% (мас./об.) сухого молока, 10 мМ Трис/HCl pH 7,8, 3 мМ $CaCl_2$, 3 мМ $MgCl_2$, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Гели переносили в буфер для рефолдинга без сухого молока и инкубировали в течение дополнительных 24 часов при температуре 37°C. ДНК метили флуоресцентно с помощью 1x SYBR Safe (Thermo Scientific, Германия), а флуоресцентные

изображения гелей записывали с применением флуоресцентного сканера (Molecular Imager FX, BioRad, Германия).

Детектирование ДНКазы1l3 с помощью DPZ

Для детектирования ДНКазы1l3, 2 мкл сыворотки смешивали с 12 мкл воды, 5 мкл гелевого загрузочного буфера с SDS и 1 мкл бета-меркаптоэтанола (BME, Sigma-Aldrich). BME уменьшает дисульфидные мостики ДНКазы1, что приводит к ее инактивации (*11*). Смесь кипятили в течение 5 минут и нагружали на гели. Электрофорез осуществляли таким образом, как описано для ДНКазы1. SDS удаляли промыванием гелей два раза с помощью 10 мМ Трис/HCl pH 7,8 в течение 30 минут при температуре 50°C. Белки повторно сворачивали путем инкубирования гелей в течение 48 часов при температуре 37°C в буфере для рефолдинга, содержащем 10 мМ Трис/HCl pH 7,8, 1 мМ BME, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Гели после этого инкубировали в течение дополнительных 48 часов при температуре 37°C в буфере для рефолдинга с добавлением 3 мМ CaCl2 и 3 мМ MnCl2. Для обеспечения эффективного разрушения депротеинизированной ДНК с помощью ДНКазы1l3 необходимо добавление Mn^{2+} (*11*). ДНК метили и получали ее изображение таким образом, как это описано для ДНКазы1.

Детектирование общей активности ДНКазы с помощью простой радиальной иммунодиффузии (SRED)

Чтобы измерить общую активность ДНКазы, растворяли 55 мкг/мл ДНК из семенников лосося в буфере, содержащем Mn^{2+} (20 мМ Трис-HCl pH 7,8, 10 мМ $MnCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$ и 2x SYBR Safe). Раствор ДНК нагревали при температуре 50°C в течение 10 минут и смешивали с эквивалентном объемом 2% ультрачистой агарозы (Thermo Scientific). Смесь выливали в пластиковые лотки и хранили при комнатной температуре до затвердевания. Два мкл мышиной сыворотки загружали в лунки диаметром 1,0 мм. Гели инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C во влажной камере. Флуоресценцию ДНК гелей записывали с помощью флуоресцентного сканера.

Анализ разрушения НВЛ in vitro

Разрушение НВЛ анализировали таким образом, как это описано ранее (*19*). Очищенные нейтрофилы человека в безсывороточной DMEM высевали в стерильные 96-луночные планшеты (Falcon, BD Technologies, Германия), покрытые 0,001% полилизином (Sigma), в концентрации 5×10^4 клеток на лунку. Для индуцирования образования НВЛ, нейтрофилы активировали с помощью 100 нМ форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA; Sigma-Aldrich) в течение 4 ч при температуре 37°C с 5% CO_2 и влажным воздухом. Добавляли забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и хранили 96-луночные планшеты в течение ночи при температуре 4 °C. НВЛ промывали с помощью PBS, обрабатывали в течение 5 минут с помощью PBS, содержащего 0,5% Triton X-100 и снова промывали с помощью PBS. НВЛ инкубировали с 10% сывороткой мыши или 10% цитратной плазмы человека, с добавленным 10 мкМ PPACK (Santa Cruz, Heidelberg, Германия) в HBSS с двухвалентными катионами (HBSS+; Thermo Scientific). НВЛ оставили разрушаться в течение 3 часов при температуре 37°C с 5% CO2 и во влажной атмосферой.

Супернатанты отбрасывали и останавливали разрушение НВЛ путем добавления 2% PFA в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. PFA отбрасывали и флуоресцентно метили не разрушенные НВЛ путем добавления 2 мкМ флуоресцентного красителя ДНК SytoxGreen (Thermo Scientific) в PBS. Изображения флуоресцентно окрашенных НВЛ получали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200M, Zeiss, Германия). Не разрушенные НВЛ оценивали количественно с помощью записи интенсивности флуоресценции с помощью планшет-ридера (возбуждение: 485 нм; излучение: 535 нм) или путем измерения охватываемой площади НВЛ в микроскопических снимках с применением программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Получение векторов экспрессии in vivo

Для экспрессирования белков у мышей применяли плазмиду pLIVE (Mirus Bio, США). Вектор обеспечивает длительную и гепатоцит-специфическую экспрессию белков. Создавали плазмиды pLIVE с мышиной *ДНКазой1*, *ДНКазой113* и *CSF3*. В случае мышиной *ДНКазы1*, ПЦР кДНК (учетный номер GenBank NM010061) осуществляли с применением пары праймеров ДНКазы1-П 5'- GTCGACATGCGGTACACAGG (SEQ ID NO:27) и ДНКазы1-О 5'- CTCGAGTCAGATTTTTCTGAGTGTCA (SEQ ID NO:28), содержащих сайты рестрикции SalI и XhoI. В случае *ДНКазы113*, ПЦР кДНК (учетный номер GenBank AF047355) осуществляли с применением пары праймеров ДНКазы113-П 5'- GAAGTCCCAGGAATTCAAAGATGT (SEQ ID NO:29) и ДНКазы113-О 5'- GCGTGATACCCGGGAGCGATTG (SEQ ID NO:30), содержащих сайты рестрикции BamHI и SacI. Обе кДНК клонировали с применением лигазы T4 (New England Biolabs, Германия) в сайт множественного клонирования (MCS) вектора pLIVE, который расщепляли с помощью соответствующих ферментов. Вектор pLIVE, содержащий ДНКазу113, подвергали сайт-направленному мутагенезу с помощью пары праймеров мутДНКазы113-П 5'-AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA (SEQ ID NO:31) и комплементарного ему мутДНКазу113-О 5'- TGCAGGGACATGGTGGCCGGGAGTCGACT (SEQ ID NO:32), чтобы соответствовать консенсусной последовательности Козак и оптимизировать белковую экспрессию. Получение вектора pLIVE, содержащего кДНК *CSF3*, осуществляла третья сторона (Eurofins Genomics, Германия). Вставляли кДНК *CSF3* (учетный номер GenBank BC120761) в MCS между сайтами рестрикции SalI и XhoI. Последовательность всех полученных векторов подтверждали путем секвенирования двухцепочечной ДНК. В качестве контроля использовали родительскую плазмиду pLIVE без дополнительных вставок. Все плазмиды очищали с применением набора PureLink HiPure Plasmid Maxiprep и удаляли потенциальные загрязнения эндотоксина с применением центрифугируемых колонок высокой емкости для удаления эндотоксинов (обе от Thermo Scientific).

***In vitro* экспрессия мышиных ДНКазы1 и ДНКазы113**

Плазмиды, содержащие кДНК для ДНКаза1 или ДНКаза113, описанные в другом источнике, трансфицировали в эмбриональную клетку почки человека (HEK) с Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) в безсывороточных условиях со средой DMEM (Thermo Scientific) с добавлением 10% заменителя сыворотки крови KnockOut (Thermo

Scientific). Спустя 72 часов, супернатанты собирали, центрифугировали при 500 xg в течение 10 минут, фильтровали путем стерилизующей фильтрации и концентрировали путем ультрацентрифугирования с помощью колонок 3K (Amicon Ultra, Millipore, г. Дармштадт, Германия).

Экспрессия генов in vivo

Плазмиды pLIVE, содержащие *ДНКазу1*, *ДНКазу1l3*, *CSF3*, или пустые контрольные плазмиды вводили мышам посредством гидродинамической инъекции в хвостовую вену. Вкратце, 50 мкг плазмиды разбавляли в 0,9% физиологическом растворе в объеме, эквивалентном 10% массы тела мыши. Мышей анестезировали изофлюраном, а раствор плазмиды после этого вводили внутривенно в течение 5-8 секунд через хвостовую вену. В редких случаях, мыши не полностью оправлялись от инъекции в течение первых 24 часов и этих животных исключали из исследования. Для исследований коэкспрессии 50 мкг плазмиды *CSF3* смешивали с 50 мкг пустой контрольной плазмиды или плазмид, содержащих *ДНКазу1* и *ДНКазу1l3*. Раствор, содержащий обе плазмиды, вводили путем гидродинамической инъекции в хвостовую вену.

Хроническая нейтрофилия

Самкам мышей в возрасте 4 недель или 8-12 недель инъецировали 50 мкг плазмиды pLIVE, содержащей *CSF3* для индуцирования сверхэкспрессии G-CSF и нейтрофилии. Мышей проверяли каждые 8 часов в течение первой недели после инъекции и впоследствии ежедневно. Температуру измеряли в перианальной области с помощью бесконтактного инфракрасного термометра (Etekcity, Германия). В исследованиях на выживаемость мышей подвергали эвтаназии и оценивали как «не выживших» при условии, что животные демонстрировали признаки дистресса (отсутствует спонтанное движение, закрытые глаза, иногда задыхаются). Во всех случаях эти признаки дистресса сопровождались быстро прогрессирующей и тяжелой гипотермией, определяемой как снижение температуры тела на ≥4°C по сравнению с температурой тела перед инъекцией плазмид, и гематурией. Негипотермические мыши не демонстрировали каких-либо признаков дистресса, и в конце эксперимента их подвергали эвтаназии. Для сбора органов, крови и мочи, анализировали четыре группы из трех D1/D1L3-/- мышей. Мышам из каждой группы инъецировали смесь *CSF3* с пустой плазмой, *ДНКазой1* или *ДНКазой1l3*. Каждую группу мышей для сбора биопроб подвергали эвтаназии, когда первая группа животных демонстрировала признаки дистресса, тяжелой гипотермии и гематурии. Этот момент времени определяли как «исход» и наблюдали в течение 3-6 дней после инъекции.

Элиминация тромбоцитов

Мыши получали внутрибрюшинную инъекцию 2 мкг/г истощающего тромбоциты антитела или изотипного контрольного антитела (оба от Emfret, Германия). Эта обработка элиминирует > 95% тромбоцитов из кровообращения. Обработку начинали спустя 24 часов после инъекции *CSF3* и повторяли каждые 48 часов до завершения эксперимента.

Ингибирование тромбина

Порошкообразный дабигатран этексилат (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, Германия)

смешивали с порошком обычной пищи (Altromin, Германия) в дозе 40 мг/г. Гранулы готовили путем смешивания порошка с дистиллированной водой и давали им высохнуть при комнатной температуре. Кормление дабигатраном начинали спустя 24 часов после инъекции *CSF3*. Мышей дикого типа удерживали на дабигратановой диете в течение 1 дня, что показало в 6,48±1,19 раз (среднее значение ± СО, N=4) увеличенное время образования и активности тромбопластина при сравнении с мышами, которые получали обычную пищу без дабигатрана (t-критерий Стьюдента; $P < 0,001$).

Получение бактерий для сепсиса

Escherichia coli (XEN 14, Perkin Elmer) выращивали в течение ночи в среде лизогенного бульона. содержащей 50 мкг/мл канамицина. Бактерии осаждали с помощью центрифугирования при 4000 x g в течение 10 минут, промывали и ресуспендировали с помощью PBS. Аликвоты $1,5\times10^9$ бактерий/мл инкубировали при температуре 70°C в течение 15 минут, чтобы убить бактерии нагреванием. Аликвоты хранили при температуре -20°C до дальнейшего использования.

Сепсис

Самцы мышей в возрасте 8-15 недель получали три ежедневные внутрибрюшинные инъекции 1 мкг/г ЛПС от *Salmonella enterica* серотипа *thyphimurium* (Sigma-Aldrich) в 0,9% физиологическом растворе. Наряду с третьей инъекцией ЛПС, мыши получали внутривенную инъекцию 1,5×107 убитых нагреванием *E.coli*/g. Продемонстрированное время выживаемости указывает время после инъекции *E.coli*. Кровь и органы собирали во время эвтаназии. От двух (1x D1/D1L3-/- + *Ктрл*, 1x D1/D1L3-/- + *D1L3*) животных получали недостаточно биопроб, чтобы осуществить полный анализ, приведенный на ФИГ. 4A-ФИГ 4I. Мышей подвергали эвтаназии и оценивали как «не выжившие», если животные демонстрировали признаки тяжелого дистресса (нечувствительность к прикосновению). Все не выжившие мыши демонстрировали гематурию и бледность конечностей. Всех выживших мышей подвергали эвтаназии и оценивали как «выжившие» спустя 24 часов после внутривенной инъекции убитых нагреванием *E.coli*.

Сбор крови, плазмы и тканей мышей

Кровь собирали путем поднижнечелюстной пункции или в ретроорбитальном синусе. Кровь собирали в 200 мкл пробирки с сывороткой (Monovette; Sarstedt, Германия) и 200 мкл пробирки с ЭДТА (GK 150, KABE labortechnik, Германия). Плазму получали путем сбора супернатанта крови после центрифугирования при 3000 x g в течение 15 минут. Сыворотку получали, позволяя крови сворачиваться в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей центрифугированием в течение 15 минут при 3000 x g. Сыворотку и образцы плазмы хранили в аликвотах при температуре -20°C до дальнейшего использования. Для анализа органов мыши осуществляли перфузию путем внутрисердечной инфузии PBS. Органы собирали и фиксировали в течение 24 часов в 4% PFA при температуре 4°C. Фиксированные органы погружали в парафин.

Анализ крови и плазмы

ЛДГ, АсАТ, АлАТ, креатинин и АМК в плазме оценивали количественно путем

применения стандартизированных наборов (Biotron Diagnostics, Калифорния, США), следуя инструкциям производителя. G-CSF мышей оценивали количественно с помощью набора для твердофазного ИФА Quantikine (R&D, Великобритания). Гемоглобин в крови с ЭДТА оценивали количественно с помощью автоматического гемоцитометра (Idexx ProCyte Dx Hematology Analyzer, Нидерланды). Для количественной оценки нейтрофилов с помощью FACS, цельную кровь инкубировали на льду в течение 15 минут с 0,2 мкг меченого фикоэритрином антимышиного CD11b (M1/70, Biolegend, Германия) и 0,5 мкг антимышиного Ly6G Alexa Fluor 488 (1AB, Biolegend, Германия). Кровь после этого разбавляли с помощью 0,5 мл PBS и анализировали с помощью FACSCalibur (BD Bioscience, США). Мазки крови из антикоагулированной с помощью ЭДТА крови готовили на предметных стеклах, покрытых полилизином (Hecht Assistant, Германия). После высушивания на воздухе инкубировали в течение 1 минуты в метаноле, добавляли 1 мкМ SytoxGreen на сухом льду или окрашивали с помощью Giemsa с применением коммерчески доступного набора (In Vitro Diagnostikum, Германия).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Залитые парафином срезы депарафинировали, регидратировали и подвергали извлечению антигена в течение 25 минут при температуре 100°C в цитратном буфере (10 мМ натрий цитрат, 0,1% Tween, pH 6). После этого, срезы блокировали в течение 30 минут с помощью 2,5% нормальной козьей сыворотки (Vector, Великобритания) с последующим инкубированием с помощью набора для блокировки мышь-мышь (Vector) в течение одного часа. Срезы после этого инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с 2 мкг/мл первичного антитела против MPO (A0398, Agilent, Германия), CRAMP (PA-CRLP-100, Innovagen, Швеция), цитруллинированным гистоном 3 (ab5103, Abcam, Великобритания), фибрином [клон 59D8] или комплексом гистона H2A, H2B и ДНК для детектирования хроматина (*2*). Срезы инкубировали с антикроличьими и антимышиными IgG-антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 или AlexaFluor555 (все от Thermo Scientific) в течение 1 часа. После промывания ДНК метили с помощью 1 мкг/мл DAPI в течение 2 минут. Автофлуоресценцию гасили 25-минутным инкубированием с судановым черным (0,1% в 70% этаноле) и готовили срезы для анализа с помощью Fluoromount G (Southern Biotech, США). Изображения флуоресцентно меченых срезов получали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200M, Zeiss, Германия) или конфокального микроскопа (TCS SP5, Leica, Германия). Изображения сгустков НВЛ оценивали количественно с применением программного обеспечения (ImageJ). Площадь окрашивания ФФВ или фибрина менее 3% сгустков НВЛ считали отрицательной.

Иммуногистохимический анализ

После извлечения антигена, депарафинизированные срезы блокировали в течение 30 минут с помощью 2,5% нормальной лошадиной сыворотки (Vector). Срезы инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с помощью 2 мкг/мл первичного антитела против нейтрофильной эластазы (ab68672, Abcam). После промывания срезы окрашивали с применением набора с антикроличьим IgG-AP (ImmPRESS, Vector) в соответствии с

инструкциями производителя. Срезы окрашивали с помощью гемалюма Майера (Merck, Германия) и готовили для анализа с помощью среды Neo-Mount (Merck). Изображения окрашенных срезов получали с помощью инвертированного микроскопа (Axiovert 200M, Zeiss).

Получение сгустков НВЛ in vitro

Очищенные нейтрофилы человека высевали на планшетах для тканевых культур при 3×10^7 клеток/мл в DMEM с добавлением 2% BSA. Клетки активировали с помощью 0,1 мкМ PMA в течение 4 часов при температуре 37°C, 5% CO_2 во влажной атмосфере и условиями с перемешиванием (300 об./мин.). Применяли нестимулированные нейтрофилы и нейтрофилы, активированные с помощью PMA, в присутствии 10 ед./мл рекомбинантной ДНКазы1 человека (дорназа альфа, Roche, Германия) в качестве контролей. Сгустки НВЛ фиксировали с помощью 2% PFA в течение ночи при температуре 4°C. Фиксировали сгустки НВЛ, погруженные в парафин, и окрашивали срезы на НВЛ таким образом, как описано выше.

Статистическая оценка

Данные показаны в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистический анализ осуществляли с применением программного обеспечения Prism Software (GraphPad, США) и включали t-критерий Стьюдента, однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием множественного сравнения по методу Бонферрони, и логарифмическим ранговым критерием. Результаты считали значимыми при $P < 0,05$.

Движения

Мыши дикого типа переносили хроническую нейтрофилию. Созданный фильм иллюстрирует мышей дикого типа спустя одну неделю после инъекции плазмиды экспрессии CSF3 (CSF3) или контрольной плазмиды без CSF3 (Ктрл). Все животные демонстрируют нормальное поведение и отсутствие признаков дистресса.

Хроническая нейтрофилия вызывает дистресс у мышей, лишенных ДНКазы1 и ДНКазы1l3. Фильм иллюстрирует ДНКаза1/ДНКаза1l3-/- мышей, которые коэкспрессируют CSF3 с контрольной плазмидой (CSF3/Ктрл), с ДНКазой1 (CSF3/D1) или с ДНКазой1l3 (CSF3/D1L3). Мыши, которые экспрессируют в систему кровообращения ДНКазы, ДНКазу1 или ДНКазу1l3, демонстрируют нормальное поведение. Мыши, испытывающие недостаток ДНКаз в системе кровообращения (CSF3/Ктрл), демонстрируют признаки дистресса (отсутствует спонтанное движение, закрытые глаза, эпизодически судорожное дыхание).

Ссылки

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, Acute and chronic inflammation. In Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 2.

2. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535 (2004).

3. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. 207, 1853-1862 (2010).

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

5. S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. 13, 463-469 (2007).

6. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wrobleski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 15880-15885 (2010).

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

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

9. S. K. Jorch, P. Kubes, An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat. Med. 23, 279-287 (2017).

10. A. Hakkim, B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, A. Zychlinsky. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 9813-9818 (2010).

11. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). FEBS J. 276, 1059-1073 (2009).

12. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. Biochem. J. 380, 929-937 (2004).

13. V. Sisirak, B. Sally, V. D'Agati, W. Martinez-Ortiz, Z. B. Ozcakar, J. David, A. Rashidfarrokhi, A. Yeste, C. Panea, A. S. Chida, M. Bogunovic, Ivanov, II, F. J. Quintana, I. Sanz, K. B. Elkon, M. Tekin, F. Yalcinkaya, T. J. Cardozo, R. M. Clancy, J. P. Buyon, B. Reizis, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. Cell 166, 88-101 (2016).

14. M. Demers, D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, D. D. Wagner, Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 13076-13081 (2012).

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

16. C. Frank, D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Muller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, G. Krause, HUS Investigation Team, Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany. N. Engl. J. Med. 365, 1771-1780 (2011).

17. S. A. Braune, D. Wichmann, M. C. von Heinz, A. Nierhaus, H. Becker, T. N. Meyer, G. P. Meyer, M. Muller-Schulz, J. Fricke, A. de Weerth, W. W. Hoepker, J. Fiehler, T. Magnus, C. Gerloff, U. Panzer, R. A. Stahl, K. Wegscheider, S. Kluge. Clinical features of critically ill patients with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Crit. Care. Med. 41, 1702-1710 (2013).

18. M. Jimenez-Alcazar, M. Napirei, R. Panda, E. C. Kohler, J. A. Kremer Hovinga, H. G. Mannherz, S. Peine, T. Renne, B. Lammle, T. A. Fuchs, Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. J. Thromb. Haemost. 13, 732-742 (2015).

19. J. Leffler, Z. Prohaszka, B. Mikes, G. Sinkovits, K. Ciacma, P. Farkas, M. Reti, K. Kelen, G. S. Reusz, A. J. Szabo, M. Martin, A. M. Blom, Decreased neutrophil extracellular trap degradation in shiga toxin-associated haemolytic uraemic syndrome. J. Innate Immun. 9, 12-21 (2017).

20. M. Leppkes, C. Maueroder, S. Hirth, S. Nowecki, C. Gunther, U. Billmeier, S. Paulus, M. Biermann, L. E. Munoz, M. Hoffmann, D. Wildner, A. L. Croxford, A. Waisman, K. Mowen, D. E. Jenne, V. Krenn, J. Mayerle, M. M. Lerch, G. Schett, S. Wirtz, M. F. Neurath, M. Herrmann, C. Becker, Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. Nat. Commun. 7, 10973 (2016).

21. C. Schauer, C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhofer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, R. Holmdahl, V. Krenn, T. Harrer, I. Jeremic, R. Bilyy, G. Schett, M. Hoffmann, M. Herrmann, Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nat. Med. 20, 511- 517 (2014).

22. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock. In Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), chap. 4.

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

24. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. 28, 313-314 (2001).

25. M. Napirei, H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, T. Moroy, Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. Nat. Genet. 25, 177-181 (2000).

26. S. Gupta, M. J. Kaplan, The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal

diseases. Nat. Rev. Nephrol. 12, 402-413 (2016).

27. R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, D. Kitamura, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. PloS one 8, e80223 (2013).

28. J. Rossaint, J. M. Herter, H. Van Aken, M. Napirei, Y. Doring, C. Weber, O. Soehnlein, A. Zarbock, Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. Blood 123, 2573-2584 (2014).

29. A. Bradley, K. Anastassiadis, A. Ayadi, J. F. Battey, C. Bell, M. C. Birling, J. Bottomley, S. D. Brown, A. Burger, C. J. Bult, W. Bushell, F. S. Collins, C. Desaintes, B. Doe, A. Economides, J. T. Eppig, R. H. Finnell, C. Fletcher, M. Fray, D. Frendewey, R. H. Friedel, F. G. Grosveld, J. Hansen, Y. Herault, G. Hicks, A. Horlein, R. Houghton, M. Hrabe de Angelis, D. Huylebroeck, V. Iyer, P. J. de Jong, J. A. Kadin, C. Kaloff, K. Kennedy, M. Koutsourakis, K. C. Lloyd, S. Marschall, J. Mason, C. McKerlie, M. P. McLeod, H. von Melchner, M. Moore, A. O. Mujica, A. Nagy, M. Nefedov, L. M. Nutter, G. Pavlovic, J. L. Peterson, J. Pollock, R. Ramirez-Solis, D. E. Rancourt, M. Raspa, J. E. Remacle, M. Ringwald, B. Rosen, N. Rosenthal, J. Rossant, P. Ruiz Noppinger, E. Ryder, J. Z. Schick, F. Schnutgen, P. Schofield, C. Seisenberger, M. Selloum, E. M. Simpson, W. C. Skarnes, D. Smedley, W. L. Stanford, A. F. Stewart, K. Stone, K. Swan, H. Tadepally, L. Teboul, G. P. Tocchini- Valentini, D. Valenzuela, A. P. West, K. Yamamura, Y. Yoshinaga, W. Wurst, The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. Mamm. Genome 23, 580-586 (2012).

Пример 2: Разработка и применение ДНКазы1L3 и ее вариантов для терапии

Введение

Неконтролируемое воспаление вызывает множество состояний (*1*). Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) представляют собой филаменты ДНК, декорированные токсичными белками (*2*). НВЛ защищает от микробной инфекции, но чрезмерное образование НВЛ является триггером и усугубляет воспалительные и аутоиммунные заболевания (*3*). ДНКаза1 (D1), разрушающий ДНК фермент, обнаруженный в крови, широко используется для обезвреживания НВЛ in vitro и in vivo. Действительно, инфузия рекомбинантного D1 человека, одобренного FDA лекарственного средства (дорназы альфа) в случае муковисцидоза (CF), предотвращает патологические эффекты НВЛ на различных моделях заболевания (*3*), поддерживая применение D1 для профилактической терапии.

ДНКаза1-подобный фермент 3 представляет собой новое потенциальное лекарственное средство для связанных с НВЛ заболеваний

В примере 1, было обнаружено, что в дополнение к D1, ДНКаза1-подобный фермент 3 (D1L3) также разрушает НВЛ. Оба фермента поддерживают гомеостаз в крови и тканях во время воспалительных реакций. Вкратце, было продемонстрировано, что НВЛ образуются в кровеносных сосудах при нейтрофилии, отличительной чертой воспаления, при стерильном, а также инфекционном, состояниях. D1 и D1L3 расщепляет НВЛ и, таким образом, предотвращает агрегирование филаментов ДНК НВЛ в сосудистые сгустки. В отсутствие D1 и D1L3, сгустки НВЛ затрудняют кровоток и вызывают повреждение

органов и смерть. Сгустки НВЛ образуются независимо от тромбоцитов или фибрина и поэтому являются устойчивыми к обычной антитромботической терапии. В связи с этим, было обнаружено, что сгустки НВЛ являются новым механизмом окклюзии сосудов, а D1L3 - это новая профилактическая терапия против НВЛ (смотри **пример 1**).

D1 и D1L3 принадлежат, наряду с ДНКаза1-подобным ферментом 1 (D1L1) и ДНКаза1-подобным ферментом 2 (D1L2), к семейству белков ДНКазы1 (*4*). D1 и D1L3 экспрессируются во множестве видов, в том числе у людей, приматов и грызунов. D1 преимущественно экспрессируется в желудочно-кишечном тракте и экзокринных железах (*5*), тогда как гематопоэтические клетки, а именно макрофаги и дендритные клетки, продуцируют D1L3 (*6, 7*). Обе ДНКазы в низких концентрациях были обнаружены в сыворотке мышей и людей (пример 1, **ФИГ. 14**), но происхождение D1 и D1L3 в кровообращении неизвестно (*7, 8*). D1 предпочтительно расщепляет депротеинизированную ДНК (например, бактериальную ДНК, плазмидную ДНК), тогда как D1L3 воздействует на хроматин, комплекс ДНК и гистонов, которую обычно обнаруживают в ядре эукариотических клеток (*7, 9, 10*). Активность D1 ингибируется при связывании с мономерным актином и чувствительна к физиологическим концентрациям солей (*11-13*). В дополнение, D1 гликозилируют в положении N40 (соответствует N18 в зрелом ферменте без сигнального пептида) и N128 (N106), что делает фермент устойчивым к инактивации сывороточными протеазами (*9*). Напротив, в D1L3 отсутствует гликозилирование и сайты связывания актина, что вызывает его восприимчивость к нескольким протеазам и устойчивость к актину, соответственно (*9*).

Впервые D1 был обнаружен в жидкостях организма желудочно-кишечного тракта и моче, участвующих в расщеплении ДНК при приеме пищи. В ходе этого раскрытия наблюдали, что системно вводимая ДНКаза1 (например, через внутрибрюшинную или внутривенную инъекцию) имеет относительно короткий период полувыведения из кровотока и секретируется в ферментативно активной форме в мочу и, неожиданно, в желчь. Ее выделение в желчную жидкость открывает возможности для нацеливания на внеклеточную ДНК и/или НВЛ в желчном протоке посредством системной терапии с ДНКазой1.

D1L3 был впервые описан в контексте запрограммированной гибели клеток (*14*). D1L3 имеет два сайта внутриядерной локализации (NLS1, NLS2). NLS2 интегрирован в С-концевой хвост, который является уникальным для D1L3 и отсутствует в D1. Оба NLS во время апоптоза нацеливают фермент на ядро (*14*). Действительно, внутриклеточный D1L3 требуется для фрагментация ядерной ДНК в апоптотических и некротических клетках *in vivo* (*15*). D1L3 требует, чтобы его С-концевой хвост разрушал внеклеточную ДНК, а именно ДНК, инкапсулированную в липиды, например при трансфекции, и хроматин в апоптотических телах (*7, 10*). При трансфекциях кДНК и катионные липиды образуют комплекс, который проникает через плазматическую мембрану клеток-мишеней. D1L3 мешает трансфекциям, а С-концевой хвост имеет решающее значение для этой функции (*10*). Апоптотические тела, липидные везикулы, заполненные хроматином из

апоптотических клеток, являются физиологическими субстратами D1L3 (*7*). Здесь С-концевой хвост позволяет D1L3 проникать через липидные мембраны апоптотических тел и разрушает нагрузку хроматина. Важно отметить, что для разрушения безлипидного внеклеточного хроматина с помощью D1L3 также требуется С-концевой хвост (*7*). С-концевой хвост считается критическим для функций D1L3 во внеклеточном пространстве.

В то время как hD1 эффективно нацеливается на НВЛ в животных моделях, в основном мышиных, он продемонстрировал ограниченный или нетерапевтический эффект в клинических испытаниях при CF (*16*) и эмфиземе (*17*), соответственно. НВЛ образуются в CF (*18*), что указывает на то, что hD1 дикого типа не является оптимальным для воздействия на НВЛ у пациентов. Гиперактивные варианты были созданы, чтобы обойти терапевтические ограничения D1, но их производство для клинических исследований сопряжено с трудностями (*12*). Примечательно, что ДНК-НВЛ содержит гистоны и структурно организована подобно хроматину (*2*). В связи с этим, было предположено, что для эффективного разрушения хроматина требуются оптимальная терапия против НВЛ.

Была описана комбинированная терапия с hD1 и тканевым активатором плазминогена (tPA, алтеплаза) у пациентов с эмфиземой (*17*). Данные согласуются с нашей гипотезой, потому что tPA позволяет D1 разрушать хроматин in vitro (*19*). US 9642822, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки, дополнительно раскрывает комбинированную терапию с tPA и D1 для терапевтического нацеливания НВЛ (*20*). Однако, лечение с помощью tPA обычно связано с повышенным риском кровотечений из-за его фибринолитической активности (*17*). D1L3 может обеспечить более безопасную стратегию для воздействия на НВЛ, не подвергая пациентов риску кровотечения, но терапия с белком D1L3 не изучалась.

Конструирование вариантов ДНКазы1 и ДНКаза1-подобного фермента 3 посредством переноса аминокислот

В этом примере создавали варианты D1 и D1L3, которые конструировали для терапии против внеклеточного хроматина (в том числе НВЛ). Для конструирования вариантов высказано предположение, что способность D1L3 человека для разрушения хроматин кодируется отдельными аминокислотами и/или аминокислотными последовательностями, которые отсутствуют в D1 человека. Кроме того, предположили, что перенос этих отдельных аминокислот и/или аминокислотной последовательности от D1L3 человека к D1 создает гиперактивные варианты D1 с повышенной хроматин-разрушающей активностью. Аналогичным образом, ферментативные свойства (например, гликозилирование) могут быть перенесены с D1 на D1L3. Чтобы проверить гипотезу, применяли обычные аминокислотные мутации и разрабатывали новую технологию структурных блоков (СБ) для конструирования вариантов ДНКаз из семейства белка ДНКазы1.

Для продуцирования вариантов D1 и D1L3, применяют системы экспрессии in vitro [например, клетки яичника китайского хомяка (CHO), эмбриональные клетки почки человека (HEK), *Pichia pastoris*]. Ферментативную активность исследовали с применением

разрушения высокомолекулярной (ВМ) ДНК в качестве регистрируемого результата (**ФИГ. 16**). Были выбраны два типа ВМ ДНК: (a) двухцепочечную ДНК (дцДНК), которую выделяли из семенников лосося. Разрушение ВМ дцДНК анализировали с помощью зимографии; (b) хроматин из очищенных ядер клеток HEK293. Для анализа его разрушения, ВМ хроматин сначала инкубировали с вариантами ДНКазы с последующим выделением ДНК и визуализацией посредством электрофореза в агарозном геле (AGE). Разрушение хроматина детектировали с помощью низкомолекулярной (НМ) ДНК. При этих условиях D1 человека дикого типа (SEQ ID NO: 1) имеет приблизительно в 100 раз более высокую активность для разрушения дцДНК, чем D1L3 дикого типа (SEQ ID NO: 2), тогда как D1L3 дикого типа разрушает хроматин приблизительно в 100 раз более эффективно, чем D1 дикого типа (**ФИГ. 16**). Были обнаружены синергические эффекты D1 и D1L3 в разрушении хроматина, но не дцДНК. Если D1 и D1L3 смешивали в соотношении 10:1 или 1:1, наблюдали повышенное разрушение хроматина, по сравнению с каждым D1 или D1L3 отдельно (**ФИГ. 16**). В связи с этим, осуществляли скрининг D1 и/или вариантов D1L3, которые демонстрируют повышенную разрушающую хроматин и/или дцДНК активность.

Выбранные варианты D1 и D1L3 дополнительно исследовали на разрушение внутрисосудистых НВЛ с применением in vivo системы экспрессии для членов семейства белков D1. Смотри PCT/EP2018/051444, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Система основана на двух компонентах (a) плазмиде экспрессии, которая обеспечивает стабильную трансфекцию гепатоцитов in vivo с кДНК D1, D1L3, и ее вариантов у реципиентных мышей, и (b) *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ дефицитных мышах, которые характеризуются отсутствием активности ДНКазы в сыворотке. Вкратце, кДНК потенциальных ДНКаз клонировали в векторе экспрессии в печени. Далее вектор коэкспрессируется у *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ дефицитных мышей вместе с кДНК мышиного *Csf3,* который кодирует колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF). Экспрессия *Csf3* индуцирует нейтрофилию с сопутствующим внутрисосудистым образованием НВЛ, что, в свою очередь, вызывает агрегирование нерасщепленных НВЛ в кровеносных сосудах и гибель у *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Для идентификации потенциальных лекарственных средств, осуществляли скрининг на D1, D1L3 и их варианты, которые эффективно разрушают НВЛ и, таким образом, предотвращают заболеваемость и смертность в этой модели.

Результаты

Конструирование вариантов ДНКазы1 посредством обычных аминокислотных замен

Главная гипотеза заключается в том, что способность D1L3 человека разрушения хроматина опосредована аминокислотами, которые отсутствуют в D1. Выравнивание последовательности демонстрирует, что 44% аминокислот в D1 человека и D1L3 человека являются идентичными (**ФИГ. 17**). Для получения вариантов D1 и DL3 мутациям подвергали исключительно только вариабельные аминокислоты (56% неродственных аминокислот).

D1L3 представляет собой катионный белок с изоэлектрической точкой 9,35, тогда как D1 и другие члены представляют собой более основные белки. Поэтому предположили, что катионная природа D1L3 позволяет ферменту разрушать хроматин. Благодаря выравниванию последовательностей было идентифицировано 37 остатков аргинина или лизина в вариабельных аминокислотах, которые отсутствуют в D1 (**ФИГ. 17**). Эти аминокислотные остатки располагаются в положениях аминокислот 29 (положение 9 с сигнальным пептидом), 39 (9), 47 (7), 50 (30), 66 (46), 74 (54), 77 (57), 80 (60), 81 (61), 92 (72), 109 (89), 114 (94), 115 (95), 163 (143), 176 (156), 180 (160), 199 (179), 200 (180), 203 (183), 208 (188), 212 (192), 226 (206), 227 (207), 239 (219), 250 (230), 259 (239), 262 (242), 280 (260), 285 (265), 291 (271), 292 (272), 297 (277), 298 (278), 299 (279), 301 (281), 303 (283), 304 (284) по сравнению с SEQ ID NO: 2.

Двадцать шесть из этих дополнительных остатков аргинина или лизина в D1L3 соответствуют следующим положениям аминокислот в D1 (SEQ ID NO: 1): 31 (положение 9 с сигнальным пептидом), 41 (19), 49 (40), 52 (30), 68 (46), 76 (54), 79 (57), 81 (59), 92 (70), 109 (87), 114 (92), 115 (93), 164 (142), 177 (155), 181 (159), 200 (178), 201 (179), 204 (182), 209 (187), 213 (191), 227 (205), 239 (217), 250 (228), 259 (237), 262 (240) и 280 (260). В дополнение, D1L3 имеет 3 сайта вставок остатков аргинина или лизина: R80, K226 и С-концевой хвост (после положения аминокислоты 282 в SEQ ID NO: 2), который имеет 3 остатка аргинина и 6 остатков лизина.

Была поставлена цель перенести остатки аргинина и лизина, которые являются частью основного остова D1L3, в D1 путем введения следующих мутаций в D1 дикого типа (**ФИГ. 18**): Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K и K280M по сравнению с SEQ ID NO:1, таким образом получая 28 вариантов D1.

В этом примере были получены варианты D1, которые содержат 23 из 28 аминокислотных замен. Экспрессировали кДНК этих вариантов D1 в клетках HEK293 и анализировали разрушающую дцДНК и хроматин активность в супернатантах культуры. Наблюдали, что следующие аминокислотные модификации частично повышали разрушающую хроматин активность, тогда как значительных отличий в разрушении дцДНК не наблюдали (**ФИГ. 19**): Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R. Интересно, что D1 мыши и крысы (SEQ ID NO: 4), на долю которых приходится 79% и 78% аминокислот D1 человека, соответственно, имеют несколько проанализированных аминокислотных замен, в том числе Q31R, Q49K и Q79K (**ФИГ. 20**). Анализ супернатантов из клеток HEK293, которые экспрессируют D1 мыши и D1 человека, показал, что D1 мыши имеет повышенную активность для разрушения хроматина, по сравнению с D1 человека (**ФИГ. 21**). *ДНКаза1$^{-/-}$ДНКаза1l3$^{-/-}$* мышам инъецировали смесь *Csf3* и D1 мыши (*мДНКаза1,* SEQ ID NO: 3), D1 человека (*чДНКаза1,* SEQ ID NO: 1) или пустую контрольную плазмиду (*Ктрл*). Мыши, получавшие контрольную плазмиду, умирали в течение 7 дней, тогда как экспрессия D1 мыши

обеспечивала полную защиту в течение по меньшей мере 28 дней (**ФИГ. 21**). Неожиданно экспрессия D1 человека продемонстрировала только частичную защиту от гибели и более половины животных умирали в течение 14 дней (**ФИГ. 21**), что указывает на то, что D1 человека является менее эффективным при, в разрушении внутрисосудистых НВЛ, чем D1 мыши. Далее осуществляли мутации Q31R, Q49K, Q79R и W209R в D1 человека для получения подобного мышиному варианта D1 (SEQ ID NO: 5). Всего осуществляли шесть мутаций (Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, G262K) для получения подобного крысиному варианта D1 (SEQ ID NO: 6). Оба подобных таковым у грызунов варианта D1 клонировали в вектор экспрессии гепатоцитов и доставляли вместе с *Csf3 ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышам. Наблюдали, что генная терапия с подобным мышиному и подобным крысиному вариантом D1 обеспечивает полную защиту от опосредованной НВЛ окклюзии сосудов и смерти (**ФИГ. 22**). Важно отметить, что экспрессия in vitro подобного таковому у грызунов варианта D1 человека демонстрировала повышенную активность разрушения хроматина (**ФИГ. 22**). В совокупности, данные иллюстрируют, что (a) D1 человека имеет ограниченную способность для разрушения НВЛ in vivo; (b) перенос множества катионных аминокислот от D1L3 человека к D1 человека создает гиперактивные варианты.

Осуществляли несколько попыток получить гиперактивные варианты D1 (*6, 12, 13, 21-29*). Было обнаружено 184 мутаций, которые изменяли 82 из 282 аминокислот D1 дикого типа человека (**ФИГ. 23**). Выравнивание аминокислотных последовательностей D1 дикого типа человека и D1L3 человека выявило три мутации с приобретением функции в D1 человека, которые уже присутствуют в D1L3 дикого типа человека (**ФИГ. 23**): Q31R (соответствует Q9R в D1 без сигнального пептида), T227K (T205K) и A136F (A114F). Тогда как мутации Q31R и T227K могут изменять ДНК-связывающие свойства hD1 и, таким образом, вызывать гиперактивность, A136F обеспечивает устойчивость к ингибированию с помощью мономерного актина *(21-24, 26, 29)*.

Конструировали новый вариант D1, который несет комбинацию Q31R/T227K/A136F (SEQ ID NO: 7), и сравнивали его ферментативную активность с D1 дикого типа (SEQ ID NO: 1), а также с вариантами D1, которые несут одиночные мутации в Q31R, T227K, A136F или комбинированную мутацию в Q31R и T227K (SEQ ID NO: 8). Исследовали разрушающую дцДНК и хроматин активность в супернатантах культуры трансфицированных клеток HEK293. Не наблюдали значительных отличий в разрушающей дцДНК активности по сравнению с вариантами D1, несущими одиночные или комбинированные мутациями Q31R и T227K (**ФИГ. 24**). Интересно отметить, что хроматин частично и полностью разрушается у мутантов A136F и с комбинированной мутацией Q31R/T227K/A136F, соответственно (**ФИГ. 24**). Далее было проверено, способен ли вариант Q31R/T227K/A136F D1 к профилактике НВЛ-опосредованных летальных окклюзий сосудов у нейтрофильных *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей. Все мыши, получавшие контрольную плазмиду без ДНКаз, умирали, тогда как все мыши, которые экспрессировали вариант D1 (SEQ ID NO: 7), доживали до конца эксперимента без появления признаков дистресса (**ФИГ. 24**). С применением очищенных белков, наблюдали,

что тройная аминокислотная замена повышает разрушающую хроматин активность приблизительно в 10-20 раз по сравнению с D1 дикого типа без детектируемых отличий в разрушающей дцДНК активности (**ФИГ. 25**). Хроматин из ядер и НВЛ содержит актин (*30, 31*). Данные говорят о том, что разрушение хроматина вариантами D1 требует катионные аминокислотные замены, а также мутации, которые придают устойчивость к актину - две особенности, которые присутствуют в D1L3 дикого типа. Чтобы дополнительно подтвердить это заявление, получают вариант D1, который имеет свойства комбинации мутаций A164K и A136F (SEQ ID NO: 9). Действительно, наблюдали значительное повышение разрушающей хроматин активности в варианте D1 с обоими мутациями (**ФИГ. 26**), что подтверждает гипотезу.

Разработка конструирования структурного блока членов семейства белков ДНКазы1

D1L3 имеет три сайта, которые содержат дополнительные аминокислоты: C-концевой хвост начинается после Q282 (NH_2-SSRAFTBSKKSVTLRKKTKSKRS-COOH) (SEQ ID NO:33) и в двух сайтах в ферменте с S79/R80 и на K226 (**ФИГ. 17**). Присоединяли 23 аминокислоты C-концевого хвоста D1L3 к C-концу D1 (*10, 28*). Наблюдали, что вставка остатка аргинина в положении 226 ДНКазы1 (A226_T227insK) генерировала вариант D1 со сниженной ферментативной активностью для разрушения дцДНК, в то время такой эффект при замене T227K не наблюдался (**ФИГ. 27**). В связи с этим, вставка остатка K/R сопровождается риском снижения функции D1. Вставка заряженной аминокислоты может влиять на локальную структуру белка. Учитывая, что D1 является глобулярным ферментом, который включает одну аминокислотную цепь [**ФИГ. 28,** (*27*)], возможно такое локальное изменение может сделать весь фермент неактивным. Действительно, многочисленные неконсервативные мутации по всей аминокислотной последовательности D1 инактивируют фермент (*12, 25, 26*). Была выдвинута гипотеза о том, что перенос локальных структур белков путем введения не только одиночных остатков аргинина и лизина, но и соседних последовательностей аминокислот, снижает риск инактивации. В D1 и D1L3 искали консервативные аминокислоты в непосредственной близости от A226_T227insK, которые могут быть использованы в качестве якоря для вставки. Мотив D223/T224/T225 и консервативный T229 в D1 были идентифицированы в качестве N-концевого и C-концевого якорей, соответственно (**ФИГ. 27**). Заменяли 3 аминокислоты в D1 (ATP) 4 аминокислотами, в том числе K226, от D1L3 (V<u>K</u>KS) in silico. Экспрессия кДНК нового варианта D1 (A226_P228delinsVKKS) в клетках HEK239 выявила функционально активный фермент со схожей разрушающей дцДНК активностью, в сравнении с D1 дикого типа (**ФИГ. 27**). Данные говорят о том, что вариабельные аминокислоты между консервативными аминокислотами являются взаимозаменяемыми между D1 и D1L3.

Была разработана концепция технологии структурных блоков для переноса ферментативных свойств от одного члена семейства белков D1 к другому. Технологию характеризуют следующие кардинальные этапы (**ФИГ. 29**):

(1) Обеспечение выравнивания белок-белок донорной и реципиентной ДНКаз.

(2) Идентификация вариабельной аминокислоты или аминокислотной последовательности для переноса

(структурный блок).

(3) Идентификация консервативных аминокислот в донорной и реципиентной ДНКазах, которые располагаются

против и по ходу транскрипции от структурного блока (якорей), соответственно.

(4) Замена кДНК, которая кодирует структурный блок между C- и N-якорями у реципиентной

ДНКазы, с помощью кДНК между якорями в донорной ДНКазе.

(5) Синтез кДНК химерной ДНКазы, с последующей in vitro/in vivo экспрессией в организме-реципиенте, который предпочтительно является дефицитным и по донорной, и по реципиентной ДНКазе (например, клетки CHO или *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$мыши).

Конструирование вариантов ДНКазы1 через технологию структурных блоков

Выравнивание D1 и D1L3 среди множества видов от человека, мыши, крысы и шимпанзе (**ФИГ. 30**), демонстрирует, что N- и C-концевые якоря у этих видов сохраняются. Эти якорные аминокислоты или аминокислотные последовательности фланкируют 62 структурных блока вариабельных аминокислот и аминокислотных последовательностей, которые включают аминокислотную последовательность в D1 (ATP) и D1L3 (VKKS) из вышеупомянутых экспериментов в качестве структурных блоков №49 (**ФИГ. 31**).

Перенос этих структурных блоков из D1L3 на D1 генерирует варианты D1 со следующими мутациями (**ФИГ. 31**): 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136_I137delinsFV, R139W, F141_F144delinsQSPH, E146_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157_A158delinsTT, G160_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170_D171delinsVE, L174T, Q177_K179delinsKHR, G181_L182delinsKA, D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA, S204_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N, V238_A239delinsLR, M241_A246delinsQEIVSS, D250K, A252_P254delinsNSV, N256D, A259_A260delinsKA, G262K, S264_L267delinsTEEE, Q269_I271delinsLDV, Y275F, V279_M280delinsFK и K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

Следующие варианты D1L3 создаются при условии, что структурные блоки переносят с D1 на D1L3 (**ФИГ. 31**): M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V,

K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F_136VdelinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156_T157delinsAA, E159_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169_E170delinsYD, T173L, K176_R178delinsQEK, K180_A181delinsGL, N183_F186delinsDVML, P198_A201delinsRPSQ, K203_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220_E221delinsSA, V225_S228delinsATP, N230H, L238_R239delinsVA, Q241_S246delinsMLLRGA, K250D, N252_V254delinsALP, D256N, K259_A260delinsAA, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM и Q282_S305delinsK.

Далее, концептуализировали последовательный подход к конструированию вариантов D1 с активностью D1L3, который начинается с переноса множества соседствующих структурных блоков (кластеров), с продолжением переноса отдельных структурных блоков и завершением переноса отдельных аминокислот или комбинации множества структурных блоков в новые химерные ферменты (**ФИГ. 32**). Этот подход снижает количество химер D1-D1L3 в первоначальном скрининге.

Чтобы протестировать этот способ, конструировали в общем 19 вариантов D1, содержащих либо отдельные структурные блоки, либо кластеры из кластера структурного блока из D1L3 (**ФИГ. 31**). Эти варианты D1 имеют следующие аминокислотные мутации: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS/I30_T32delinsVRS/E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK/Y54C/I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK/S65_K72delinsSNNRICPI/L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT/R101Q/L103A/V105L, R107_Q110delinsKEKL/A113_S116delinsVKRS/Y118H/D120H, G122_N128delinsYQDGDA/T130S/N132S, A136_I137delinsFV, R139W/F141_F144delinsQSPH/E146_E149delinsAVKD/A151V/V153I/A157_A158delinsTT/ G160_A162delinsETS/A164K, A168E/Y170_D171delinsVE/L174T, Q177_K179delinsKHR/G181_L182delinsKA/D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A2 22delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N/V238_A239delinsLR/M241_A246delinsQEIVSS/D250K/A252_P254delinsNSV, N256D/A259_A260delinsKA/G262K/S264_L267delinsTEEE/Q269_I271delinsLDV и Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS. Далее клонировали кДНК в вектор экспрессии, который трансфицировали в клетки HEK293. Анализ клеточных супернатантов демонстрировал разрушение дцДНК у всех образцов (**ФИГ. 33**). Кроме того, наблюдали, что перенос структурных блоков (СБ) 11 (смотри SEQ ID NO: 10), СБ 12-14 (смотри SEQ ID NO: 11), СБ 26 (смотри SEQ ID NO: 12), СБ 41-48 (смотри SEQ ID NO: 13**)** и СБ 49 (смотри SEQ ID NO: 14) из D1L3 в D1 приводил к получению ферментов с повышенной разрушающей хроматин активностью. Все эти химерные ферменты проявляли одинаковую или большую активность для разрушения

субстратов дцДНК, чем в случае D1 дикого типа. Структурные блоки 11 (RNSRRGI в SEQ ID NO: 2) и 49 (VKKS в SEQ ID NO: 2) из D1L3 содержат R80/R81 и K227, соответственно, которые отсутствуют в D1. Кластер 41-48 СБ D1L3 (PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE из SEQ ID NO:2) имеет 5 дополнительных остатков аргинина и лизина, в отличие от его аналога в D1 (RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA SEQ ID NO:1). Эти дополнительные катионные аминокислоты могут быть ответственны за гиперактивность. Структурные блоки D1 12-14 и 26 содержат аминокислотные последовательности H86-R95 и A136-V138 в SEQ ID NO: 1, которая содержит аминокислотные остатки, которые являются необходимыми для связывания D1-ингибитора актина. Таким образом, замена этих аминокислотных последовательностей соответствующими структурными блоками из D1L3, которые не взаимодействуют с актином, вероятно, создает устойчивые к актину варианты D1. Теперь объединяли СБ 11, 14, 26, 41-19 в отдельном новом варианте D1 (SEQ ID NO: 15)**.** Наблюдали, что комбинация этих СБ с приобретением функции повышала разрушение хроматина варианта D1 до уровней D1L3 дикого типа (**ФИГ. 33**). В связи с этим, технология BB относится к робастному способу для получения гиперактивных вариантов D1.

Конструирование вариантов ДНКаза1-подобного фермента 3 посредством технологии использования структурных блоков

Кластер СБ 60-62 D1L3 содержит аминокислоту от его С-концевого хвоста (**ФИГ. 33**). Хвост начинается после L281 (**ФИГ. 34**) и содержит аминокислотную последовательность QSSRAFTBSKKSVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO:33), которая включает в себя двухполовинный NLS. D1L3 требуется С-концевой хвост для разрушения ДНК в липидных везикулах, в том числе в реагентах для трансфекции и апоптотических тельцах (*7, 10, 28*). Кроме того, С-концевой хвост требуется для разрушения безлипидного и внеклеточного хроматина посредством D1L3 (*7*). Оба вывода основаны на варианте D1L3, в котором отсутствуют аминокислоты после Q282, и поэтому он неактивен при разрушении этих субстратов. Wilbert et al. прикрепляли С-концевое удлинение D1L3 к С-концу D1 и, таким образом, переносили способность разрушения ДНК в липидных везикулах к D1 (*10, 28*). Здесь использовали технологию BB для переноса С-конца от D1L3 на D1 и наоборот. Применяли консервативный мотив S272/D273/H274, который расположен перед терминальным бета-листом в D1 (**ФИГ. 28**), в качестве N-якоря и заменяли терминальные 3 структурных блока между D1 и D1L3 (**ФИГ. 34**). В этом подходе получали вариант D1, который имеет С-концевое удлинение D1L3 из-за мутаций Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16) и усеченный вариант D1L3 из-за мутаций F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). Экспрессировали и варианты ферментов, и ферменты дикого типа в клетках HEK293 и исследовали активность ДНКазы в супернатанте. Неожиданно обнаружили, что вариант D1 с С-концом D1L3 не разрушает хроматин, тогда как вариант D1L3, у которого недоставало С-конца фермента дикого типа, все еще был способен расщеплять хроматин (**ФИГ. 34**). Фактически,

наблюдали повышенную разрушающую хроматин активность с этим вариантом D1L3. Чтобы подтвердить этот вывод, проверяли, существует ли усеченный вариант D1L3 in vivo, и наблюдали, что его экспрессия защищала от НВЛ-опосредованной гибели нейтрофильных *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ мышей (**ФИГ. 34**). В заключение, делеция С-конца не ингибирует, а скорее повышает функцию D1L3 для разрушения безлипидного и внеклеточного хроматина.

Сывороточные протеазы, в частности плазмин, разрушают D1L3, но не D1 (*9*). Чувствительность D1L3 к протеазной активности может ограничивать его использование в клинической практике. Гликозилированные белки демонстрируют усиленную защиту против протеаз (*32*). Используя анализ с применением программного обеспечения, идентифицировать известную консенсусную последовательность для гликозилирования в D1L3 человека и мыши не удалось. Анализ D1 человека с применением программного обеспечения показал 2 сайта гликозилирования, что наблюдали и in silico, и in vitro (*9*). Высказано предположение, что гликозилированные варианты D1L3 могут увеличивать период полувыведения из кровообращения из-за улучшенной устойчивости к сывороточным протеазам. Сайт гликозилирования требует минимальную консенсусную последовательность N-X-T/S. D1 содержит два известных сайта N-гликозилирования, N40 (N18 без сигнального пептида) и N128 [(N106 без сигнального пептида, (*9*)]. Аминокислоты сайтов D1-гликозилирования N40-X-T42 и N128-X-T130 соответствовали D38-X-N40 и A127-X-V129 в D1L3. В связи с этим, гликозилированная версия D1L3 должна содержать аминокислотные мутации D38N, N40T, A127N и V129T (смотри SEQ ID NO: 18). Вместо использования обычных точечных мутаций для вставки этих аминокислотных замен, применяли технологию BB для переноса сайтов D1-гликозилирования N40-X-T42, который лежит в пределах СБ4 (MSNATLVSY в SEQ ID NO: 1) и N128-X-T130, который лежит в пределах кластера СБ 23-25 (GCEPCGNDTFN в SEQ ID NO: 1), с D1 на D1L3 (**ФИГ. 35**). В связи с этим, получали два новых варианта D1L3, которые имеют мутации Q36_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19) и Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20), соответственно. Эти варианты D1L3 экспрессировали вместе с ферментом дикого типа в клетках HEK293. Далее, анализировали супернатант с помощью вестерн-блоттинга с применением нацеливания поликлонального антитела на эпитоп в С-концевом хвосте фермента дикого типа для детектирования фермента дикого типа, а также вариантов D1L3. Как и ожидалось, варианты D1L3 демонстрируют полосы с более высокой молекулярной массой, предположительно, для гликозилирования, по сравнению с ферментом дикого типа (**ФИГ. 35**). Вариант D1L3 с гликозилированием по N40 или N128 сохранял свою разрушающую хроматин активность (**ФИГ. 35**). В заключение, полученные данные дают возможность предположить, что технология BB может быть применена для переноса сайтов гликозилирования с D1 на D1L3, что может генерировать варианты D1L3 с повышенными устойчивостью к протеазам и периодом полувыведения у пациентов.

Терапия с ДНКаза1-подобным ферментом 3 и ее вариантом

Наконец, исследовали терапевтические эффекты D1L3 in vivo. Гистологический

анализ сосудистых сгустков НВЛ демонстрирует плотные агрегаты хроматина (**ФИГ. 36A**), указывая на то, что безгистоновые сайты расщепления для D1 редко встречаются in vivo. В связи с этим, было предположено, что интенсивная терапия с D1L3 дикого типа является более эффективной в разрушении внутрисосудистым НВЛ, чем D1 дикого типа. Чтобы проверить гипотезу, экспрессировали *Csf3* у *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ дефицитных мышей для индуцирования сосудистых сгустков НВЛ. Важно отметить, что перед летальным исходом у мышей с окклюзией сосудов в связи с НВЛ развивалась гематурия и гипотермия, которые могут быть обнаружены неинвазивно. Таким образом, животная модель позволяет определять и, следовательно, выбирать мышей, которые имеют сформированные НВЛ, чтобы тестировать потенциальные лекарственные средства для интенсивной терапии против НВЛ (**ФИГ. 36B**). Здесь исследовали очищенные D1 дикого типа человека (дорназа альфа; SEQ ID NO: 1), D1L3 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2) и гиперактивный вариант D1L3 [D1L3^{V}; (SEQ ID NO: 17)] для интенсивной терапии против НВЛ. *Csf3* инъецировали *ДНКаза1*$^{-/-}$*ДНКаза1l3*$^{-/-}$ дефицитным мышам. Спустя 72 часа у первых отдельных животных начинали развиваться гипотермия и гематурия. Наблюдали падение температуры тела на 4°C или более и присутствие красной мочи в качестве критериев включения в тестирование. Мышей, у которых развивались эти фенотипы, рандомизировали в различные группы лечения. Животные получали одиночную дозу, внутривенную инъекцию в хвостовую вену 1 мг/кг D1, D1L3 или носителя. Спустя 30 минут животных подвергали эвтаназии, чтобы собрать биопробы (кровь и органы). Количественное определение сгустков НВЛ в сосудистой сети легких демонстрировало, что НВЛ закупорили кровеносные сосуды у мышей, получавших носитель или терапию D1 (**ФИГ. 36D**). Важно отметить, что мыши, которым инъецировали D1L3 и D1L3^{V} не демонстрировали или демонстрировали малое количество НВЛ (**ФИГ. 36D**). У пациентов циркулирующая ДНК имеет размер ДНК в мононуклеосомах [180 пар оснований, (*33*)], что указывает на то, что она является продуктом распада высокомолекулярной ДНК в хроматине. Циркулирующая ДНК обычно используется в качестве суррогатного маркера образования внутрисосудистых НВЛ, но также может происходить из поврежденной и некротической ткани (*34*). ДНК оценивали количественно в сыворотке с применением флуоресцентной метки ДНК. Обнаружили, что инъекция D1L3 и D1L3^{V}, но не D1 или носитель, вызывали значительное повышение уровней циркулирующей ДНК (**ФИГ. 36E**). Выделение и визуализация циркулирующей ДНК демонстрирует мультимерные фрагменты из 180 пар оснований, что указывает на наличие моно- и олигонуклеосом в сыворотке у мышей, получавших терапию D1L3 (**ФИГ. 36F**). Мыши, получавшие D1L3^{V}, демонстрировали только моно- и ди-нуклеосомы. Данные подтверждают гиперактивность D1L3^{V} in vivo. Изоляты ДНК из сыворотки мышей, получавшие терапию D1, демонстрировали неотчетливые мазки ДНК различных размеров, тогда как ДНК не возможно было выделить из сыворотки мышей, которым инъецировали носитель (**ФИГ. 36F**). В связи с этим, D1L3 может быть применена не только для профилактики, но и для интенсивной терапии заболеваний, которые связаны с НВЛ.

Дополнительно исследовали терапевтическое применение D1L3^{V} в модели

ишемически-реперфузионного повреждения (**ФИГ. 37А**). Вкратце, одно яичко самцов крыс дикого типа подвергали перекруту семенного канатика таким образом, как это описано ранее (*35*). Процедура приводит к ишемическому повреждению тканей. После рандомизации и раскручивания семенного канатика, крысы ежедневно получали три инъекции носителя дорназы альфа (D1, 1 мг/кг) или очищенного варианта ДНКазы1L3 (SEQ ID NO: 17, $D1L3^{V}$, 1 мг/кг). Спустя 7 дней отбирали ишемическое яичко и не получавшее лечение яичко. Терапия с помощью $D1L3^{V}$, но не физиологическим раствором или D1, значительно снижала атрофию яичек (**ФИГ. 37В**). Более того, терапия с помощью $D1L3^{V}$, но не физиологическим раствором или D1, существенно снижала повреждение тканей и большинство животных не проявляли признаков повреждения (**ФИГ. 37С**). В совокупности, данные идентифицируют D1L3 как мощную терапию против ишемически-реперфузионного повреждения.

Разработка лекарственного препарата на основе вариантов ДНКазы1, ДНКаза1-подобного фермента 3 и его вариантов

Почти 70% всех белковых терапевтических препаратов производится с использованием клеток яичника китайского хомяка (CHO) (*36*). Действительно, ДНКаза1 дикого типа (дорназа альфа) продуцируется в клетках CHO. Несмотря на значительные преимущества, разработка клеточной линии и крупномасштабное продуцирование в CHO все еще остаются огромной проблемой из-за значительной степени изменчивости и отсутствия надежных способов для прогнозирования или моделирования характеристик роста клеток (*36*). Важно отметить, что клетки CHO не были способны стабильно продуцировать гиперактивные варианты D1, что препятствует их производству для клинических исследований (*12*). Технологические свойства D1L3 неизвестны. В связи с этим, были разработаны стабильные клеточные линии CHO, продуцирующие D1 дикого типа (SEQ ID NO: 1), гиперактивный вариант D1 (SEQ ID NO: 7), D1L3 дикого типа (SEQ ID NO: 2) и гиперактивный вариант D1L3 (SEQ ID NO: 17). Культивировали клеточные линии в биореакторах и наблюдали стабильную экспрессию белка с участием D1 дикого типа и варианта D1, с последним получали сильно повышенные уровни экспрессии (**ФИГ. 38**), иллюстрирующие возможность получения гиперактивного варианта D1 в CHO. Неожиданно, наблюдали только минимальные уровни белка D1L3 дикого типа и варианта D1L3 (**ФИГ. 38**), указывая на серьезную проблему производства D1L3 и их вариантов для клинических исследований.

Из-за высокой плотности клеток в крупномасштабных биореакторах клетки конкурируют за ресурсы и испытывают клеточный стресс, приводящий к повышенной клеточной гибели, называемой апоптозом, программой гибели клеток, используемой многоклеточными организмами, в том числе млекопитающие (*37*). D1L3 воздействует на ДНК в апоптотических тельцах (*7*). Мы предположили, что низкие уровни D1L3 обусловлены поглощением фермента этими апоптотическими пузырьками. Чтобы преодолеть эти ограничения, исследовали продуцирование D1, D1L3 и их вариантов с применением разработанной микробной системы экспрессии, *Pichia pastoris*, одобренного

FDA и в целом признанного как безопасного (GRAS) организма с секретирующими белки способностями (*38, 39*). Ключевое ограничение этого подхода заключается в том, что белки, продуцируемые с помощью *P. pastoris* часто являются гипергликозилированными и могут привести к повышенной иммуногенности (*40*). По составу D1L3 и его вариант представляют собой негликозилированные белки и оптимальные для экспрессии в *P. pastoris.* Подвергали мутации сайты гликозилирования в D1 и его варианте на N40S и N128S, соответственно, для получения дегликозилированных белков (SEQ ID NO: 21, 23). Экспрессию белка в *P. pastoris* обычно достигают с помощью сочетания представляющих интерес белков с секреторными сигнальными пептидами различного происхождения. Этот этап пропускали, чтобы избежать получения иммуногенных химерных белков. Было высказано предложение, что нативный сигнальный пептид D1 и/или D1L3 распознается *P. pastoris.* После того, как осуществляли оптимизацию кодона, экспрессировали кДНК в *P. pastoris* (SEQ ID NO: 22, 24-26). Получали экспрессию D1 и варианта D1 (не показан). Важно, что этот подход, кроме того, сделал возможной экспрессию D1L3 и варианта D1L3, причем последний демонстрирует повышенные уровни экспрессии (**ФИГ. 38**). Белки очищали и подтверждали, что D1L3 имеет повышенную активность (**ФИГ. 38**). В заключение, данные говорят о том, что применение отличных от млекопитающих животных систем экспрессии, таких как *P. pastoris*, делает возможным производство D1L3 и их вариантов для клинических исследований.

Обсуждение

Два разрушающих ДНК фермента широко используются терапевтическим образом на экспериментальных моделях и у пациентов. Стрептодорназа, секретируемая ДНКаза из *Streptococcus spp.*, была протестирована на моделях заболеваний гомотрансплантата кожи, сгустков в мочевом пузыре, санации ран, менингита. ДНКаза1 (в том числе панкреатическая ДНКаза1) используется терапевтическим образом в экспериментальных моделях рака, муковисцидоза, волчанки, тромбоза, инсульта, сепсиса, повреждения легких, атеросклероза, вирусной инфекции, серповидно-клеточной заболевания, инфаркта миокарда, воспаления среднего уха, заживления ран, поражения печени, эндокардита, инфекции печени, панкреатита, первичной дисфункции трансплантата, ишемии/реперфузии конечностей, поражения почек, коагуляции крови, астмы, индуцированного квасцами воспаления, гепаторенального повреждения. Стрептодорназу также используется с целью лечения пациентов с плевральными экссудациями, гемотораксом, внутрипеченочными тромбами, постпневматической анемией, язвами, отоларингологическими состояниями, инфекциями ротовой полости, незначительными повреждениями, синуситом, послеоперационными ринопластиками, бесплодием, мочевым катетером, обработкой раны, тестом кожной реакции. Важно отметить, что, ДНКазу1 исследовали терапевтическим образом у пациентов с пневмококковым менингитом, подагрой, ножными язвами, муковисцидозом, синдромом Картагенера, астмой, лобарным ателектазом, хроническим бронхитом, бронхоэктазой, волчанкой, первичной цилиарной дискинезией, бронхиолитом, эмпиемой, плевральными инфекциями, раком, синдромом

сухого глаза, инфекциями нижних дыхательных путей, хроническими гематомами, болезнью Альцгеймера и обструктивным заболеванием легких. В этом примере, идентифицировали D1L3, ее варианты, а также варианты D1 в качестве новых кандидатов для терапии ДНКазой (**ФИГ. 39**).

Методы

Детектирование разрушающей хроматин активность

Чтобы измерить разрушающую хроматин активность, смешивали образцы с ядрами, выделенными из HEK293 (1500000-3000000 на реакцию), 20 мМ Трис-HCl pH 7,4, 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 50 мМ NaCl и ингибиторами протеазы. После инкубирования образцов в течение 1 часа при температуре 37°C, их нагревали до 65°C в течение 10 минут. Приступали к выделению ДНК с применением мининабора для выделения ДНК из крови QIAamp (Qiagen), в соответствии с инструкциями производителя. Элюент после этого нагружали на агарозный гель и разделяли фрагменты ДНК с помощью гель-электрофореза. Флуоресценцию ДНК гелей записывали с помощью флуоресцентного сканера.

Дополнительные методы описаны в примере 1.

Ссылки

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

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

3. T. A. Fuchs, A. Hakkim, C. F. Urban, in *Inflammation: Fundamental Mechanisms,* K. Ley, Ed. (World Scientific, 2018), chap. 6.

4. D. Shiokawa, S. Tanuma, Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* **40**, 143-152 (2001).

5. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J* **380**, 929-937 (2004).

6. W. F. Baron *et al.*, Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. *Gene* **215**, 291-301 (1998).

7. V. Sisirak *et al.*, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* **166**, 88-101 (2016).

8. M. Jimenez-Alcazar *et al.*, Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **13**, 732-742 (2015).

9. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). *FEBS J* **276**, 1059-1073 (2009).

10. A. Wilber, M. Lu, M. C. Schneider, Deoxyribonuclease I-like III is an inducible macrophage barrier to liposomal transfection. *Mol Ther* **6**, 35-42 (2002).

11. W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, K. C. Holmes, Atomic structure of the

actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44 (1990).

12. C. Lam *et al.*, Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt- and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells. *Biotechnol Prog* **33**, 523-533 (2017).

13. C. Q. Pan *et al.*, Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem* **273**, 18374-18381 (1998).

14. D. Shiokawa, Y. Shika, S. Tanuma, Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. *Biochem J* **376**, 377-381 (2003).

15. R. Mizuta *et al.*, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* **8**, e80223 (2013).

16. H. J. Fuchs *et al.*, Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* **331**, 637-642 (1994).

17. N. M. Rahman *et al.*, Intrapleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection. *N Engl J Med* **365**, 518-526 (2011).

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

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

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

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

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

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

24. C. Q. Pan, R. A. Lazarus, Hyperactivity of human DNase I variants. Dependence on the number of positively charged residues and concentration, length, and environment of DNA. *J Biol Chem* **273**, 11701-11708 (1998).

25. C. Q. Pan, D. V. Sinicropi, R. A. Lazarus, Engineered properties and assays for human DNase I mutants. *Methods Mol Biol* **160**, 309-321 (2001).

26. C. Q. Pan, J. S. Ulmer, A. Herzka, R. A. Lazarus, Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* **7**, 628-636 (1998).

27. G. Parsiegla, C. Noguere, L. Santell, R. A. Lazarus, Y. Bourne, The structure of human DNase I bound to magnesium and phosphate ions points to a catalytic mechanism common to members of the DNase I-like superfamily. *Biochemistry* **51**, 10250-10258 (2012).

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

29. J. S. Ulmer *et al.*, Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic

fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8225-8229 (1996).

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

31. C. F. Urban *et al.*, Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. *PLoS Pathog* **5**, e1000639 (2009).

32. D. Russell, N. J. Oldham, B. G. Davis, Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydr Res* **344**, 1508-1514 (2009).

33. T. A. Fuchs, J. A. Kremer Hovinga, D. Schatzberg, D. D. Wagner, B. Lammle, Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **120**, 1157-1164 (2012).

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

35. M. Boettcher *et al.*, Degradation of Extracellular DNA by DNase1 Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urology* **109**, 223 e221-223 e227 (2017).

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

37. Y. K. Han, Y. G. Kim, J. Y. Kim, G. M. Lee, Hyperosmotic stress induces autophagy and apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering* **105**, 1187-1192 (2010).

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

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

40. R. Daly, M. T. Hearn, Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR* **18**, 119-138 (2005).

Последовательности ДНКаз дикого типа

SEQ ID NO: 1

ДНКаза1 человека (P24855), аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPT
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 2

ДНКаза1L3 человека (Q13609), аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIIL
VMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDV
KHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKK
SVTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 3

ДНКаза1 мыши (P49183): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRYTGLMGTLLTLVNLLQLAGTLRIAAFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRYD
IAVIQEVRDSHLVAVGKLLDELNRDKPDTYRYVVSEPLGRKSYKEQYLFVYRPDQVSIL
DSYQYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVQEFAIVPLHAAPTEAVSEIDALYDVYL
DVWQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTVTSTHCAY
DRIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDFQAEYGLSNQLAEAISDHYPVEVTLRKI

SEQ ID NO: 4

ДНКаза1 крысы (P21704), аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRYDI
AVVQEVRDTHLVAVGKLLDELNRDIPDNYRYIISEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLD
SYHYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVREFAIVPLHSAPTEAVSEIDALYDVYLD
VRQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTATSTHCAYD
RIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDFQAEYRLTNQMAEAISDHYPVEVTLRKT

SEQ ID NO: 34

ДНКаза1L3 мыши (O55070): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSLHPASPRLASLLLFILALHDTLALRLCSFNVRSFGASKKENHEAMDIIVKIIKRC
DLILLMEIKDSSNNICPMLMEKLNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVS
VKTKYHYHDYQDGDTDVFSREPFVVWFHSPFTAVKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELVDV

YTDVRSQWKTENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWQNIRLRTDPKFVWLIGDQEDTTVKKST
SCAYDRIVLCGQEIVNSVVPRSSGVFDFQKAYDLSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTN
NRKSVSLKKRKKGNRS

SEQ ID NO: 35

ДНКаза1L3 крысы (O89107): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSLYPASPYLASLLLFILALHGALSLRLCSFNVRSFGESKKENHNAMDIIVKIIKRC
DLILLMEIKDSNNNICPMLMEKLNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLV
SVKAKYLYHDYQDGDTDVFSREPFVVWFQAPFTAAKDFVIVPLHTTPETSVKEIDELAD
VYTDVRRRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPNFVWLIGDQEDTTVKK
STSCAYDRIVLRGQEIVNSVVPRSSGVFDFQKAYELSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAF
TNSRKSVSLKKKKKGSRS

SEQ ID NO: 36

ДНКаза1 шимпанзе (H2QAH1): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRSMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPAFQWLIPDSADTTATPTH
CAYDRIVVAGMLLQGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 37

ДНКаза1L3 шимпанзе (H2QMU7): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELTPLLLLLLSIHSTLALRICSFNVRSFGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDIILV
MEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSY
HYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVK
HRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAY
DRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS
VTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 38

ДНКаза1-подобный фермент 1 человека (NM_006730): аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMV
LQEVVDSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSSY
VYNDEDDVFAREPFVAQFSLPSNVLPSLVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLEVSQHWQ
SKDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLH
GERCRSLLHTAAAFDFPTSFQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLLLSL
LSPQLCPAA

SEQ ID NO: 39

ДНКаза1-подобный фермент 2 человека (NM_001374): аминокислотная

последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDL
ALVQEVRDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVV
DTYLYPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPH
QAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSEVFKWLI
PDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRSLKPQSATVHDFQEEFGLDQTQALAISDHFPV
EVTLKFHR

С-концевой хвост ДНКазы1L3 человека

SEQ ID NO: 33

аминокислотная последовательность

SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

Последовательности вариантов ДНКазы1

SEQ ID NO: 5

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTH
CAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 6

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVKEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTH
CAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYKLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 7

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVY
LDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHC
AYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 8

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTH
CAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 9

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVKEIDALYDV
YLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTH
CAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 10

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQV
SAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPT
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 11

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPT
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 12

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPT
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 13

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTATP
THCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 14

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD

VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTVKKS
THCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 15

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQV
SAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALY
DVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTV
KKSTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 16

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRY
DIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVS
AVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYD
VYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPT
HCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHFPVEFKLQSSRAFT
NSKKSVTLRKKTKSKRS

Последовательности вариантов ДНКазы1L3

SEQ ID NO: 17

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIIL
VMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDV
KHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 18

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQENKTAMDVIVKVIKRCDIIL
VMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDYQDGDNDTFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDV
KHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKK
SVTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 19

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILV
MEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSY
HYHDYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVK
HRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAY
DRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS

VTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 20

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIIL
VMEIKDSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRS
YHYHDGCEPCGNDTFNREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDV
KHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCA
YDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKK
SVTLRKKTKSKRS

Последовательности, применяемые в *Pichia pastoris*

SEQ ID NO: 21

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSSATLVSYIVQILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVY
LDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHC
AYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 22

кодон-оптимизированная кДНК SEQ ID NO: 21 (**стартовый кодон**, сигнальный пептид):

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCA
AGGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTCAAACCTTTGGCGAGACTAA
AATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCAGATCCTTTCTCGTTACGACATA
GCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAGAC
AATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGT
AGAAACTCCTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCT
GTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAAC
AGAGAACCAGCTATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCC
ATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTAT
GATGTCTACCTGGACGTTCAGGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGG
AGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACT
ATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCACT
CCCACTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTCGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCT
GTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACC
AACTGGCTCAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

SEQ ID NO: 23

аминокислотная последовательность (сигнальный пептид; зрелый белок):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSSATLVSYIVQILSRYD
IALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSA
VDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVY

LDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHC
AYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 24

кодон-оптимизированная кДНК SEQ ID NO: 23 (**стартовый кодон**, сигнальный пептид):

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCA
AGGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCTTTGGCGAGACTAA
AATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTCAGATCCTTTCTCGTTACGACATA
GCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAGAC
AATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGT
AGAAACTCCTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGTCCAGATCAGGTGTCTGCT
GTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACCTTCAAC
AGAGAACCATTCATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCC
ATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTAT
GATGTCTACCTGGACGTTCAGGAAAAATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGG
AGACTTCAACGCTGGTTGCTCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACT
ATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAA
GCCCACTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTCGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGC
TGTCGTACCAGATTCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGAC
CAACTGGCTCAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

SEQ ID NO: 25

кодон-оптимизированная кДНК SEQ ID NO: 2 (**Стартовый кодон**, Сигнальный пептид):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGC
ACTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGA
GGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCT
AGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGCT
GAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGG
TAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGT
TAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTCTCCAG
AGAACCATTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATT
ATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGA
AGTTTACACCGACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTCATTTTCATGGGTG
ATTTCAACGCCGGATGCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAACATCCGTTTGA
GAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAA
AAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCA
TCTGTTGTCCCAAAGTCCAACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACT
GAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCACTTCCCTGTAGAGTTTAAGCTGCAATCC
TCCAGAGCATTCACTAACTCTAAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCT
AAGAGATCG

SEQ ID NO: 26

кодон-оптимизированная кДНК SEQ ID NO: 17 (**стартовый кодон**, сигнальный пептид):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGC
ACTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGA
GGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCT
AGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGCT
GAATAGAAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACTACGTTATCTCTTCTAGGCTGGG
TAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAAAGCTAGTTTCCGT
TAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTCTCCAG
AGAACCATTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATT
ATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGA
AGTTTACACCGACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTCATTTTCATGGGTG
ATTTCAACGCCGGATGCTCATATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAACATCCGTTTGA
GAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAA
AAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCA
TCTGTTGTCCCAAAGTCCAACTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACT
GAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCACTACCCTGTAGAGGTCATGTTGAAG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант ДНКаза1-подобного фермента 3 (D1L3), содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична ферменту, который определен SEQ ID NO: 2, с одной или более модификациями по сравнению с SEQ ID NO:2, выбранными из: мутировавшего сайта связывания ДНК или мутировавшего сайта связывания хроматина, сайта гликозилирования, инактивации сигнала внутриядерной локализации и делеции всего или части С-концевого хвоста.

2. Вариант D1L3 по п.1, причем вариант белка D1L3 имеет повышенную стабильность белка, повышенную устойчивость к протеазе, повышенную биологическую доступность, повышенный период полувыведения из кровообращения, более высокие уровни продуцирования с помощью систем экспрессии in vitro и/или по существу одинаковую или более высокую разрушающую ДНК и/или хроматин и/или НВЛ активность по сравнению с белком D1L3 дикого типа согласно SEQ ID NO:2.

3. Вариант D1L3 по п.1, причем вариант слит или конъюгирован с белком или функциональной группой носителя.

4. Вариант D1L3 по п.1, причем вариант содержит одну или более консенсусных последовательностей гликозилирования NX(T/S).

5. Вариант D1L3 по п.4, в котором консенсусная последовательность гликозилирования содержит замену D38N и замену N40T или N40S, и/или замену A127N и замену V129T или V129S с положениями аминокислот в соответствии с SEQ ID NO:2.

6. Вариант D1L3 по п.1, причем вариант содержит инактивированный сигнал внутриядерной локализации (NLS).

7. Вариант D1L3 по п.6, в котором NLS инактивирован путем делеции всего или части NLS1 и/или NLS2 согласно SEQ ID NO:2.

8. Вариант D1L3 по п.6, в котором NLS инактивирован путем замены и/или делеции аминокислот в NLS1 и/или NLS2.

9. Вариант D1L3 по п.8, в котором NLS2 в SEQ ID NO:2 делетирован.

10. Вариант D1L3 по п.1, включающий делецию всего или части С-концевого хвоста, который определен SEQ ID NO: 33, и/или замену аминокислот в С-концевом хвосте.

11. Вариант D1L3 по любому из пп. 1-10, причем вариант имеет по меньшей мере одну замену структурных блоков из ДНКазы1 (D1).

12. Вариант D1L3 по п.11, причем вариант имеет одну или более замен структурных блоков, выбранных из: M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F_136VdelinsAI, W138R, Q140_H143delinsFSRF, A145_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156_T157delinsAA,

E159_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169_E170delinsYD, T173L, K176_R178delinsQEK, K180_A181delinsGL, N183_F186delinsDVML, P198_A201delinsRPSQ, K203_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220_E221delinsSA, V225_S228delinsATP, N230H, L238_R239delinsVA, Q241_S246delinsMLLRGA, K250D, N252_V254delinsALP, D256N, K259_A260delinsAA, K262G, T264_E267delinsSDQL, L269_V271delinsQAI, F275Y, F279_K280delinsVM и Q282_S305delinsK в SEQ ID NO:2.

13. Вариант D1L3 по п.11, содержащий следующие аминокислотные модификации по сравнению с SEQ ID NO:2: F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK.

14. Вариант D1L3 по п.11, содержащий следующие аминокислотные модификации по сравнению с SEQ ID NO:2: Q36_I45delinsMSNATLVSYI.

15. Вариант D1L3 по п.11, содержащий следующие аминокислотные модификации по сравнению с SEQ ID NO:2: Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N.

16. Вариант D1L3 по п.11, содержащий 2 или 3 модификации по сравнению с SEQ ID NO:2, выбранные из: F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK, Q36_I45delinsMSNATLVSYI и Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N.

17. Фермент ДНКаза, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична ферменту с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, и содержащий по меньшей мере одну замену структурных блоков из ДНКазы1 человека.

18. Фермент ДНКаза по п.17, причем фермент содержит замены структурных блоков F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK, и который необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

19. Фермент ДНКаза по п.17, причем фермент содержит следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:2: Q36_I45delinsMSNATLVSYI/ Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N и необязательно имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

20. Фермент ДНКаза, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична ферменту согласно SEQ ID NO:2, причем фермент имеет замену аспарагина в положении, соответствующем положению 38 и/или 127 SEQ ID NO:2, и гликозилированный аспарагин N38 и/или N127.

21. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариант D1L3 по любому из пп. 1-20.

22. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.21.

23. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.22.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант D1L3 по любому из пп. 1-20, полинуклеотид по п.21 или вектор по п.22 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Фармацевтическая композиция по п.24, содержащая вариант D1L3, составленный для топического, парентерального или ингаляционного введения.

26. Фармацевтическая композиция по п.24, составленная для внутрикожного, внутримышечного, внутрибрюшинного, внутрисуставного, внутривенного, подкожного, внутриартериального, перорального, сублингвального, ингаляционного или чрескожного

введения.

27. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 24-26, содержащая вариант D1L3, продуцируемый в системе экспрессии отличных от млекопитающих животных.

28. Фармацевтическая композиция по п.24, в которой система экспрессии отличных от млекопитающих животных представляет собой *Pichia pastoris*.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, в которой *Pichia pastoris* кодирует вариант D1L3, который содержит сигнальный пептид D1L3 человека дикого типа с SEQ ID NO:2.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 24-29, которая дополнительно содержит белок ДНКазы1 или его вариант, причем выделенный полинуклеотид кодирует белок ДНКазы1 или его вариант, или вектор, содержащий указанный выделенный полинуклеотид.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, содержащая вариант D1L3 и белок ДНКазы1 или его вариант в соотношении (м/м) от 100:1 до 1:100.

32. Фармацевтическая композиция по п.31, в которой соотношение составляет от 10:1 до 1:10 и составляет необязательно приблизительно 1:1.

33. Вариант ДНКазы1 (D1), содержащий аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80% идентичной ферменту согласно SEQ ID NO:1, и имеющий одну или более модификаций по сравнению с SEQ ID NO:1, которые выбраны из: одного или более мутировавших сайтов связывания ДНК или мутировавших сайтов связывания хроматина, мутировавшего сайта связывания актина, мутировавшего сайта гликозилирования, присоединения сигнала внутриядерной локализации, присоединения С-концевого хвоста, имеющего по меньшей мере 50% идентичность последовательности с С-концевым хвостом белка D1L3 дикого типа согласно SEQ ID NO:2; и/или N-концевого или С-концевого слияния с функциональной группой, увеличивающей период полувыведения.

34. Вариант D1 по п.33, содержащий одну или более замен структурных блоков выбранных из: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsIILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136_I137delinsFV, R139W, F141_F144delinsQSPH, E146_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157_A158delinsTT, G160_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170_D171delinsVE, L174T, Q177_K179delinsKHR, G181_L182delinsKA, D184_L187delinsNFIF, R199_Q202delinsPKKA, S204_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N, V238_A239delinsLR, M241_A246delinsQEIVSS, D250K, A252_P254delinsNSV, N256D, A259_A260delinsKA, G262K, S264_L267delinsTEEE, Q269_I271delinsLDV, Y275F, V279_M280delinsFK и K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS в SEQ ID NO:1.

35. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ

ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT.

36. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: H86N/ V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR.

37. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: A136_I137delinsFV.

38. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1:

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

39. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1: A226_P228delinsVKKS.

40. Вариант D1 по п.34, содержащий следующие модификации по сравнению с SEQ ID NO:1:

Y275F/ V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

41. Фермент ДНКаза, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична ферменту согласно SEQ ID NO:1, и содержащий замену, вставку или добавление одного или более остатков аргинина и/или лизина, причем фермент ДНКаза имеет повышенную хроматин-разрушающую активность по сравнению с ферментом с SEQ ID NO:1.

42. Фермент ДНКаза по п.41, в котором один или более остатков аргинина и/или лизина представляют собой аминокислотные замены, выбранные из замен в положениях, соответствующих положениям 31, 41, 49, 52, 68, 76, 79, 81, 92, 109, 114, 115, 164, 177, 181, 200, 201, 204, 209, 213, 227, 239, 250, 259, 262 и 280 SEQ ID NO:1.

43. Фермент ДНКаза по п.41, содержащий замену и/или вставку двух или более остатков аргинина и/или лизина.

44. Фермент ДНКаза по п.43, содержащий замену и/или вставку трех или более остатков аргинина и/или лизина.

45. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-44, содержащий аргинин или лизин в одном или более положениях, соответствующих положениям 31, 49, 76, 92, 109, 164, 177, 201, 204 и 213 SEQ ID NO:1.

46. Фермент ДНКаза по п.41, содержащий аргинин или лизин в положениях, соответствующих положениям 31, 49, 79 и 209 SEQ ID NO:1.

47. Фермент ДНКаза по п.41, содержащий аргинин или лизин в положениях, соответствующих положениям 31, 49, 79, 177, 209, 262 SEQ ID NO:1.

48. Фермент ДНКаза по п.41, содержащий остаток лизина или аргинина в положениях, соответствующих положениям 31 и 227 SEQ ID NO:1.

49. Фермент ДНКаза по п.41, причем фермент имеет лизин или аргинин в положении, соответствующем положению 164 SEQ ID NO:1.

50. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-49, содержащий аминокислотную замену в положении 136 по сравнению с SEQ ID NO:1 и необязательно содержащий A136F.

51. Фермент ДНКаза по п.42, содержащий одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K и K280M и, необязательно, с модификацией, которая приводит к устойчивости к актину, причем модификация, которая приводит к устойчивости к актину, необязательно представляет собой A136F по сравнению с SEQ ID NO:1.

52. Фермент ДНКаза по п.42, причем если фермент содержит замену Q31R или T227K, фермент содержит по меньшей мере две аминокислотные модификации, выбранные из Q31R, A41K, Q49R, S52K, T68R, N76K, Q79R, D80_A81insR, A81R, P92R, D109K, V114K, D115R, A164K, Q177K, G181K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, A226_T227insK, T227K, A239R, D250K, A259K, G262K и K280M.

53. Фермент ДНКаза по п.52, содержащий аминокислотные замены Q31R и T227K по сравнению с SEQ ID NO:1.

54. Фермент ДНКаза по п.51, содержащий аминокислотную замену A164K по сравнению с SEQ ID NO:1.

55. Фермент ДНКаза по п.45, содержащий одну или более аминокислотных замен, выбранных из Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R и G262K.

56. Фермент ДНКаза по п.55, содержащий следующие аминокислотные замены: Q31R, Q49K, Q79R, A164K и W209R.

57. Фермент ДНКаза по п.55, содержащий следующие аминокислотные замены: Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K.

58. Фермент ДНКаза по п.48, содержащий следующие аминокислотные замены: Q31R, T227K и A136F.

59. Фермент ДНКаза по п.49, содержащий следующие аминокислотные замены: A164K и A136F.

60. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-59, причем фермент содержит консенсусную последовательность гликозилирования, которая содержит замену N40S и/или замену N128S по сравнению с SEQ ID NO:1.

61. Фермент ДНКаза по п.60, содержащий аминокислотные замены Q31R, N40S, A136F, N128S и T227K по сравнению с SEQ ID NO:1.

62. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-61, причем фермент на по меньшей мере 90% идентичен ферменту согласно SEQ ID NO:1, или на по меньшей мере приблизительно 95% идентичен ферменту согласно SEQ ID NO:1, или на по меньшей мере приблизительно 97% идентичен ферменту согласно SEQ ID NO:1.

63. Фермент ДНКаза, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична ферменту согласно SEQ ID NO:1, и содержащий по меньшей мере одну замену структурных блоков из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, причем фермент ДНКаза имеет повышенную хроматин-разрушающую

активность по сравнению с ферментом ДНКазой с SEQ ID NO:1.

64. Фермент ДНКаза по п.63, причем фермент содержит по меньшей мере две смежные замены структурных блоков из SEQ ID NO:2.

65. Фермент ДНКаза по п.63, причем фермент содержит замену структурных блоков Q79_T84delinsRNSRRGIT и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

66. Фермент ДНКаза по п.64, причем фермент содержит замены структурных блоков H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

67. Фермент ДНКаза по п.63, причем фермент содержит замену структурных блоков A136_I137delinsFV и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

68. Фермент ДНКаза по п.64, причем фермент содержит замены структурных блоков R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

69. Фермент ДНКаза по п.63, причем фермент содержит замену структурных блоков A226_P228delinsVKKS и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

70. Фермент ДНКаза по п.63, содержащий замены структурных блоков Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR, A136_I137delinsFV, R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE, A226_P228delinsVKKS и необязательно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

71. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-70, содержащий замены структурных блоков Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

72. Фермент ДНКаза по любому из пп. 41-71, причем фермент проявляет одно или более свойств, выбранных из: схожей или более высокой аффинности к депротеинизированной ДНК, по сравнению с ферментом согласно SEQ ID NO:1, более высокой активности разрушения хроматина по сравнению с ферментом согласно SEQ ID NO:1, ферментативной активности, которая устойчива к ингибированию актином по сравнению с ферментом согласно SEQ ID NO:1, и их комбинации.

73. Фермент ДНКаза, содержащий аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO:15.

74. Выделенный полинуклеотид, кодирующий фермент ДНКазу по любому из пп. 41-73.

75. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.74.

76. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.75.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая фермент по любому из пп. 41-73 выделенный полинуклеотид по п.74 или вектор по п.75 и фармацевтически приемлемый

носитель.

78. Фармацевтическая композиция по п.77, содержащая фермент ДНКазу, составленную для парентерального введения или введения ингаляционным способом.

79. Фармацевтическая композиция по п.77, составленная для внутрикожного, внутримышечного, внутрибрюшинного, внутрисуставного, внутривенного, подкожного, внутриартериального, перорального, сублингвального, ингаляционного, топического или чрескожного введения.

80. Фармацевтическая композиция по п.77, в которой фермент продуцируют в клетках яичника китайского хомяка.

81. Фармацевтическая композиция по п.77, в которой фермент является негликозилированным и продуцируется в системе экспрессии отличных от млекопитающих животных.

82. Фармацевтическая композиция по п.81, в которой система экспрессии отличных от млекопитающих животных представляет собой *Pichia pastoris*.

83. Фармацевтическая композиция по п.82, в которой *Pichia pastoris* кодирует фермент вместе с сигнальным пептидом согласно SEQ ID NO:1.

84. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 77-83, которая дополнительно содержит белок ДНКазы1-подобного фермента 3 (D1L3) или его вариант.

85. Способ лечения субъекта, нуждающегося в разрушении внеклеточной ДНК, разрушении внеклеточного хроматина, разрушении внеклеточной ловушки (ВЛ) и/или разрушении нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ), включающий введение терапевтически эффективного количества варианта D1L3 по любому из пп. 1-16 или фермента ДНКазы по любому из пп. 17-20, или композиции по любому из пп. 24-32, или варианта D1 по любому из пп. 33-40, или фермента ДНКазы по любому из пп. 41-73, или композиции по любому из пп. 77-84.

86. Способ по п.85, в котором при лечении субъект проявляет разрушение внеклеточной ДНК, разрушение внеклеточного хроматина, разрушение внеклеточной ловушки (ВЛ) и/или разрушение нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ).

87. Способ по п.85 или 86, в котором субъект имеет хроническое или острое воспалительное заболевание.

88. Способ по п.85 или 86, в котором субъект имеет острую или хроническую инфекцию.

89. Способ по любому из пп. 85-88, в котором субъект имеет или подвержен риску окклюзии сосудов, содержащих НВЛ.

90. Способ по п.85, в котором субъект имеет хроническую нейтрофилию (например, рост количества нейтрофилов), агрегацию нейтрофилов и лейкостаз, тромбоз и окклюзию сосудов (например, серповидно-клеточную болезнь), ишемически-реперфузионое повреждение (например, заворот средней кишки, перекрут семенного канатика, ишемию-реперфузию конечностей, ишемию-реперфузию жизненно-важных органов, трансплантацию органов), хирургическое и травматическое повреждение тканей, острую

или хроническую воспалительную реакцию или болезнь, аутоимунное заболевание (например, системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, ревматиодный артрит, васкулит, системный склероз), кардиоваскулярную болезнь (например, инфаркт миокарда, инсульт, атеросклероз, венозный тромбоэмболизм, в том числе тромболитическую терапию), метаболическое заболевание (например, диабет), системное воспаление (например, синдром системной воспалительной реакции (SIRS), сепсис, септический шок, рассеянную внутрисосудистую коагуляцию (DIC) и тромботическую микроангиопатию (TMA)), воспалительные заболевания дыхательных путей (например, муковисцидоз, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), острое повреждение легких (ALI), вызванное курением повреждение легких, синдром острого посттрансфузионного повреждения легких (TRALI), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) и астму, ателектаз, бронхит, эмпиему), воспалительные заболевания почек (острые и хронические заболевания почек, в том числе острую почечную недостаточность (AKI) и хроническую болезнь почек (CKD), воспалительные заболевания, связанные с трансплантированной тканью (например, реакцией трансплантат против хозяина) и рак (например, лейкемию, метастазирование опухоли и солидные опухоли).

91. Способ по любому из пп. 85-90, в котором белок или композицию вводят внутривенно, внутриартериально, внутрисуставно, внутримышечно, подкожно, местно или путем ингаляционного введения.

92. Способ по п.85, в котором субъект имеет или подвержен риску окклюзии протоков в системе протоков.

93. Способ по п.92, в котором система протоков представляет собой желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, выводной проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень.

94. Способ по п.93, в котором субъект имеет панкреатит, холангит, конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек.

95. Способ по любому из пп. 90-94, в котором фермент ДНКазу вводят путем внутривенного, внутриартериального или внутрибрюшинного введения.

96. Способ по п.95, в котором субъект имеет первичный склерозирующий холангит.

97. Способ по п.85, в котором субъект имеет или подвержен риску аккумуляции НВЛ на эндотелиальных поверхностях (например, спайки, вызванные хирургическим вмешательством), коже (например, раны/рубцы, язвы) или в синовиальных соединениях (например, подагра, артрит).

98. Способ по п.97, в котором субъект имеет, имел или в данный момент проходит инвазивную медицинскую процедуру и подвержен риску спаек, вызванных хирургическим вмешательством.

99. Способ по п.98, в котором терапию с ДНКазой используют во время хирургического вмешательства для предотвращения или ингибирования образования спаек, вызванных хирургическим вмешательством.

100. Способ по п.97, в котором терапию с ДНКазой используют местно на коже для предотвращения или лечения ран и/или рубцов.

101. Способ по п.97, в котором терапию с ДНКазой вводят в синовиальные соединения для предотвращения или лечения подагры и артрита.

102. Способ по п.85, в котором субъект имеет тромбоз, инсульт, сепсис, повреждение легких, атеросклероз, вирусную инфекцию, серповидно-клеточную болезнь, инфаркт миокарда, воспаление среднего уха, заживление ран, поражение печени, эндокардит, инфекцию печени, панкреатит, первичную дисфункцию трансплантата, ишемию/реперфузию конечностей, поражение почек, коагуляцию крови, индуцированное квасцами воспаление, гепаторенальное повреждение, плевральные экссудации, гемоторакс, внутрипеченочные тромбы, постпневматическую анемию, язвы, отоларингологические состояния, инфекции ротовой полости, незначительные повреждения, синусит, послеоперационные ринопластики, бесплодие, мочевой катетер, обработку раны, тест кожной реакции, пневмококковый менингит, подагру, ножные язвы, муковисцидоз, синдром Картагенера, астму, лобарный ателектаз, хронический бронхит, бронхоэктаз, волчанку, первичную цилиарную дискинезию, бронхиолит, эмпиему, плевральные инфекции, рак, синдром сухого глаза, инфекции нижних дыхательных путей, хронические гематомы, болезнь Альцгеймера и обструктивное заболевание легких.

103. Способ по любому из пп. 85-102, в котором субъект дополнительно проявляет ишемическую болезнь сердца.

104. Способ по п.102, в котором субъект имеет муковисцидоз.

105. Способ по любому из пп. 85-104, включающий контроль НВЛ-разрушающей активности в крови, плазме или сыворотке, полученной от субъекта.

106. Способ лечения субъекта, который проявляет или имеет риск внутрисосудистых окклюзий с участием НВЛ, включающий введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта.

107. Способ по п.106, в котором субъекту вводят фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2.

108. Способ по п.107, в котором фермент содержит аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2.

109. Способ лечения субъекта, который имеет или подвержен риску окклюзии протоков в системе протоков, включающий введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта.

110. Способ по п.109, в котором субъекту вводят фермент, содержащий

аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2, и/или фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:1.

111. Способ по п.110, в котором фермент содержит аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2, и/или содержит аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:1.

112. Способ по любому из пп. 109-111, в котором система протоков представляет собой желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, выводной проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень.

113. Способ по любому из пп. 109-112, в котором субъект имеет панкреатит, холангит, конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек.

114. Способ по любому из пп. 109-113, в котором фермент ДНКазу вводят путем внутривенного, внутриартериального или внутрибрюшинного введения.

115. Способ по п.114, в котором субъект имеет первичный склерозирующий холангит.

116. Способ лечения субъекта, нуждающегося в разрушении внеклеточной ДНК, разрушении внеклеточного хроматина, разрушении внеклеточной ловушки (ВЛ) и/или разрушения нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ), включающий введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта и D1 или его варианта.

117. Способ по п.116, в котором D1L3 или его вариант и D1 или его вариант вводят в одной фармацевтической композиции или различных фармацевтических композициях, и при этом соотношение D1L3 или его варианта к D1 или его варианту лежит необязательно в диапазоне от 100:1 до 1:100 по массе, от 10:1 до 1:10 по массе и необязательно приблизительно 1:1.

118. Способ по п.117, в котором при лечении субъект проявляет разрушение внеклеточной ДНК, разрушение внеклеточного хроматина, разрушение внеклеточной ловушки (ВЛ) и/или разрушение нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ).

119. Способ по любому из пп. 116-118, в котором субъект имеет хроническое или острое воспалительное заболевание.

120. Способ по любому из пп. 116-118, в котором субъект имеет острую или хроническую инфекцию.

121. Способ по любому из пп. 116-120, в котором субъект имеет или подвержен риску окклюзии сосудов, содержащих НВЛ.

122. Способ по п.116 или 117, в котором субъект имеет хроническую нейтрофилию (например, рост количества нейтрофилов), агрегацию нейтрофилов и лейкостаз, тромбоз и

окклюзию сосудов (например, серповидно-клеточную болезнь), ишемически-реперфузионое повреждение (например, заворот средней кишки, перекрут семенного канатика, ишемию-реперфузию конечностей, ишемию-реперфузию жизненно-важных органов, трансплантацию органов), хирургическое и травматическое повреждение тканей, острую или хроническую воспалительную реакцию или болезнь, аутоимунное заболевание (например, системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, ревматиодный артрит, васкулит, системный склероз), кардиоваскулярную болезнь (например, инфаркт миокарда, инсульт, атеросклероз, венозный тромбоэмболизм, в том числе тромболитическую терапию), метаболическое заболевание (например, диабет), системное воспаление (например, синдром системной воспалительной реакции (SIRS), сепсис, септический шок, рассеянную внутрисосудистую коагуляцию (DIC) и тромботическую микроангиопатию (TMA)), воспалительные заболевания дыхательных путей (например, муковисцидоз, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), острое повреждение легких (ALI), вызванное курением повреждение легких, синдром острого посттрансфузионного повреждения легких (TRALI), острый респираторный дистресс-синдромом (ARDS) и астму, ателектаз, бронхит, эмпиему), воспалительные заболевания почек (острые и хронические заболевания почек, в том числе острую почечную недостаточность (AKI) и хроническую болезнь почек (CKD), воспалительные заболевания, связанные с трансплантированной тканью (например, реакцией трансплантат против хозяина) и рак (например, лейкемия, метастазирование опухоли и солидные опухоли).

123. Способ по любому из пп. 116-122, в котором каждый из D1L3 или его варианта и D1 или его варианта вводят путем, независимо выбранным из внутривенного, внутриартериального, внутрисуставного, внутримышечного, подкожного, топического и ингаляционного введения.

124. Способ по п.123, в котором субъект имеет или подвержен риску окклюзии протоков в системе протоков.

125. Способ по п.124, в котором система протоков представляет собой желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, выводной проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень.

126. Способ по п.125, в котором субъект имеет панкреатит, холангит, конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек.

127. Способ по любому из пп. 124-126, в котором ферменты ДНКазы вводят в виде одной композиции, вводимой путем внутривенного, внутриартериального или внутрибрюшинного введения.

128. Способ по п.127, в котором субъект имеет первичный склерозирующий холангит.

129. Способ по любому из пп. 116-118, в котором субъект имеет или подвержен риску накапливания НВЛ на эндотелиальных поверхностях, коже или в синовиальных соединениях.

130. Способ по п.129, в котором субъект прошел или в данный момент проходит инвазивную медицинскую процедуру и подвержен риску спаек, вызванных хирургическим вмешательством.

131. Способ по п.130, в котором терапию с ДНКазой используют во время хирургического вмешательства для предотвращения или ингибирования образования спаек, вызванных хирургическим вмешательством.

132. Способ по п.129, в котором терапию с ДНКазой используют местно на коже для предотвращения или лечения ран и/или рубцов.

133. Способ по п.129, в котором терапию с ДНКазой используют в синовиальных соединениях для предотвращения или лечения подагры и артрита.

134. Способ по пп. 116-118, в котором субъект имеет тромбоз, инсульт, сепсис, повреждение легких, атеросклероз, вирусную инфекцию, серповидно-клеточную болезнь, инфаркт миокарда, воспаление среднего уха, заживление ран, поражение печени, эндокардит, инфекцию печени, панкреатит, первичную дисфункцию трансплантата, ишемию/реперфузию конечностей, поражение почек, коагуляцию крови, индуцированное квасцами воспаление, гепаторенальное повреждение, плевральные экссудации, гемоторакс, внутрипеченочные тромбы, постпневматическую анемию, язвы, отоларингологические состояния, инфекции ротовой полости, незначительные повреждения, синусит, послеоперационные ринопластики, бесплодие, мочевой катетер, обработку раны, тест кожной реакции, пневмококковый менингит, подагру, ножные язвы, муковисцидоз, синдром Картагенера, астму, лобарный ателектаз, хронический бронхит, бронхоэктаз, волчанку, первичную цилиарную дискинезию, бронхиолит, эмпиему, плевральные инфекции, рак, синдром сухого глаза, инфекции нижних дыхательных путей, хронические гематомы, болезнь Альцгеймера и обструктивное заболевание легких.

135. Способ по любому из пп. 116-134, в котором субъект дополнительно проявляет ишемическую болезнь сердца.

136. Способ по п.134, в котором субъект имеет муковисцидоз.

137. Способ по любому из пп. 116-136, включающий контроль НВЛ-разрушающей активности в крови, плазме или сыворотке, полученной от субъекта.

138. Способ лечения субъекта, который проявляет или имеет риск внутрисосудистых окклюзий с участием НВЛ, включающий введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта.

139. Способ по п.138, в котором субъекту вводят фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2.

140. Способ по п.139, в котором фермент содержит аминокислотную

последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2.

141. Способ лечения субъекта, который имеет или подвержен риску окклюзии протоков в системе протоков, включающий введение терапевтически эффективного количества D1L3 или его варианта, и/или терапевтически эффективного количества D1 или его варианта.

142. Способ по п.141, в котором субъекту вводят фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:2, и/или фермент, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности с ферментом, который определен SEQ ID NO:1.

143. Способ по п.142, в котором ферменты содержат аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:2, и/или аминокислотную последовательность фермента, определенную SEQ ID NO:1.

144. Способ по любому из пп. 141-143, в котором система протоков представляет собой желчный проток, слезный проток, молочный проток, пузырный проток, печеночный проток, семявыбрасывающий проток, выводной проток околоушной слюнной железы, поднижнечелюстной проток, большой подъязычный проток, бартолинов проток, водопровод среднего мозга, поджелудочную железу, молочную железу, семявыносящий проток, мочеточник, мочевой пузырь, желчный пузырь и печень.

145. Способ по любому из пп. 141-143, в котором субъект имеет панкреатит, холангит, конъюнктивит, мастит, синдром сухого глаза, нарушение проходимости семявыносящего протока или болезнь почек.

146. Способ по любому из пп. 141-145, в котором фермент ДНКазу вводят путем внутривенного, внутриартериального или внутрибрюшинного введения.

147. Способ по п.146, в котором субъект имеет первичный склерозирующий холангит.

148. Способ получения фармацевтической композиции для снижения аккумуляции нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ), включающий: получение генетически модифицированной мыши, дефицитной по активности ДНКазы1 и ДНКаза1-подобного фермента-3 и экспрессирующей гетерологичный полинуклеотид GCSF, или которую периодически стимулируют микробными соединениями, причем указанная генетически модифицированная мышь накапливает НВЛ; введение потенциального ингибитора НВЛ или потенциального фермента ДНКазы; выбор ингибитора НВЛ или фермента ДНКазы, которые снижают накопление НВЛ; и составление препарата с ингибитором НВЛ или ферментом ДНКазой для введения пациенту-человеку.

149. Способ по п.148, в котором композицию составляют для парентерального введения или введения ингаляционным способом

150. Способ по п.148, с препаратом, составленным для внутривенного, внутриартериального, внутрисуставного, внутримышечного, подкожного, топического или ингаляционного введения.

151. Способ по п.148, в котором генетически модифицированная мышь экспрессирует гетерологичный полинуклеотид G-CSF в гепатоцитах.

152. Способ рекомбинантного продуцирования фермента ДНКазы, выбранного из D1 человека, D1L3 человека или их варианта, включающий: культивирование клетки-хозяина *Pichia pastoris*, кодирующего фермент ДНКазу с нативным сигнальным пептидом; и выделение ДНКазы из культуральной среды.

153. Способ по п.152, в котором фермент ДНКаза представляет собой D1L3 человека или его вариант, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с ферментом согласно SEQ ID NO:2.

154. Способ по п.153, в котором фермент ДНКаза представляет собой D1L3 человека.

155. Способ конструирования фермента ДНКазы, включающий:

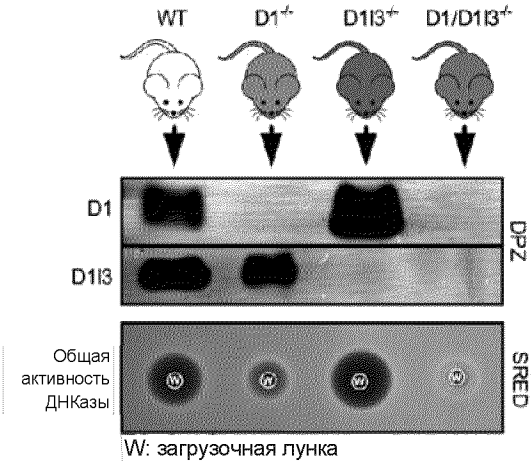
обеспечение выравнивания белок-белок донорных и реципиентных ферментов ДНКазы; определение вариабельных аминокислотных последовательностей для переноса, причем вариабельные аминокислоты являются фланкированными одной или более консервативными аминокислотами в донорных и реципиентных ферментах ДНКазы; замену вариабельных аминокислот реципиентной ДНКазы вариабельными аминокислотами донорной ДНКазы для создания химерной ДНКазы; рекомбинантное продуцирование химерной ДНКазы.

156. Способ по п.155, в котором ферменты ДНКазы выбирают из D1 человека, ДНКаза1-подобного фермента 1 человека (D1L1), который определен SEQ ID NO: 38, ДНКаза1-подобного фермента 2 человека (D1L2), который определен SEQ ID NO: 39, и D1L3 человека.

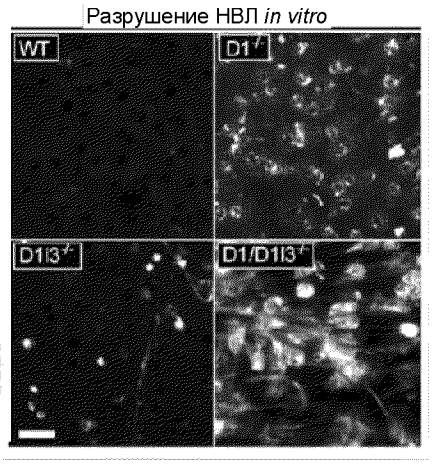
157. Способ по п.155 или 156, в котором замена структурных блоков имеет по меньшей мере две аминокислоты, или по меньшей мере три аминокислоты, или по меньшей мере четыре аминокислоты, или по меньшей мере пять аминокислот.

По доверенности

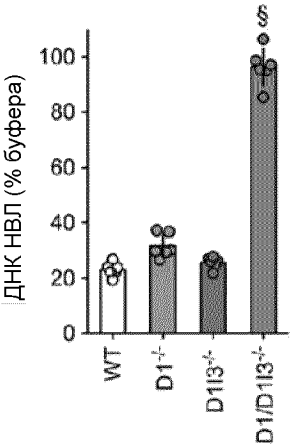
Фиг. 1A

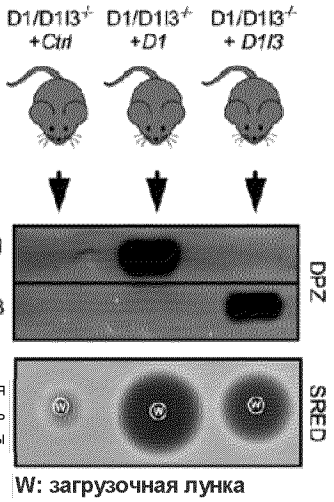


Фиг. 1B

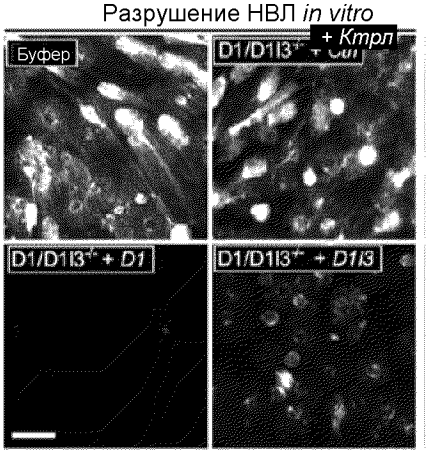


Фиг. 1C

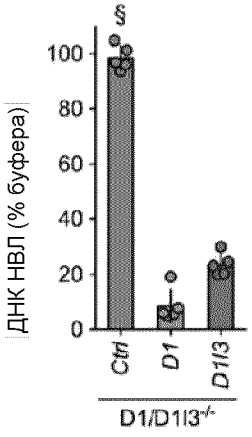




Фиг. 1D

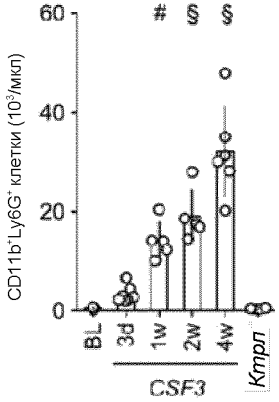


Фиг. 1E

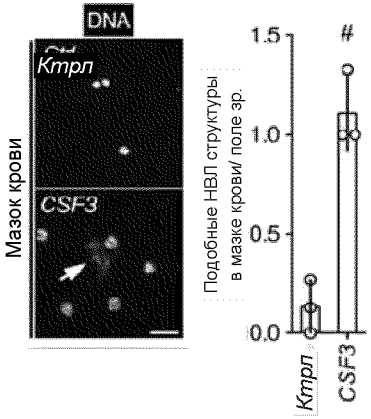


Фиг. 1F

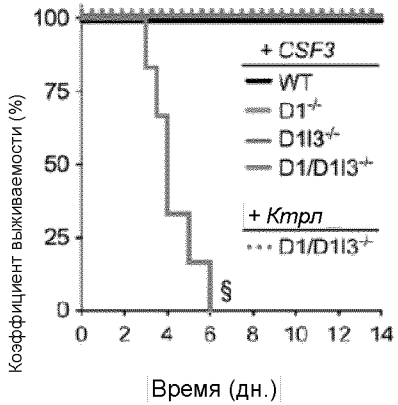
Фиг. 2A



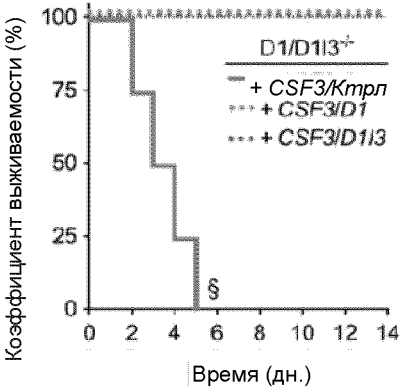
Фиг. 2B

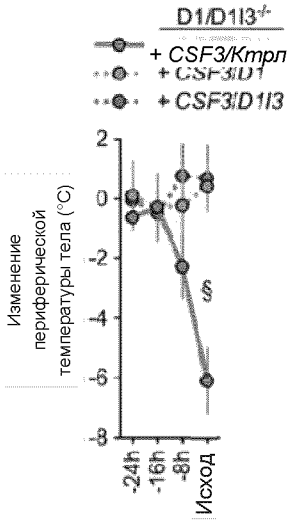


Фиг. 2C

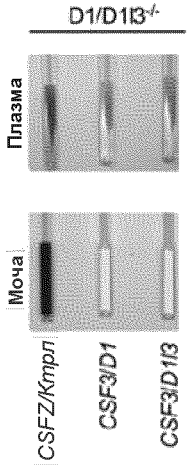


Фиг. 2D

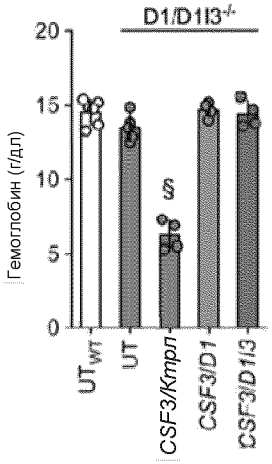




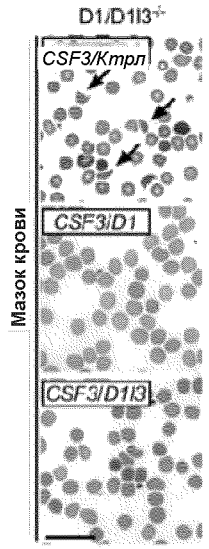
Фиг. 2E



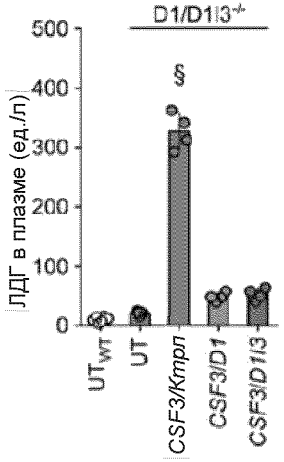
Фиг. 2F



Фиг. 2G

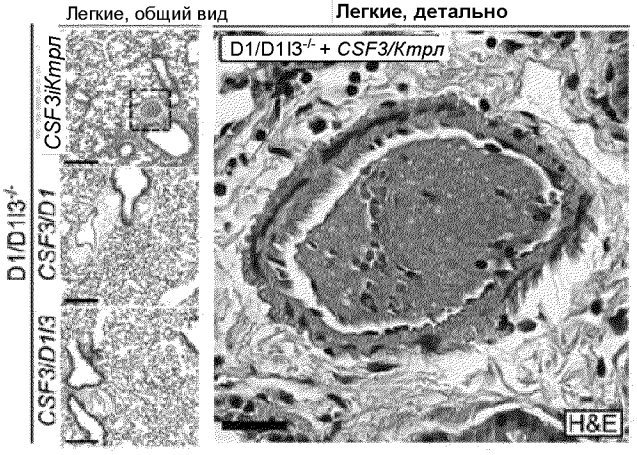


Фиг. 2H

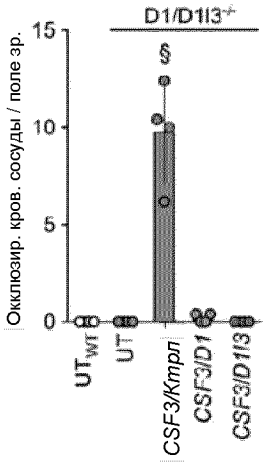


Фиг. 2I

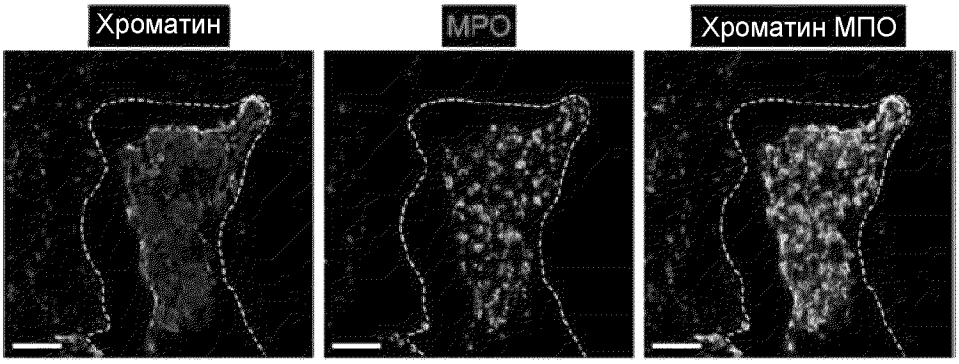
Фиг. 3A



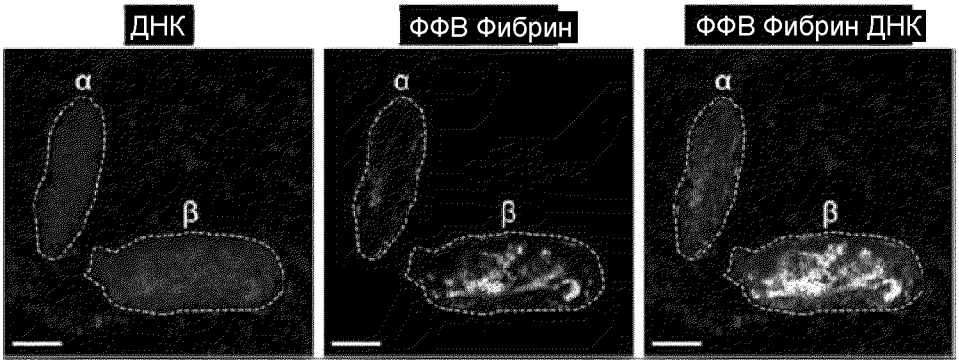
Фиг. 3B



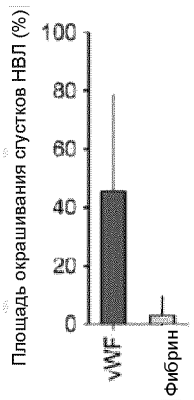
Фиг. 3C



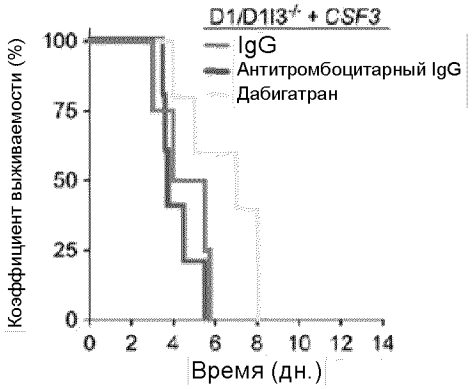
Фиг. 3D



Фиг. 3E

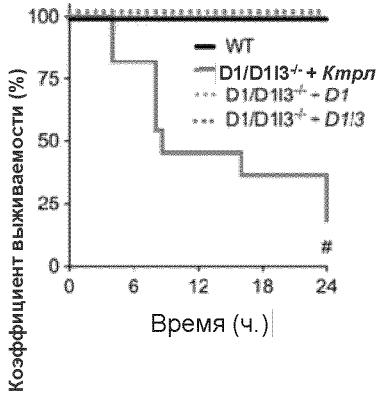


Фиг. 3F

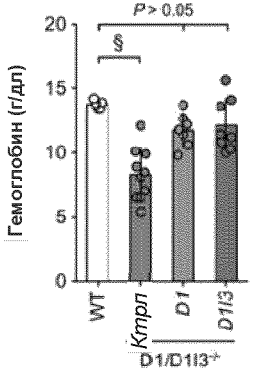


Фиг. 3G

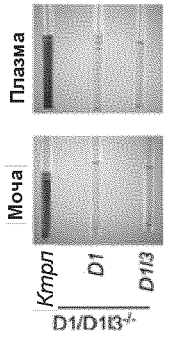
Фиг. 4A



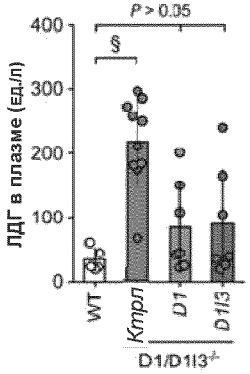
Фиг. 4B



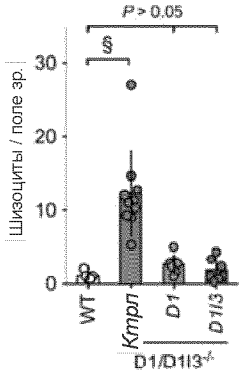
Фиг. 4C



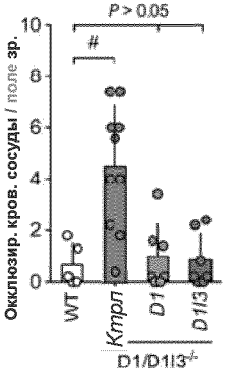
Фиг. 4D



Фиг. 4E



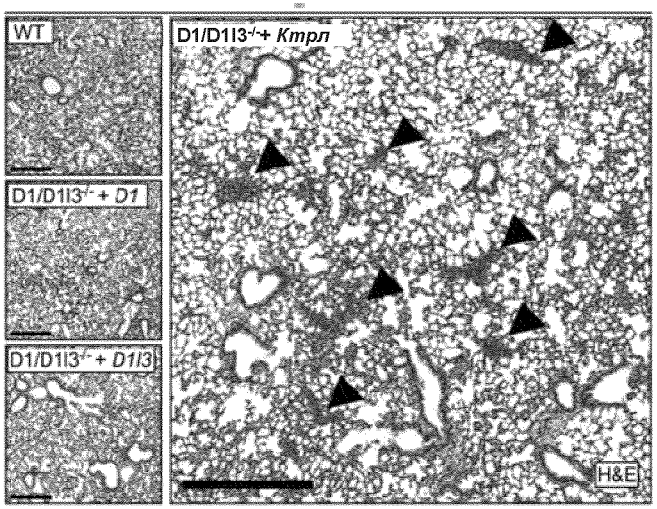
Фиг. 4F



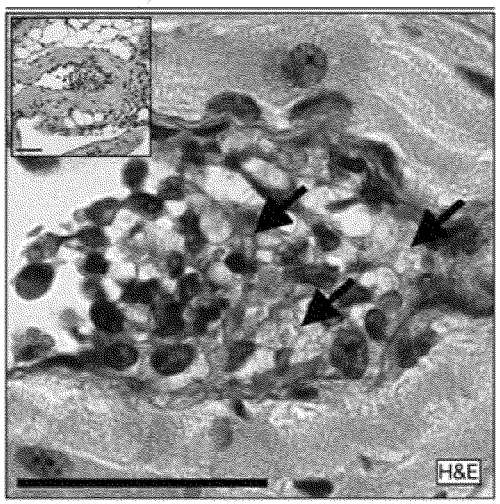
Легкие, общий вид

Частично окклюзированный кровеносный сосуд, детально

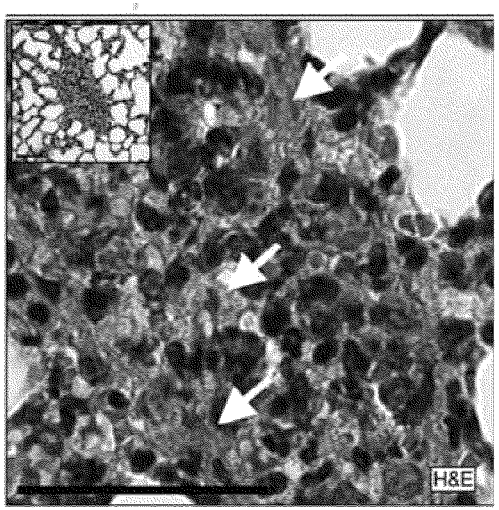
Полностью окклюзированный кровеносный сосуд, детально



Фиг. 4G

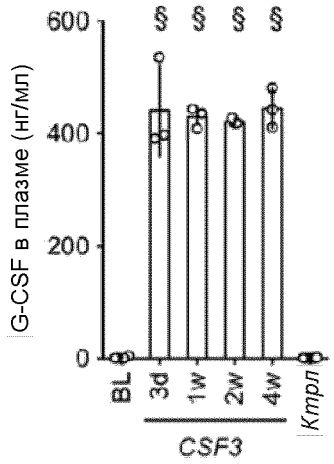


Фиг. 4H

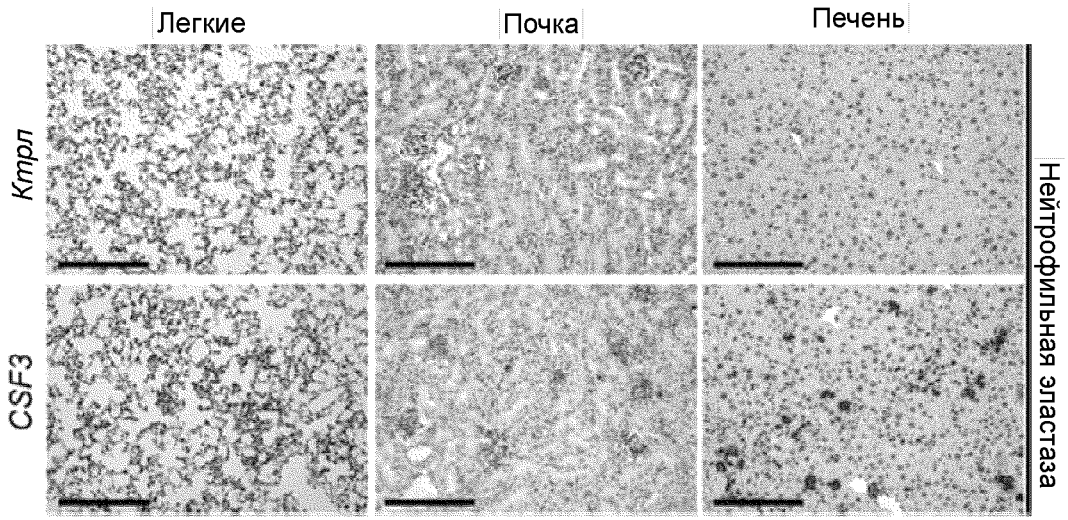


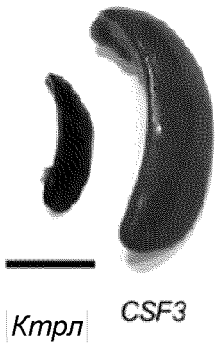
Фиг. 4I

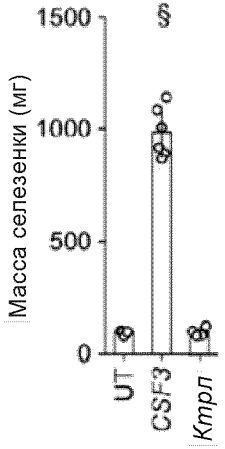
Фиг. 5A



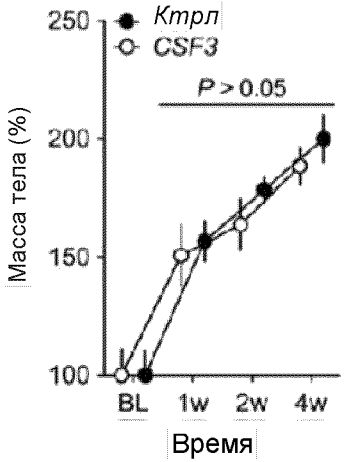
Фиг. 5B







Фиг. 5C

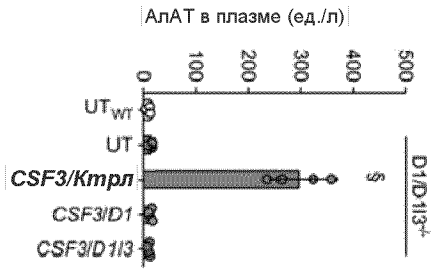


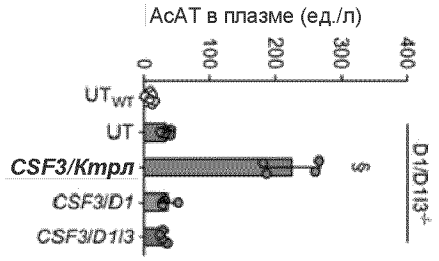
Фиг. 5D

Параметр (единицы измерения)	Ктрл	CSF3	P-величина
N	3	4	-
Нейтрофилы (тыс./мкл)	0.5 ± 0.1	19.2±5.2	< 0.001
АлАТ (ед./л)	50 ± 22	37 ± 13	> 0.05
АсАТ (ед./л)	60 ± 25	58 ± 8	> 0.05
АМК (мг/мл)	21 ± 2	21 ± 2	> 0.05
Креатинин (мг/мл)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	> 0.05

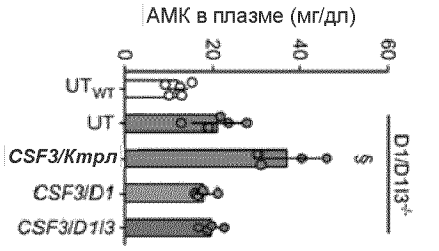
Фиг. 5E

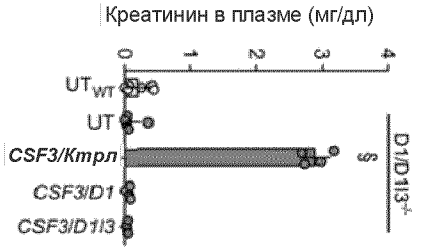
Фиг. 6A



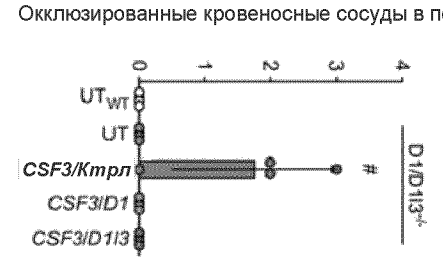


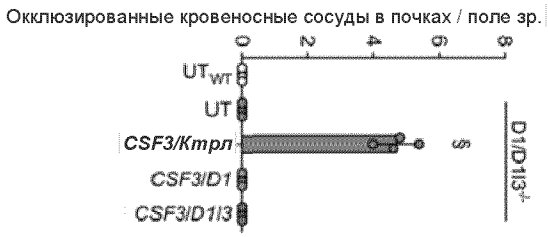
Фиг. 6B



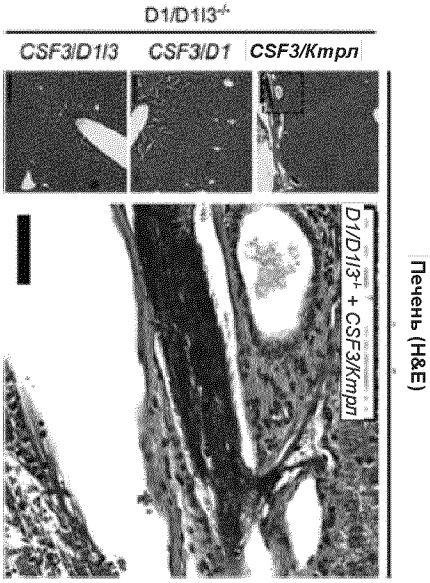


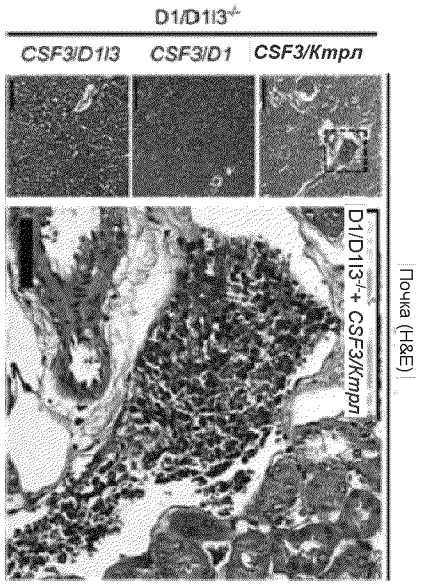
Фиг. 6C



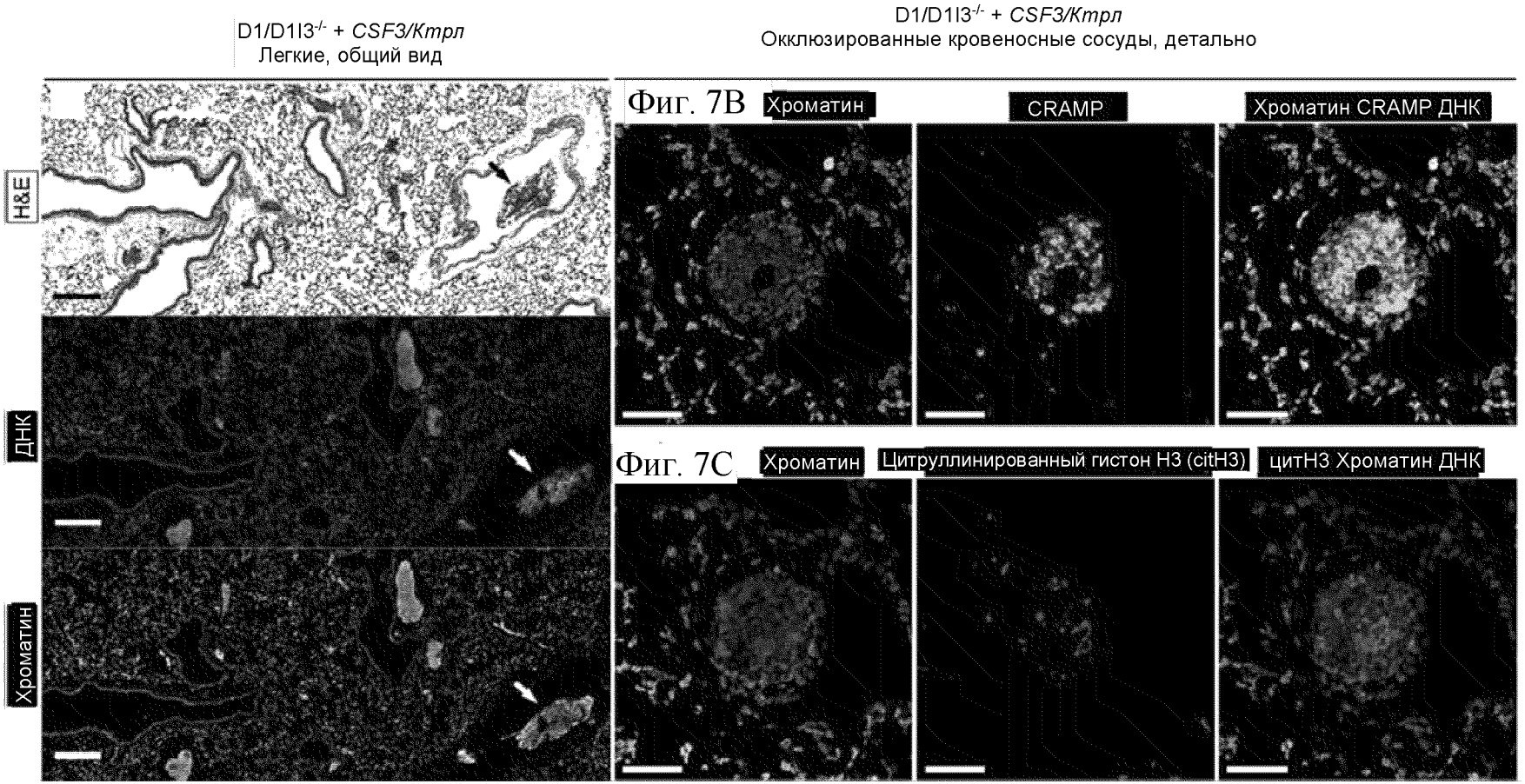


Фиг. 6D

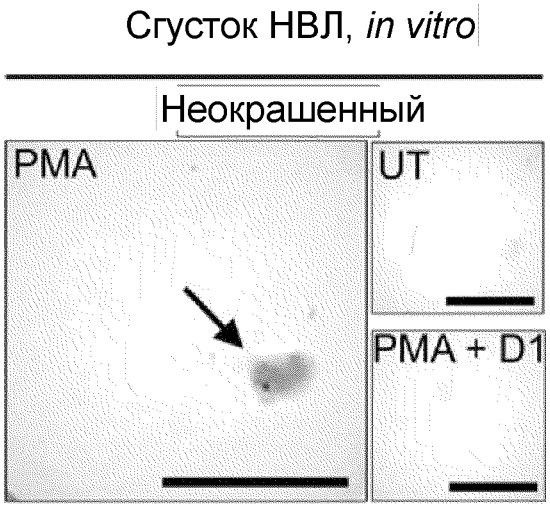




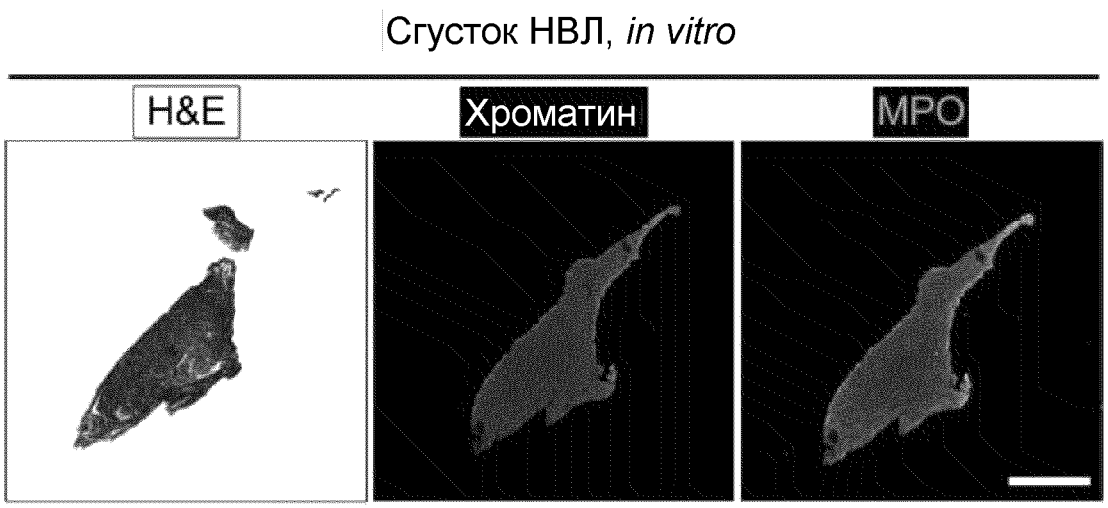
Фиг. 7A


D1/D1I3-/- + CSF3/Ктрл
Легкие, общий вид
D1/D1I3-/- + CSF3/Ктрл
Окклюзированные кровеносные сосуды, детально
H&E
ДНК
Хроматин
Фиг. 7B
Хроматин
CRAMP
Хроматин CRAMP ДНК
Фиг. 7C
Хроматин
Цитруллинированный гистон H3 (citH3)
цитH3 Хроматин ДНК

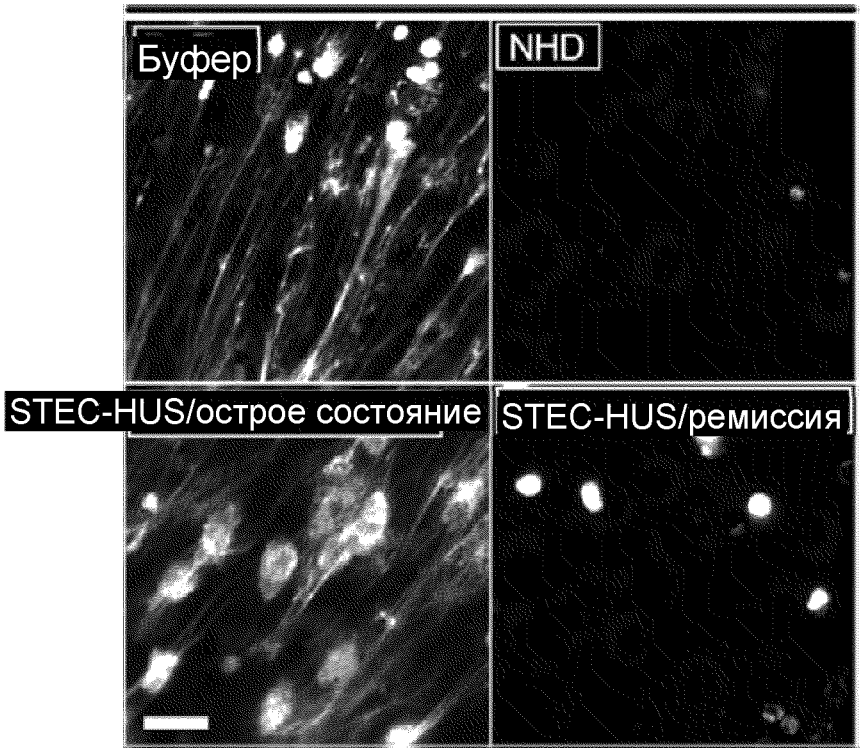
Фиг. 8A


Сгусток НВЛ, *in vitro*
Неокрашенный
PMA
UT
PMA + D1

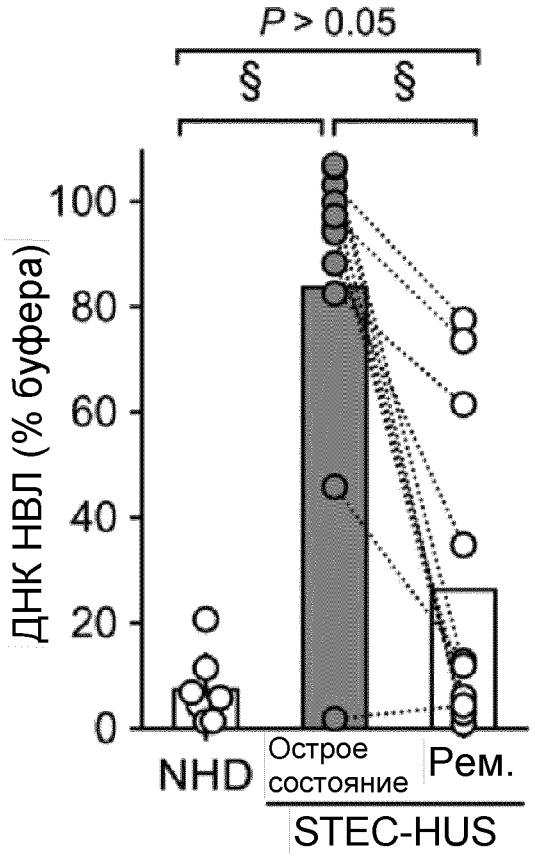
Фиг. 8B


Сгусток НВЛ, *in vitro*
H&E
Хроматин
MPO

Фиг. 9A


Разрушение НВЛ *in vitro*
Буфер
NHD
STEC-HUS/острое состояние
STEC-HUS/ремиссия

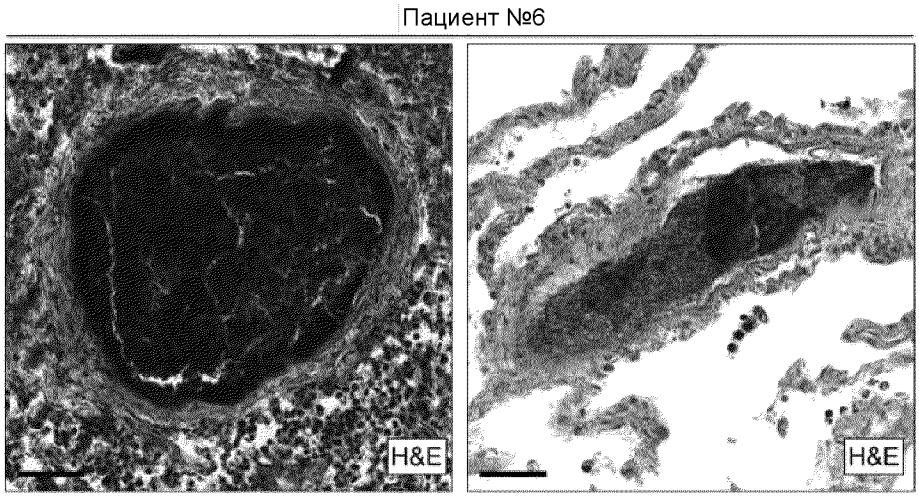
Фиг. 9B


P > 0.05
§
§
ДНК НВЛ (% буфера)
100
80
60
40
20
0
NHD
Острое состояние
Рем.
STEC-HUS

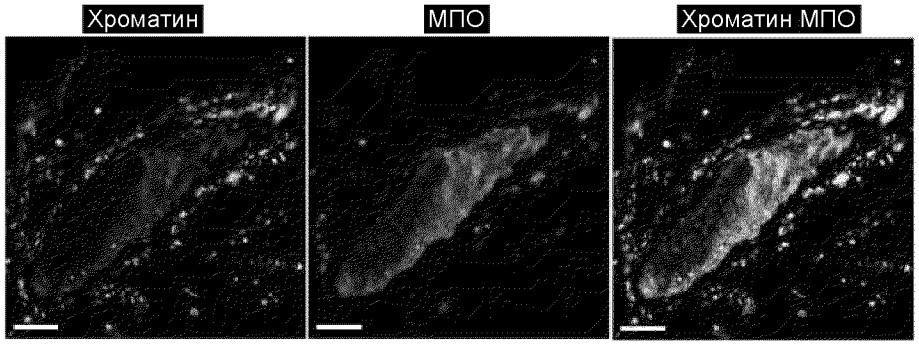
ФИГ. 10

№	Причина смерти	Пол	Возраст	Ткань	Богатые гематоксилином сгустки	Хроматин- и МПО-положительные	Локализация
1	ARDS	M	84	Легкие	Да	Да	Бронхи
2	Септическая сердечно-сосудистая	F	63	Легкие	Отсутствует	Не применимо	Не применимо
3	ARDS	F	67	Легкие	Отсутствует	Не применимо	Не применимо
4	Септическая полиорганная	M	72	Легкие	Да	Да	Бронхи
5	Септическая сердечно-сосудистая	F	75	Легкие	Отсутствует	Не применимо	Не применимо
6	Септическая полиорганная	M	60	Легкие	Да	Да	Кровеносный сосуд
7	Септическая сердечно-сосудистая	F	76	Легкие	Да	Да	Кровеносный сосуд
8	ARDS	F	68	Легкие	Отсутствует	Не применимо	Не применимо

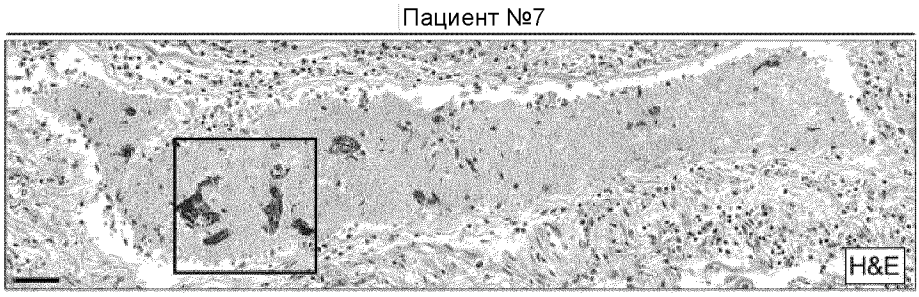
Фиг. 11A



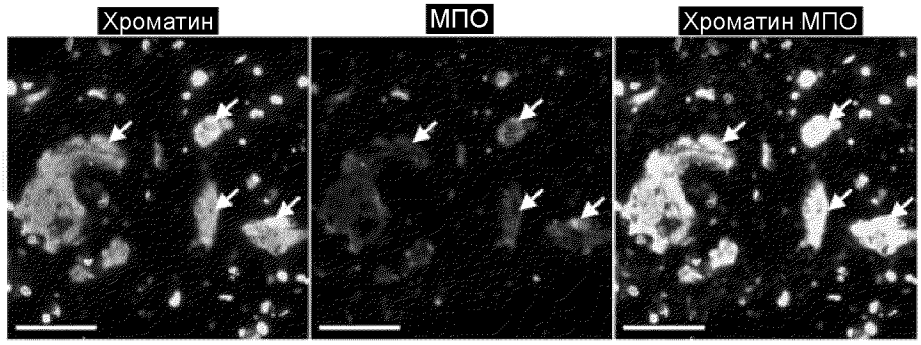
Фиг. 11B



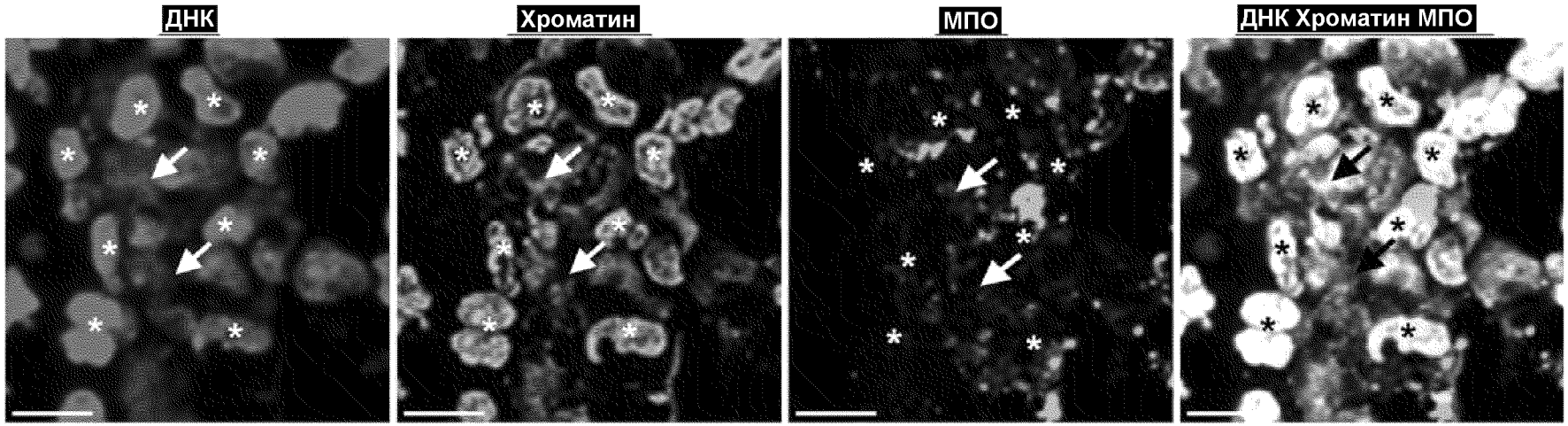
Фиг. 11C



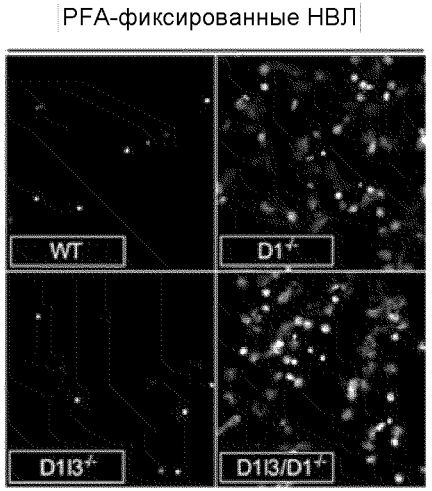
Фиг. 11D



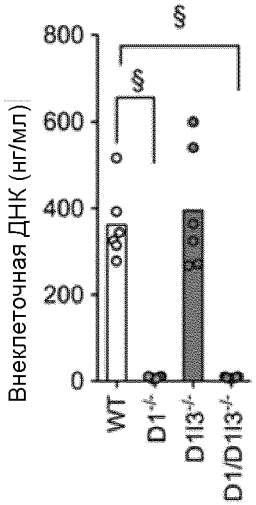
ФИГ. 12



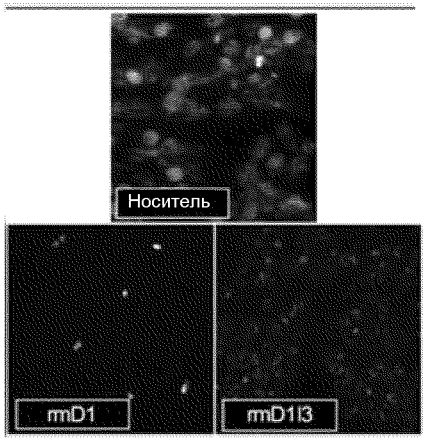
Фиг. 13A



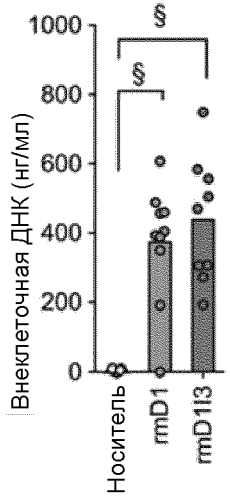
Фиг. 13B



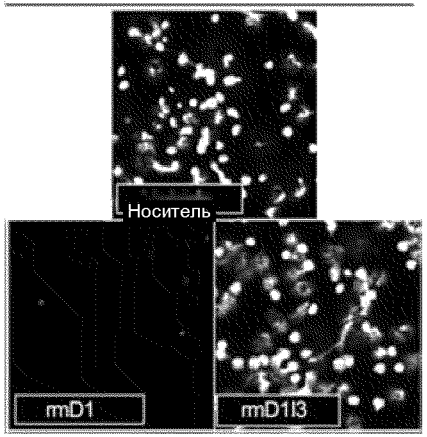
Фиг. 13C



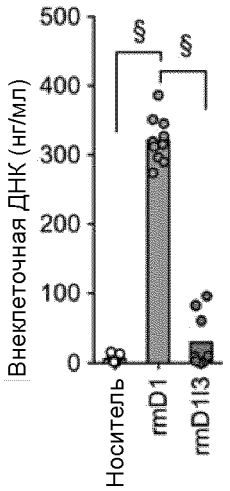
Фиг. 13D



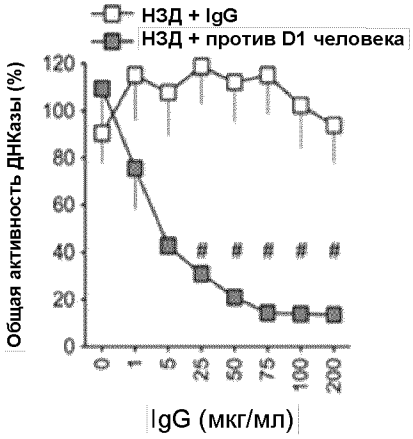
Фиг. 13E



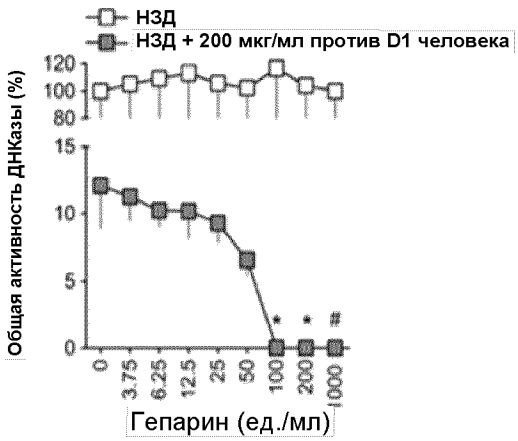
Фиг. 13F



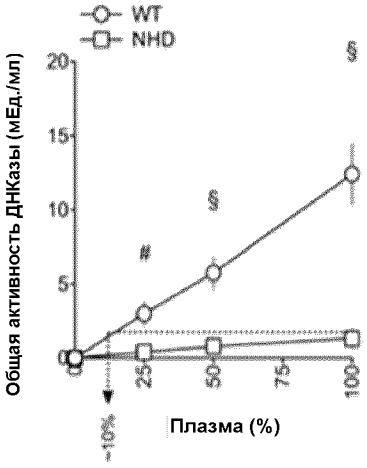
Фиг. 14A



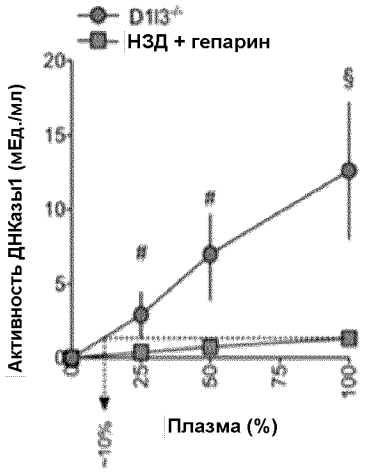
Фиг. 14B



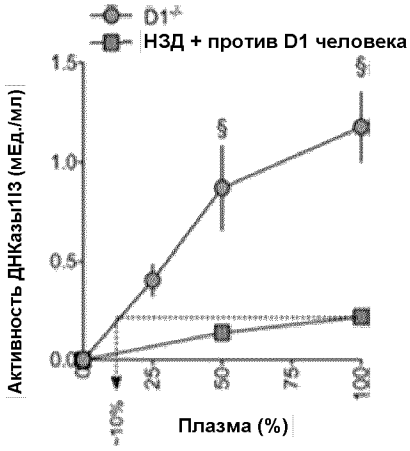
Фиг. 14C

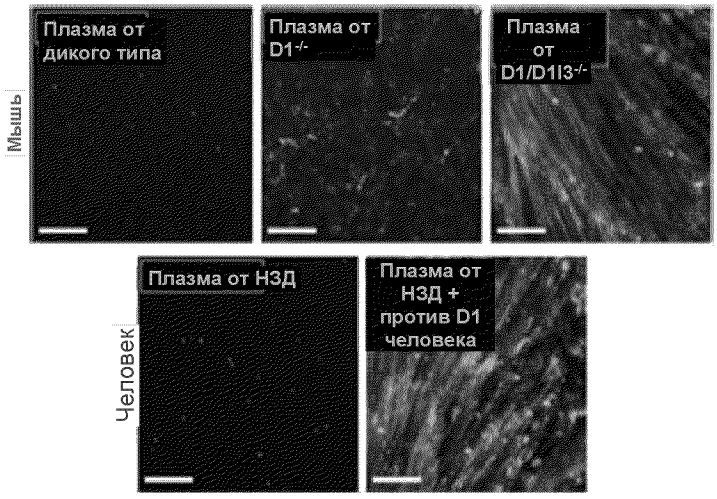


Фиг. 14D

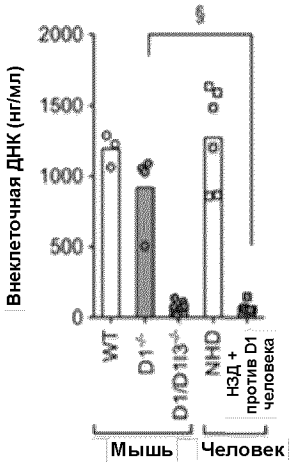


Фиг. 14E



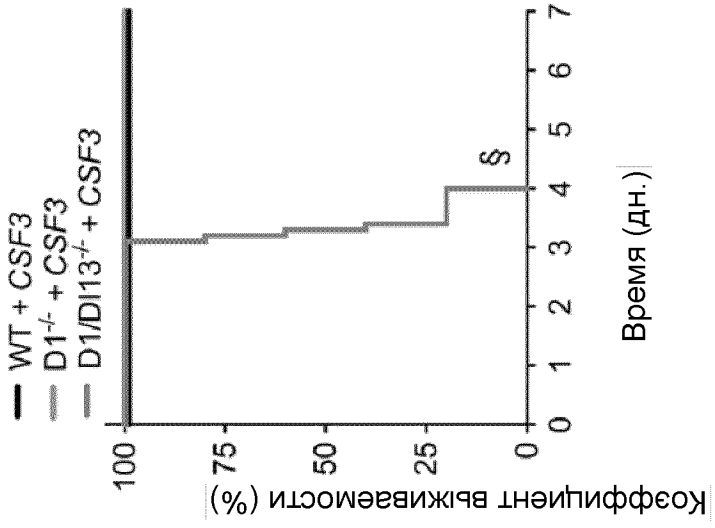


Фиг. 14F

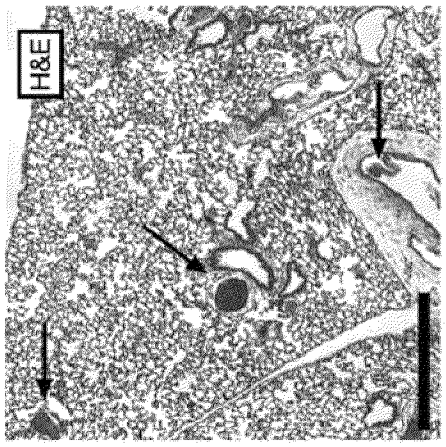


Фиг. 14G

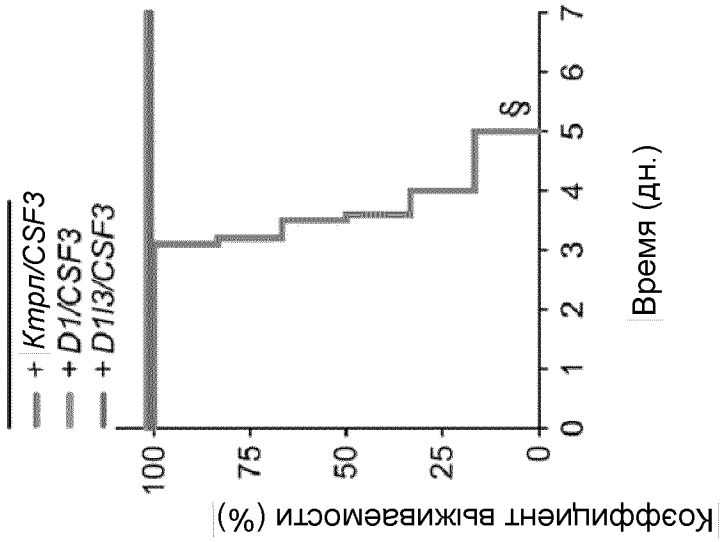
Фиг. 15A



Фиг. 15B



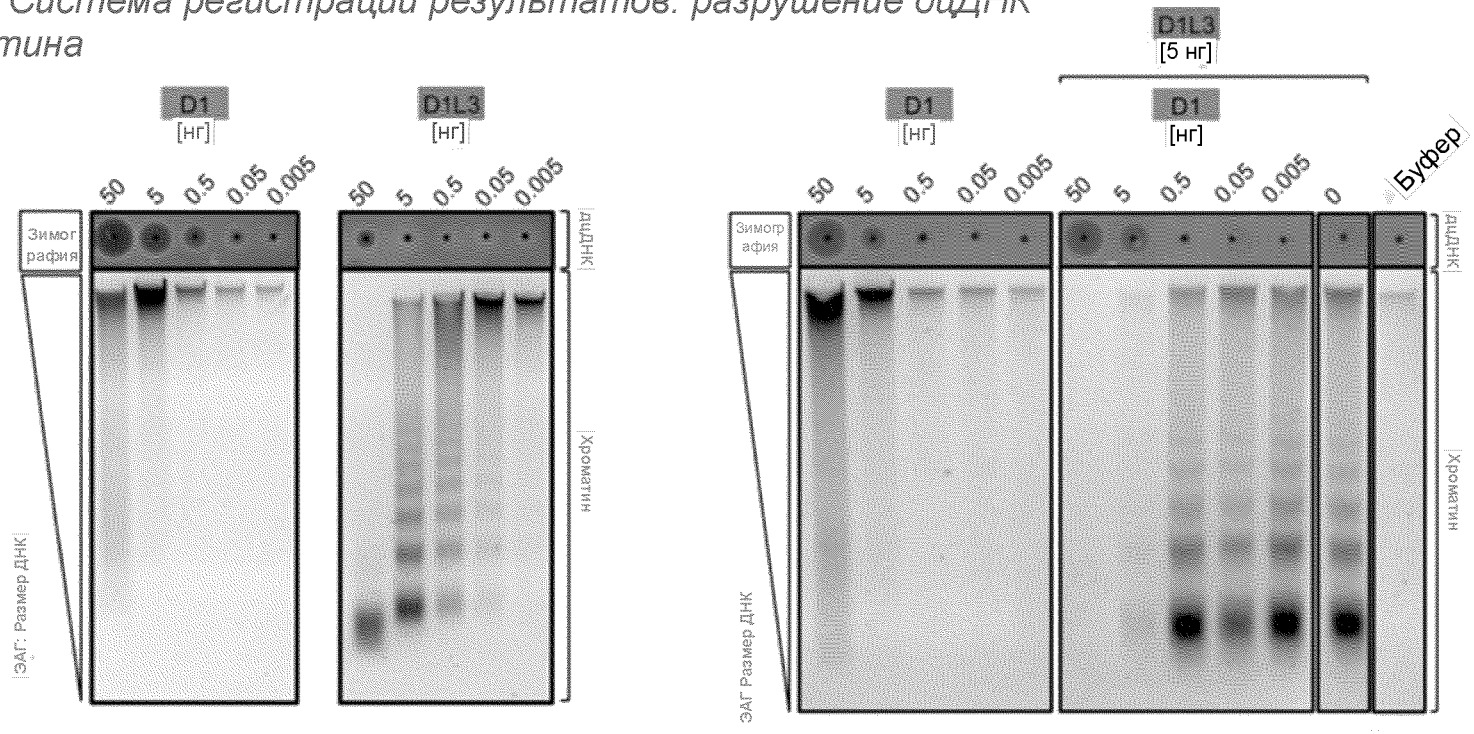
Фиг. 15C



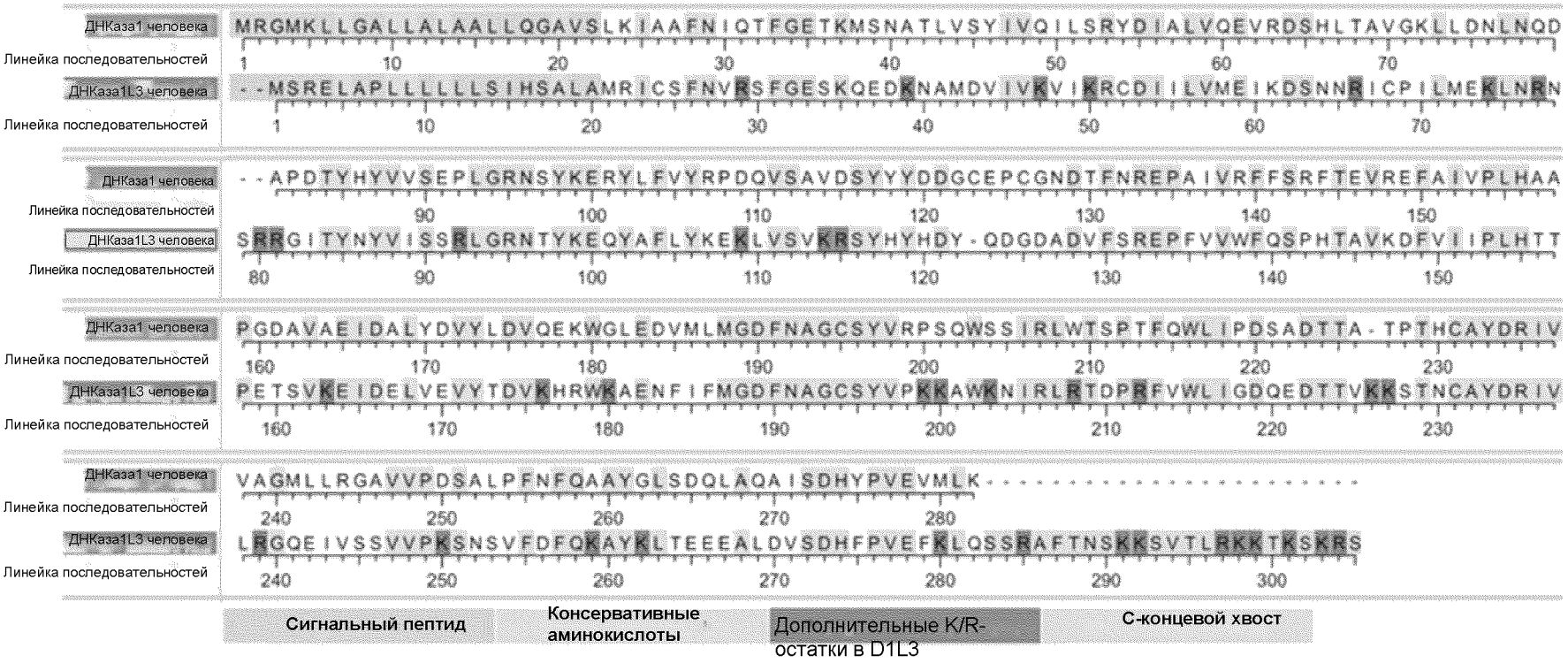
Фиг. 16A

In vitro скрининг-подход для определения гиперактивных вариантов D1 и D1L3

Фиг. 16B *Система регистрации результатов: разрушение дцДНК и хроматина*

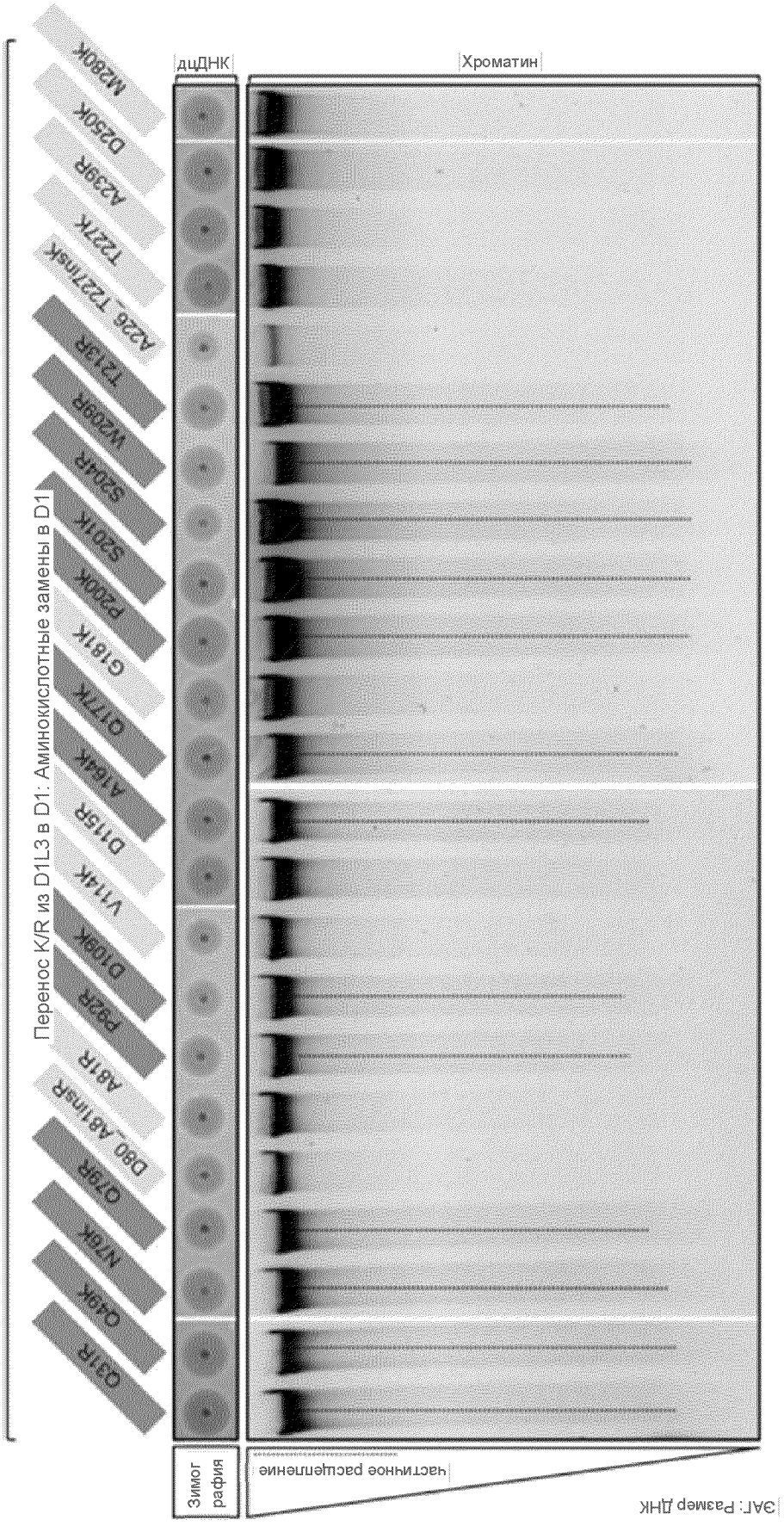


ФИГ. 17


ДНКаза1 человека
MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQD
Линейка последовательностей
1 10 20 30 40 50 60 70
ДНКаза1L3 человека
--MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRN
Линейка последовательностей
1 10 20 30 40 50 60 70
ДНКаза1 человека
--APDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAA
Линейка последовательностей
90 100 110 120 130 140 150
ДНКаза1L3 человека
SRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDY-QDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTT
Линейка последовательностей
80 90 100 110 120 130 140 150
ДНКаза1 человека
PGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTA-TPTHCAYDRIV
Линейка последовательностей
160 170 180 190 200 210 220 230
ДНКаза1L3 человека
PETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIV
Линейка последовательностей
160 170 180 190 200 210 220 230
ДНКаза1 человека
VAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK----------
Линейка последовательностей
240 250 260 270 280
ДНКаза1L3 человека
LRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS
Линейка последовательностей
240 250 260 270 280 290 300
Сигнальный пептид
Консервативные аминокислоты
Дополнительные K/R-остатки в D1L3
С-концевой хвост

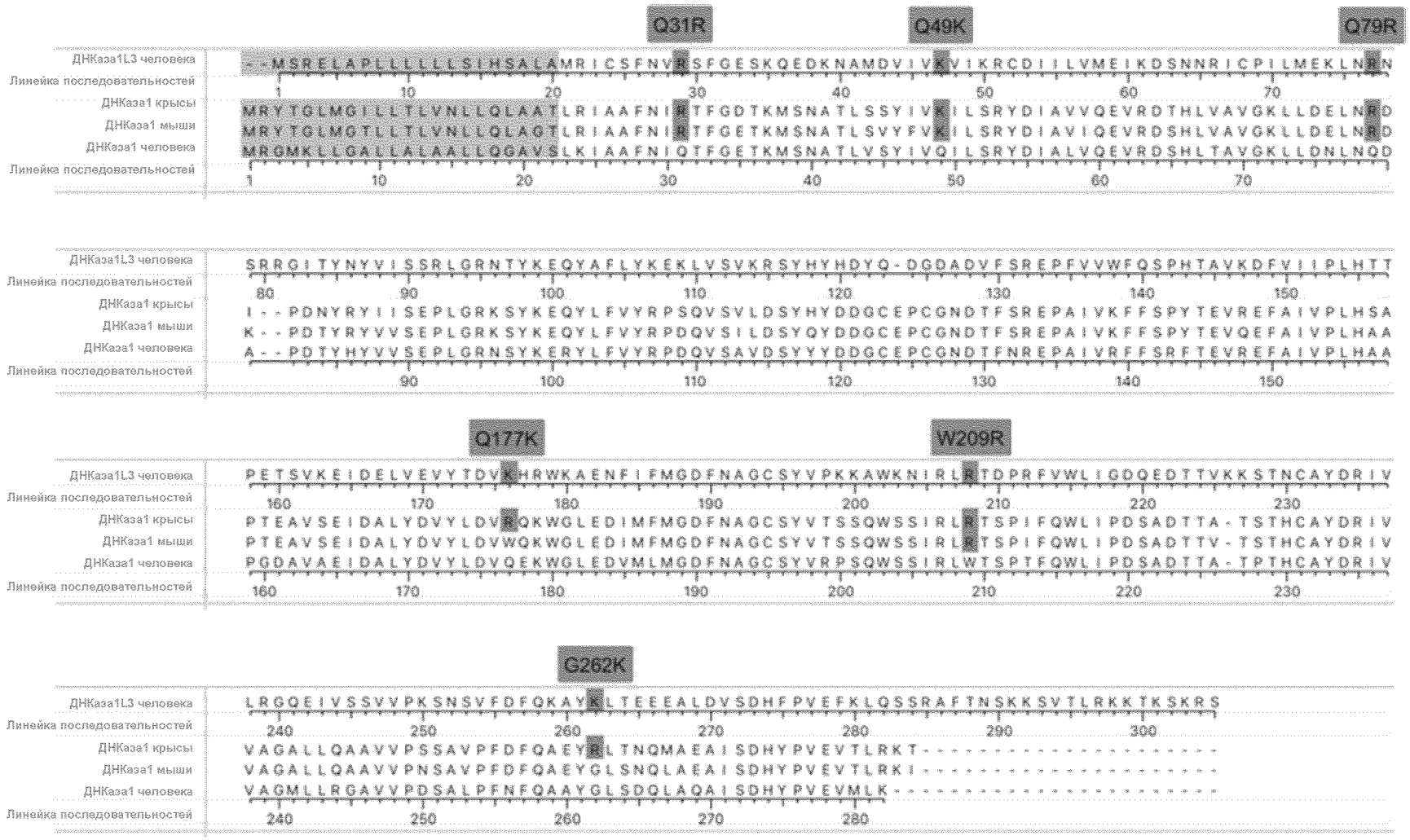
ФИГ. 18

#	ДНКаза1L3	ДНКаза1	Мутация в ДНКазе1	Анализируют в этой заявке
1	R29 (R9)	Q31 (Q9)	Q31R (Q9R)	+
2	K39 (R19)	A41 (A19)	A41K (A19K)	-
3	K47 (K27)	Q49 (Q27)	Q49K (Q27K)	+
4	K50 (K30)	S52 (S30)	S52K (S30K)	-
5	R66 (R46)	T68 (T46)	T68R (T46R)	-
6	K74 (K54)	N76 (N54)	N76K (N54K)	+
7	R77 (R57)	Q79 (Q57)	Q79R (Q57R)	+
8	R80 (R60)	-	D80_A81insR (D60_A61insR)	+
9	R81 (R61)	A81 (A59)	A81R (A61R)	+
10	R92 (R72)	P92 (P70)	P92R (P70R	+
11	K109 (K89)	D109 (D87)	D109K (D87K)	+
12	K114 (K94)	V114 (V92)	V114K (V92)	+
13	R115 (K95)	D115 (D93)	D115R (D92R)	+
14	K163 (K143)	A164 (A142)	A164K (A142K)	+
15	K176 (K156)	Q177 (Q155)	Q177K (Q115K)	+
16	K180 (K160)	G181 (G159)	G181K (G159K)	+
17	K199 (K179)	P200 (P178)	P200K (P178K)	-
18	K200 (K180)	S201 (S179)	S201K (S179K)	+
19	K203 (K183)	S204 (S182)	S204K (S182K)	+
20	R208 (R188)	W209 (W187)	W209R (W187R)	+
21	R212 (R192)	T213 (T191)	T213R (T191R)	+
22	K226 (K206)	-	A226_T227insK (A204_T205insK)	+
23	K227 (K207)	T227 (T205)	T227K (T205K)	+
24	R239 (R219)	A239 (A217)	A239R (A217R)	+
25	K250 (K230)	D250 (D228)	D250K (D228K)	+
26	K259 (K239)	A259 (A237)	A259K (A237K)	-
27	K262 (K262)	G262 (G240)	G262K (G240K)	-
28	K280 (K260)	M280 (M258)	M280K (M258K)	+
29	R285 (K265)	-	-	-
30	K291 (K271)	-	-	-
31	K292 (K272)	-	-	-
32	R297 (K277)	-	-	-
33	K298 (K278)	-	-	-
34	K299 (K279)	-	-	-
35	K301 (K281)	-	-	-
36	K303 (K283)	-	-	-
37	R304 (K284)	-	-	-

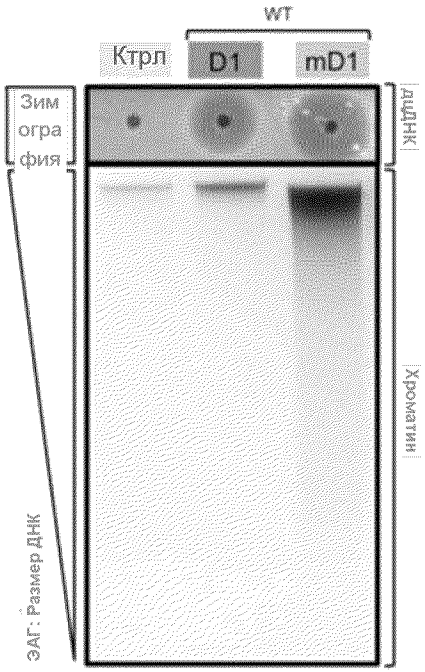

Перенос K/R из D1L3 в D1: Аминокислотные замены в D1
C31R
C49K
N76K
Q79R
D80_A81insR
A81R
P92R
D109K
V114K
D115R
A164K
Q177K
G181K
P200K
S201K
S204R
W209R
T213R
A226_T227insK
T227K
A239R
D250K
M280K
дцДНК
Хроматин
Зимография
частичное расщепление
ЭАГ: Размер ДНК

ФИГ. 19

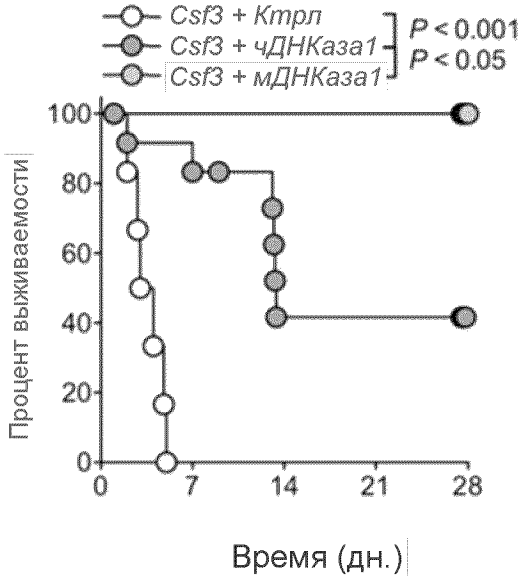
ФИГ. 20


Q31R
Q49K
Q79R
ДНКаза1L3 человека
Линейка последовательностей
ДНКаза1 крысы
ДНКаза1 мыши
ДНКаза1 человека
Линейка последовательностей
Q177K
W209R
G262K
Сигнальный пептид
Остатки K/R в D1L3, присутствующие в D1 мышей или крыс, отсутствующие в D1 человека

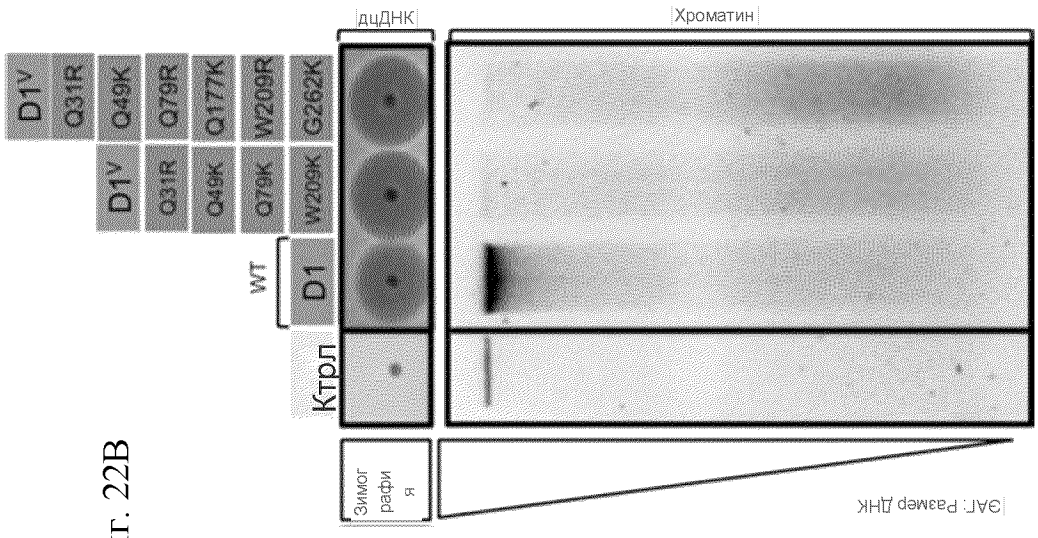
Фиг. 21A



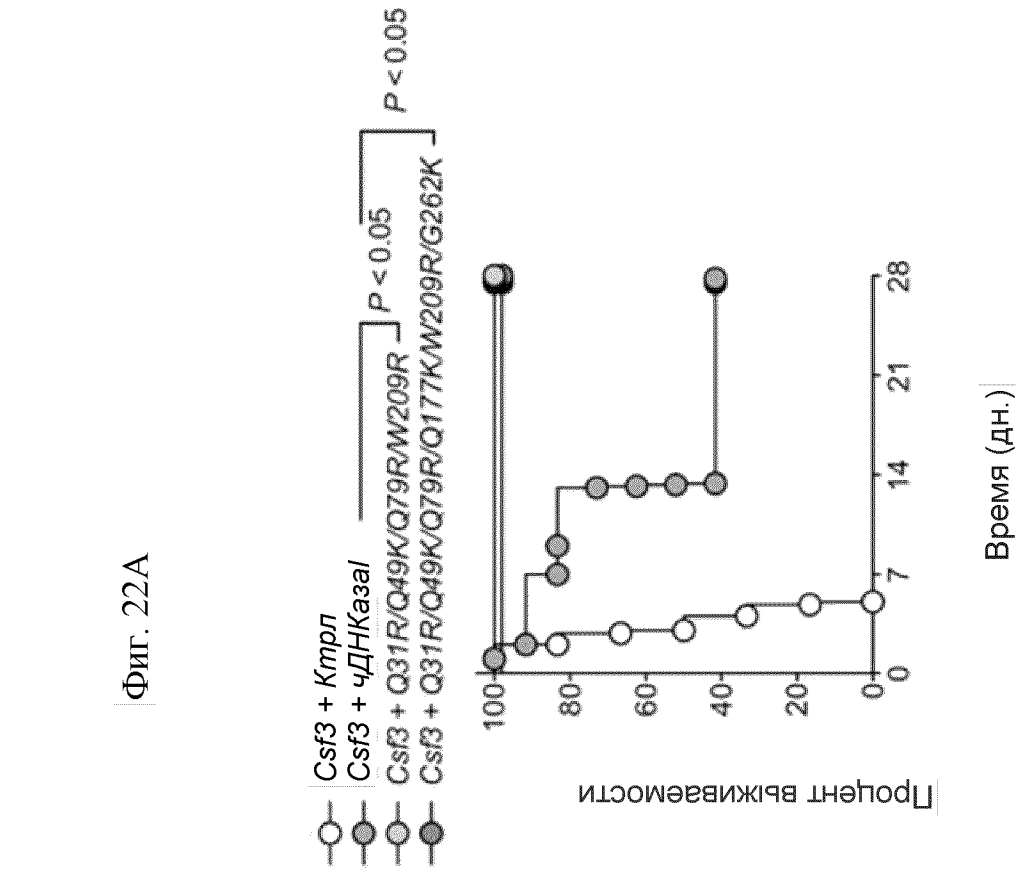
Фиг. 21B



ФИГ. 22

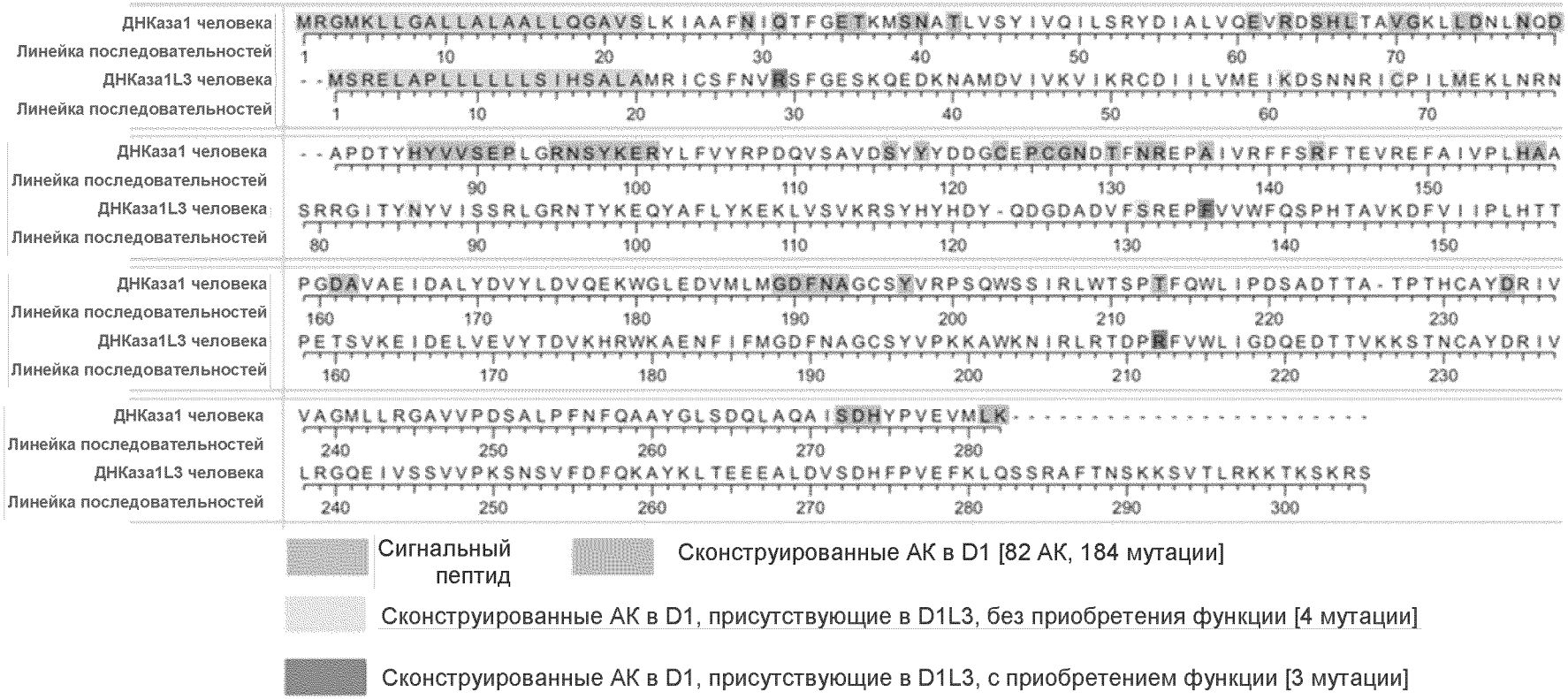


Фиг. 22B

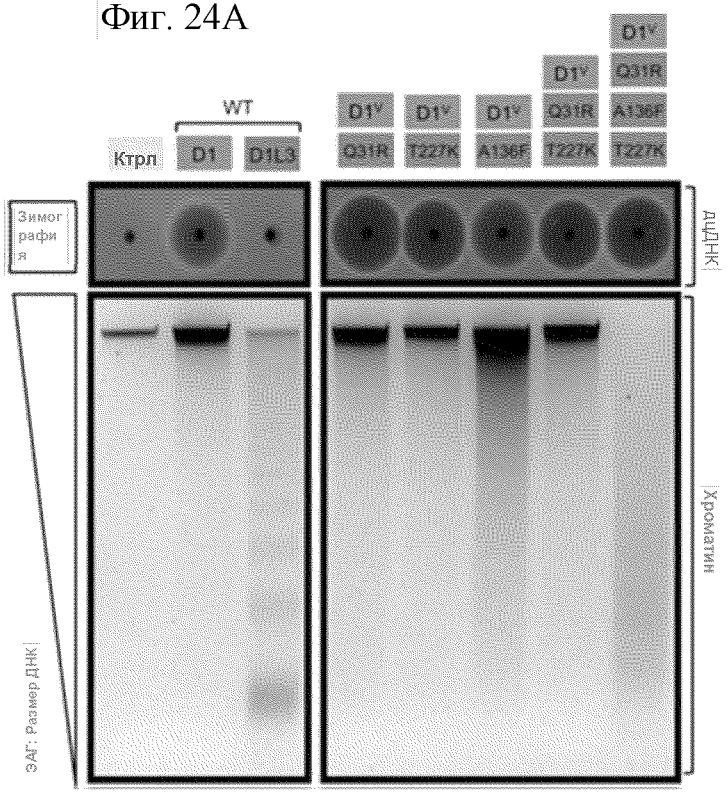


Фиг. 22A

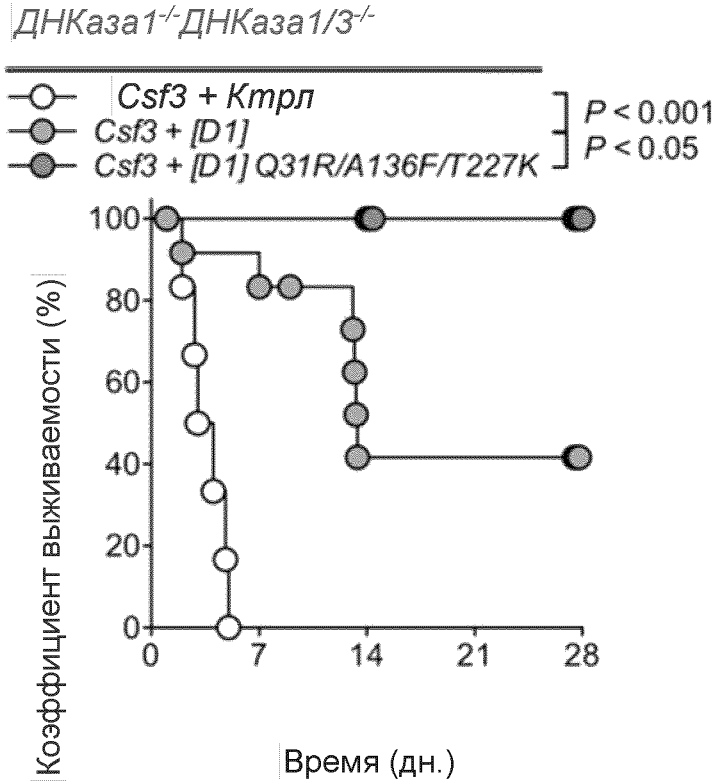
ФИГ. 23


ДНКаза1 человека
MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQD
Линейка последовательностей
1 10 20 30 40 50 60 70
ДНКаза1L3 человека
--MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNNRICPILMEKLNRN
Линейка последовательностей
1 10 20 30 40 50 60 70
ДНКаза1 человека
--APDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAA
Линейка последовательностей
90 100 110 120 130 140 150
ДНКаза1L3 человека
SRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDY-QDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTT
Линейка последовательностей
80 90 100 110 120 130 140 150
ДНКаза1 человека
PGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTA-TPTHCAYDRIV
Линейка последовательностей
160 170 180 190 200 210 220 230
ДНКаза1L3 человека
PETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIV
Линейка последовательностей
160 170 180 190 200 210 220 230
ДНКаза1 человека
VAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK----------
Линейка последовательностей
240 250 260 270 280
ДНКаза1L3 человека
LRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS
Линейка последовательностей
240 250 260 270 280 290 300
Сигнальный пептид
Сконструированные АК в D1 [82 АК, 184 мутации]
Сконструированные АК в D1, присутствующие в D1L3, без приобретения функции [4 мутации]
Сконструированные АК в D1, присутствующие в D1L3, с приобретением функции [3 мутации]

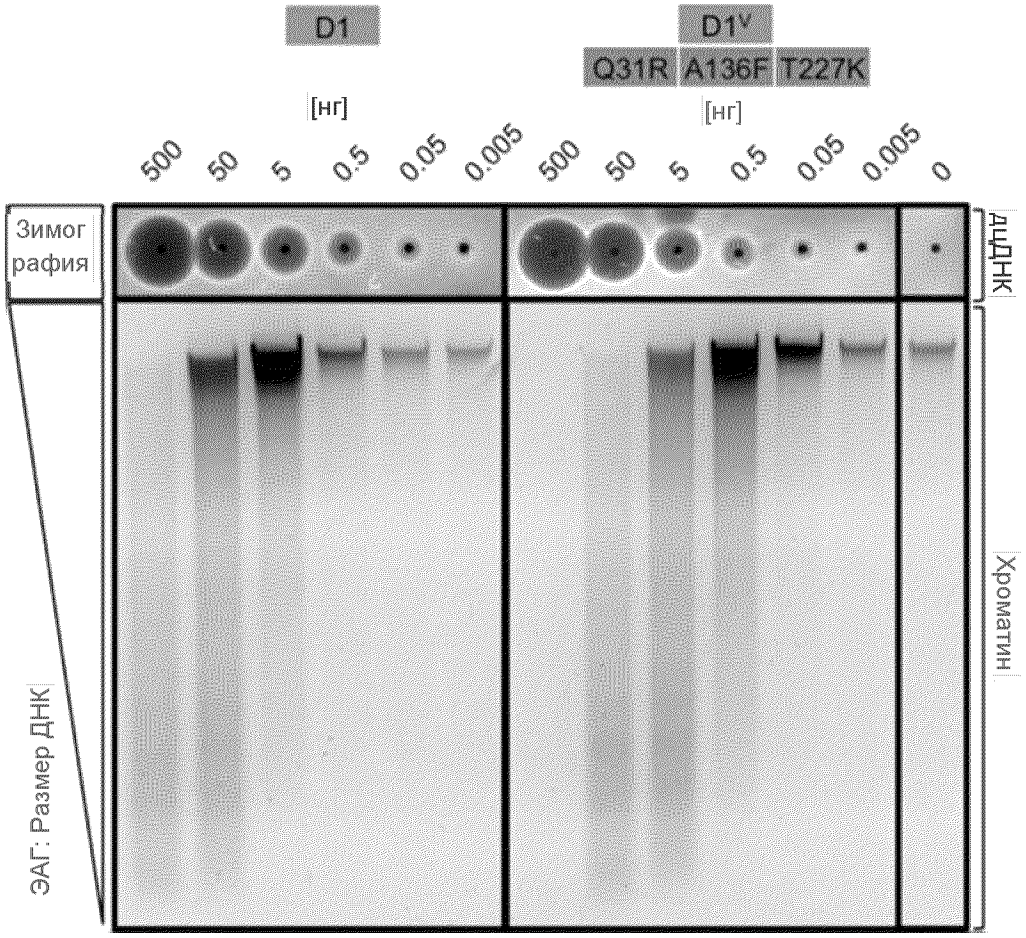
Фиг. 24A



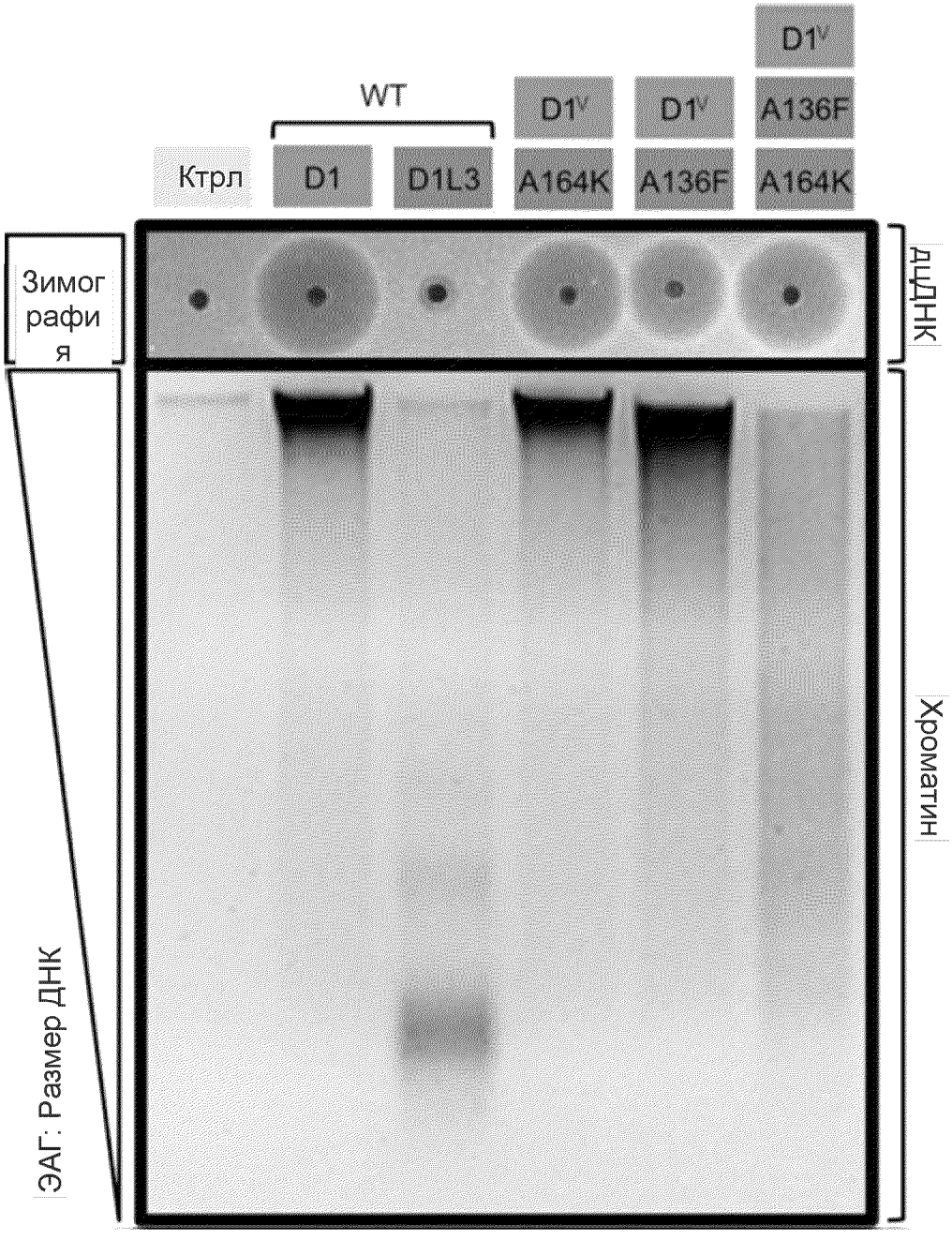
Фиг. 24B



ФИГ. 25

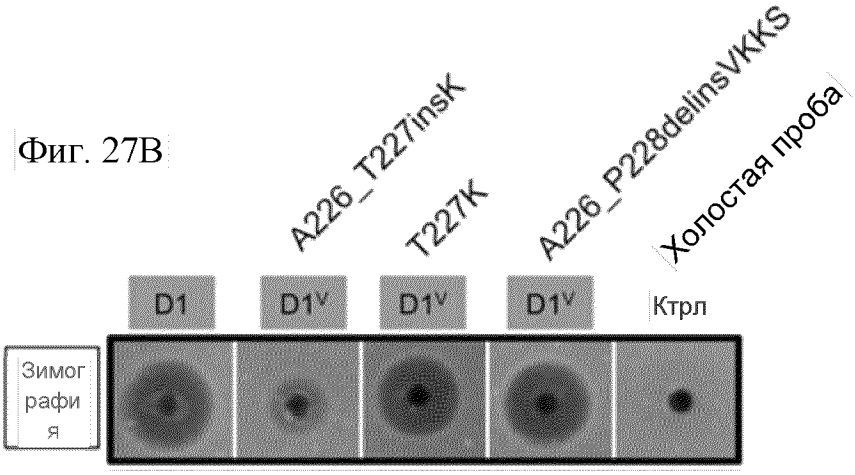

D1
D1V
Q31R
A136F
T227K
[нг]
[нг]
500
50
5
0.5
0.05
0.005
500
50
5
0.5
0.05
0.005
0
Зимография
ЭАГ: Размер ДНК
дцДНК
Хроматин

ФИГ. 26


Ктрл
WT
D1
D1L3
D1V
A164K
D1V
A136F
D1V
A136F
A164K
Зимография
дцДНК
Хроматин
ЭАГ: Размер ДНК

Фиг. 27A

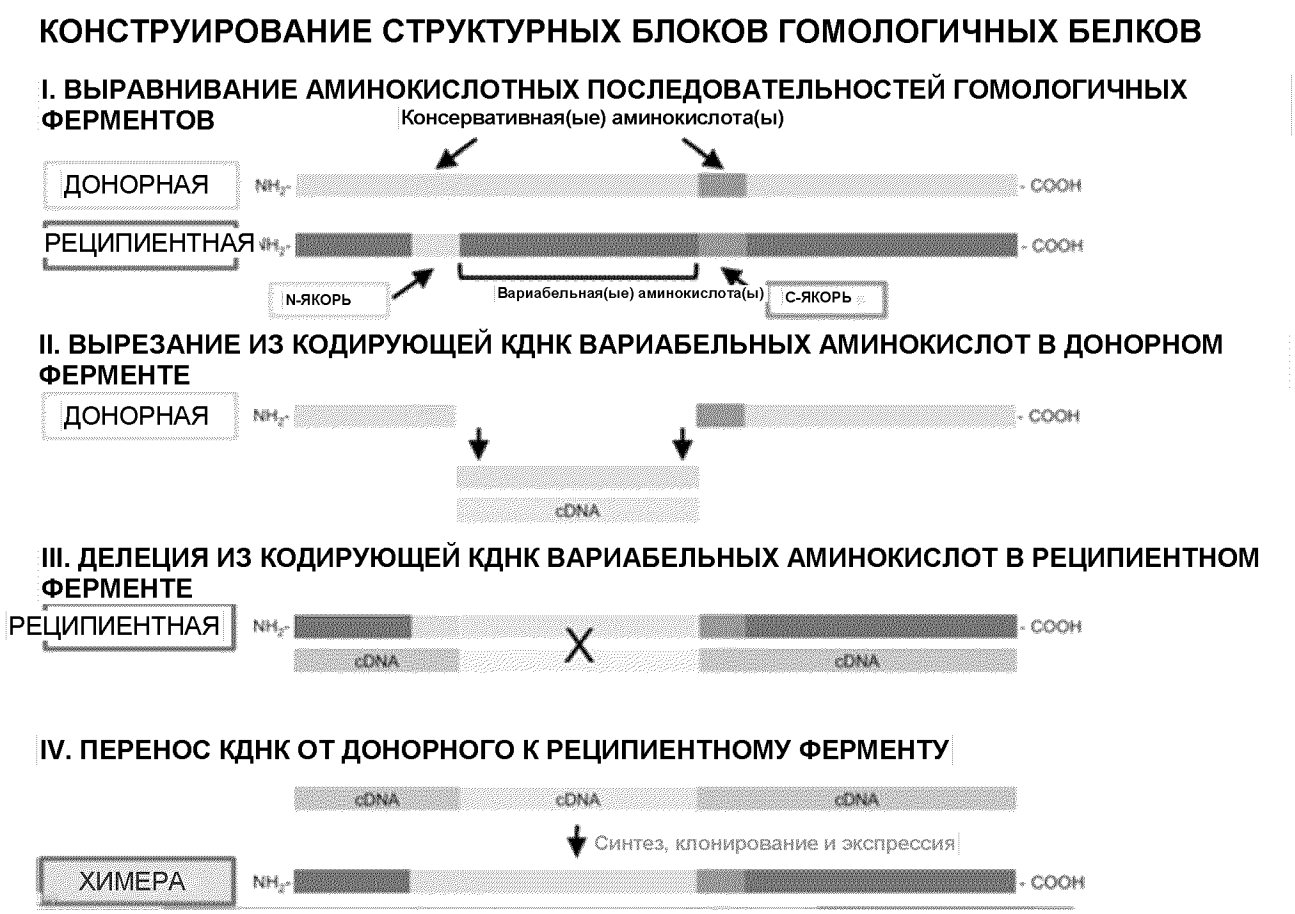
Фиг. 27B



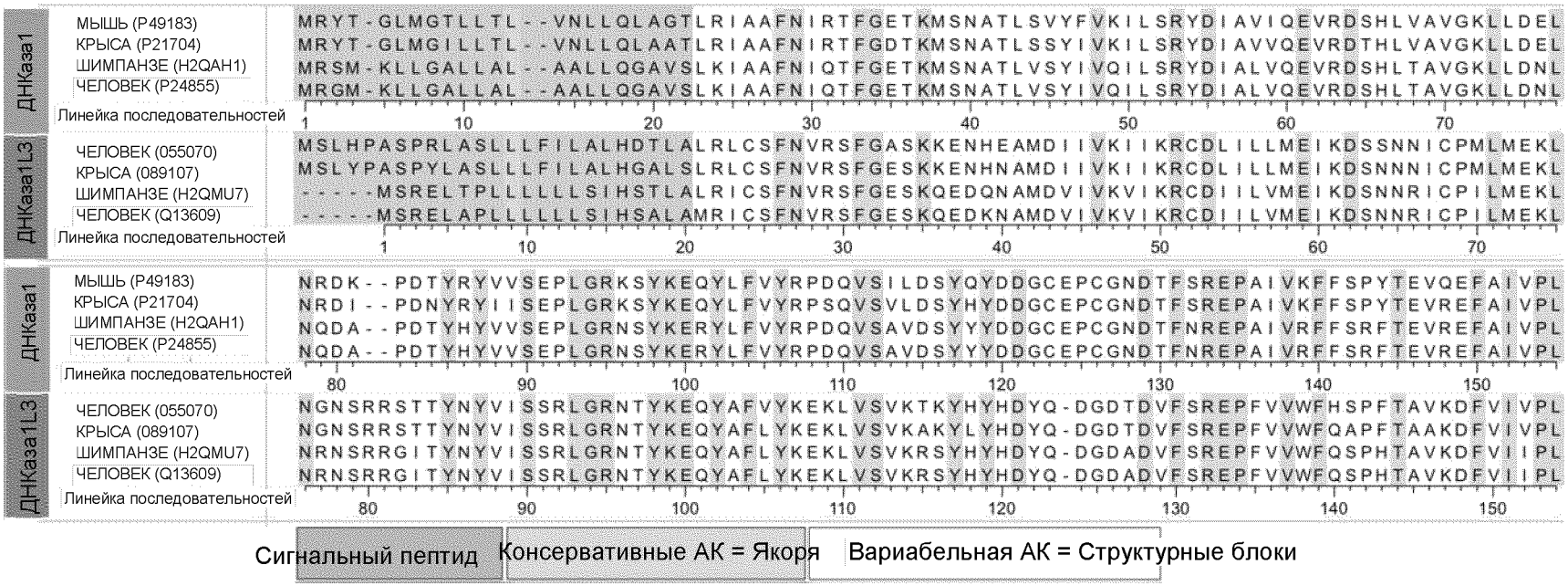
ФИГ. 28

СТРУКТУРА (4AWN): ДНКАЗА1 ЧЕЛОВЕКА
N-КОНЕЦ: β-ЛИСТ
С-КОНЕЦ: β-ЛИСТ
КОНСЕРВАТИВНЫЙ МОТИВ SDH

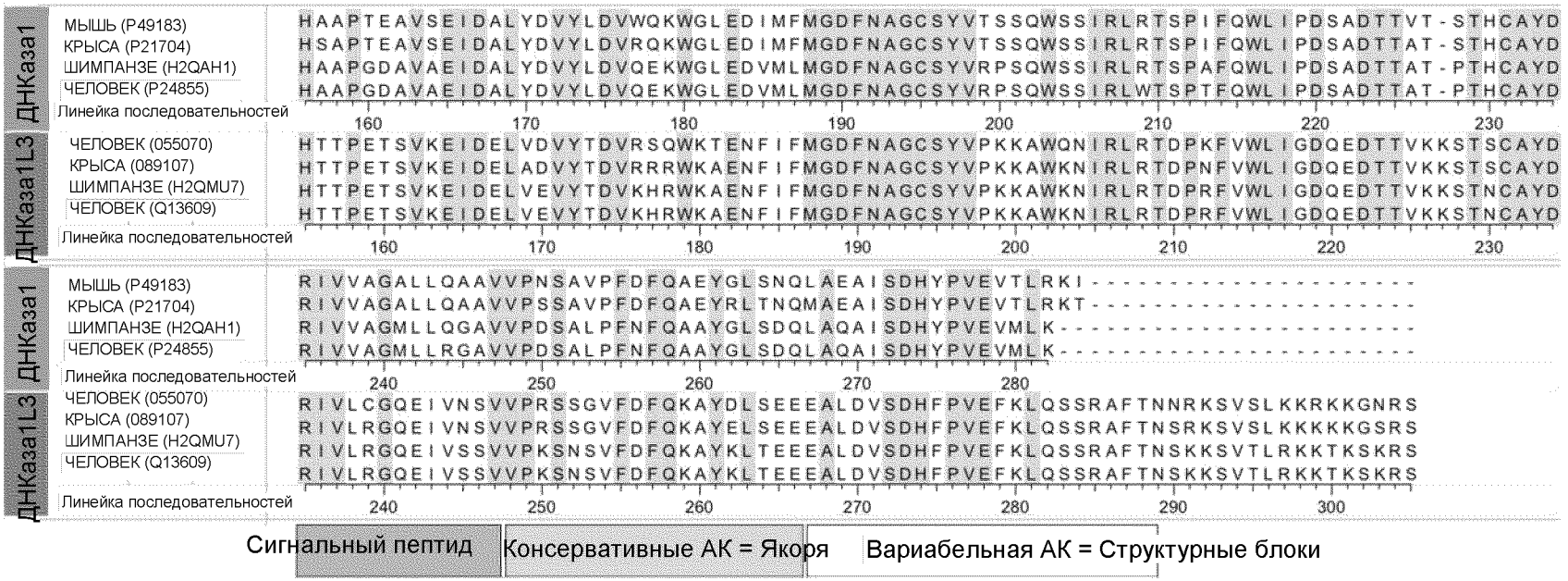
ФИГ. 29


КОНСТРУИРОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ БЛОКОВ ГОМОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ
I. ВЫРАВНИВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГОМОЛОГИЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ
Консервативная(ые) аминокислота(ы)
ДОНОРНАЯ
РЕЦИПИЕНТНАЯ
NH2-
- COOH
N-ЯКОРЬ
Вариабельная(ые) аминокислота(ы)
С-ЯКОРЬ
II. ВЫРЕЗАНИЕ ИЗ КОДИРУЮЩЕЙ КДНК ВАРИАБЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ДОНОРНОМ ФЕРМЕНТЕ
ДОНОРНАЯ
cDNA
III. ДЕЛЕЦИЯ ИЗ КОДИРУЮЩЕЙ КДНК ВАРИАБЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ В РЕЦИПИЕНТНОМ ФЕРМЕНТЕ
РЕЦИПИЕНТНАЯ
IV. ПЕРЕНОС КДНК ОТ ДОНОРНОГО К РЕЦИПИЕНТНОМУ ФЕРМЕНТУ
Синтез, клонирование и экспрессия
ХИМЕРА

ФИГ. 30


ДНКаза1
МЫШЬ (P49183)
КРЫСА (P21704)
ШИМПАНЗЕ (H2QAH1)
ЧЕЛОВЕК (P24855)
Линейка последовательностей
ДНКаза1L3
ЧЕЛОВЕК (055070)
КРЫСА (089107)
ШИМПАНЗЕ (H2QMU7)
ЧЕЛОВЕК (Q13609)
Линейка последовательностей
Сигнальный пептид
Консервативные АК = Якоря
Вариабельная АК = Структурные блоки

ФИГ. 30 (продолжение)



Фиг. 31A

Пример конструирования структурных блоков: варианты ДНКазы1 (D1) человека со структурными блоками от ДНКазы1L3 (D1L3) человека

BB #	N-якорь D1: Консервативные АК в D1	C-якоря D1: Консервативные АК в D1	Структурные блоки D1: Вариабельные АК в D1	Структурные блоки D1L3: Вариабельные АК в D1L3	Мутации структурных блоков вариантов D1	СБ Кластер
0	N/A	N/A	1-22 (MRGMKLL GALLALAALLQGAVS)	1-20 (MSRELAPLLLLLLSIHSALA)	M1_S22delinsMSRELAPLLL LLLSIHSALA	BB_0
1	Signal peptide	F28/N29	23-27 (LKIAA)	21-25 (MRICS)	L23_A27delinsMRICS	BB_{1-3}
2	F28/N29	F33/G34	30-32 (IQT)	28-30 (VRS)	I30_T32delinsVRS	
3	F33/G34	K37	35-36 (ET)	33-34 (ES)	E35_T36delinsES	
4	K37	V48	38-47 (MSNATLVSYI)	36-45 (QEDKNAMDVI)	M38_I47delinsQEDKNAMDVI	BB_4
5	V48	R53	49-52 (QILS)	47-50 (KVIK)	Q49_S52delinsKVIK	BB_{5-7}
6	R53	D55	54 (Y)	52 (C)	Y54C	
7	D55	E61	56-60 (IALVQ)	54-58 (IILVM)	I56_Q60delinsIILVM	
8	E61	D64	62-63 (VR)	60-61 (IK)	V62_R63delinsIK	BB_{8-10}
9	D64	L73	65-72 (SHLTAVGK)	63-70 (SNNRICPI)	S65_K72delinsSNNRICPI	
10	L73	L77/N78	74-76 (LDN)	72-74 (MEK)	L74_N76delinsMEK	
11	L77/N78	Y85	79-84 (QDAPDT)	77-84 (RNSRRGIT)	Q79_T84delinsRNSRRGIT	BB_{11}
12	Y85	Y87	86 (H)	86 (N)	H86N	BB_{12-14}
13	Y87	S90	88-89 (VV)	88-89 (VI)	V88_V89delinsVI	
14	S90	L93/G94/R95	91-92 (EP)	91-92 (SR)	E91_P92delinsSR	
15	L93/G94/R95	Y98/K99/E100	96-97 (NS)	96-97 (NT)	N96_S97delinsNT	BB_{15-18}
16	Y98/K99/E100	Y102	101 (R)	101 (Q)	R101Q	
17	Y102	F104	103 (L)	103 (A)	L103A	
18	F104	Y106	105 (V)	105 (L)	V105L	
19	Y106	V111/S112	107-110 (RPDQ)	107-110 (KEKL)	R107_Q110delinsKEKL	BB_{19-22}
20	Y111/S112	Y117	113-116 (AVDS)	113-116 (VKRS)	A113_S116delinsVKRS	
21	Y117	Y119	118 (Y)	118 (H)	Y118H	
22	Y119	D121	120 (D)	120 (H)	D120H	
23	D121	D129	122-128 (GCEPCGN)	122-127 (YQDGDA)	G122_N128delinsYQDGDA	BB_{23-25}
24	D129	F131	130 (T)	129 (V)	T130S	
25	F131	R133/E134/P135	132 (N)	131 (S)	N132S	
26	R133/E134/P135	V138	136-137 (AI)	135-136 (FV)	A136_I137delinsFV	BB_{26}
27	V138	F140	139 (R)	138 (W)	R139W	B_{27-34}
28	F140	T145	141-144 (FSRF)	140-143 (QSPH)	F141_F144delinsQSPH	
29	T145	F150	146-149 (EVRE)	145-148 (AVKD)	E146_E149delinsAVKD	
30	F150	I152	151 (A)	150 (V)	A151V	
31	I152	P154/L155/H156	153 (V)	152 (I)	V153I	
32	P154/L155/H156	P159	157-158 (AA)	156-157 (TT)	A157_A158delinsTT	
33	P159	V163	160-162 (GDA)	159-161 (ETS)	G160_A162delinsETS	
34	V163	E165/I166/D167	164 (A)	163 (K)	A164K	

Фиг. 31A (продолжение)

BB #	N-якорь D1: Консервативные АК в D1	C-якоря D1: Консервативные АК в D1	Структурные блоки D1: Вариабельные АК в D1	Структурные блоки D1L3: Вариабельные АК в D1L3	Мутации структурных блоков вариантов D1	Кластер СБ
35	E165/I166/D167	L169	168 (A)	167 (E)	A168E	BB_{35-37}
36	L169	V172/Y173	170-171 (YD)	169-171 (VE)	Y170_D171delinsVE	
37	V172/Y173	D175/V176	174 (L)	173 (T)	L174T	
38	D175/V176	W180	177-179 (QEK)	176-178 (KHR)	Q177_K179delinsKHR	BB_{38-40}
39	W180	E183	181-182 (GL)	180-181 (KA)	G181_L182delinsKA	
40	E183	M187-GDFNAGCSY-V198	184-187 (DVML)	183-187 (NFIF)	D184_L187delinsNFIF	
41	M187-GDFNAGCSY-V198	W203	199-202 (RPSQ)	198-201 (PKKA)	R199_Q202delinsPKKA	BB_{41-49}
42	W203	I206/R207/L208	204-205 (SS)	203-204 (KN)	S204_S205delinsKN	
43	I206/R207/L208	T210	209 (W)	208 (R)	W209R	
44	T210	P212	211 (S)	210 (D)	S211D	
45	P212	F214	213 (T)	212 (R)	T213R	
46	F214	W216/L217/I218	215 (Q)	214 (V)	Q215V	
47	W216/L217/I218	D220	219 (P)	218 (G)	P219G	
48	D220	D223/T224/T225	221-222 (SA)	220-221 (QE)	S221_A222delinsQE	
49	D223/T224/T225	T229	226-228 (ATP)	225-228 (VKKS)	A226_P228delinsVKKS	BB_{49}
50	T229	C231-AYDRI-V237	230 (H)	230 (N)	H230N	BB_{50-54}
51	C231-AYDRI-V237	G240	238-239 (VA)	238-239 (LR)	V238_A239delinsLR	
52	G240	V247/V248/P249	241-246 (MLLRGA)	241-246 (QEIVSS)	M241_A246delinsQEIVSS	
53	V247/V248/P249	S251	250 (D)	250 (K)	D250K	
54	S251	F255	252-254 (ALP)	252-254 (NSV)	A252_P254delinsNSV	
55	F255	F257/Q258	256 (N)	256 (D)	N256D	BB_{55-59}
56	F257/Q258	Y261	259-260 (AA)	259-260 (KA)	A259_A260delinsKA	
57	Y261	L263	262 (G)	262 (K)	G262K	
58	L263	A268	264-267 (SDQL)	264-267 (TEEE)	S264_L267delinsTEEE	
59	A268	S272/D273/H274	269-271 (QAI)	269-271 (LDV)	Q269_I271delinsLDV	
60	S272/D273/H274	P276/V277/E278	275 (Y)	275 (F)	Y275F	BB_{60-62}
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (VM)	279-280 (FK)	V279_M280delinsFK	
62	L281	-	282 (K)	282-305 (QSSRAFTNSKK SVTLRKKTKSKRS)	K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS	

Фиг. 31B

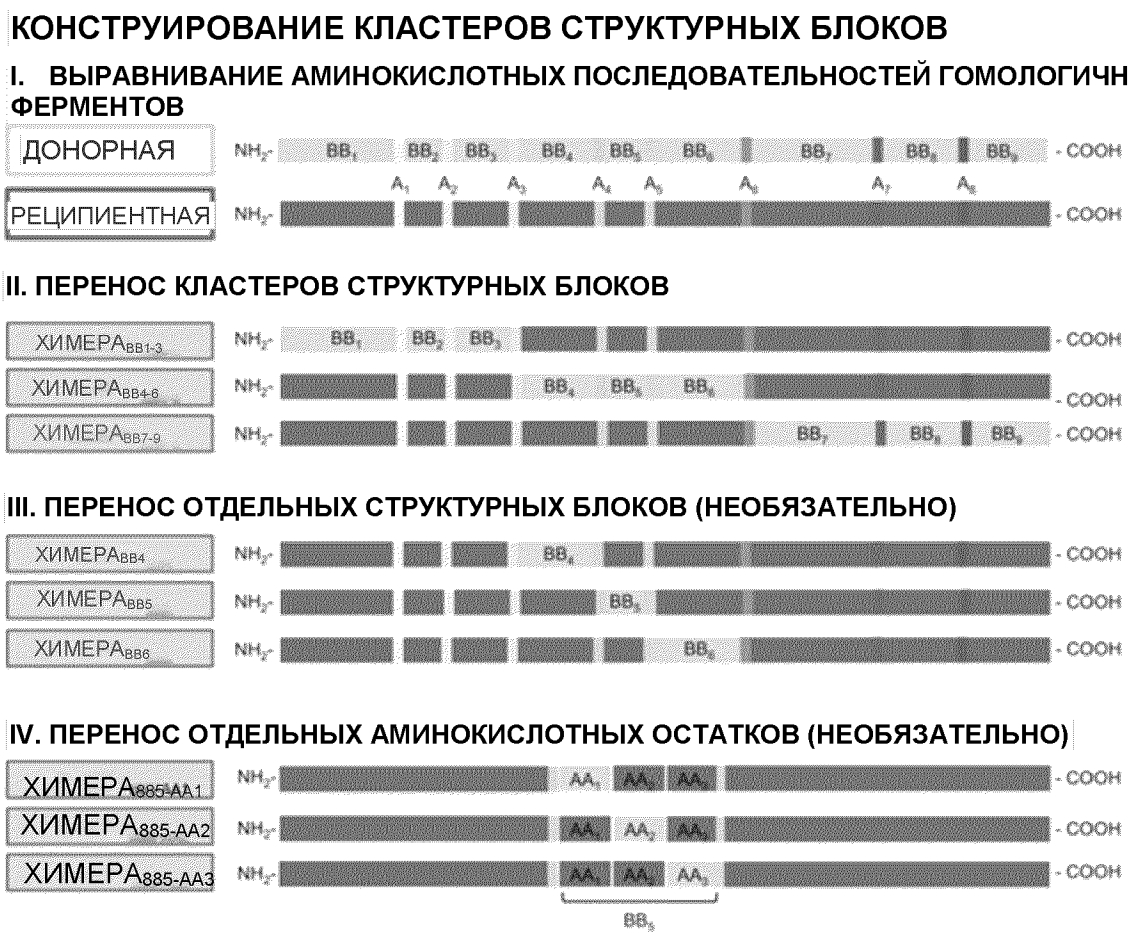
Пример конструирования структурных блоков: варианты ДНКазы1L3 (D1L3) человека со структурными блоками от ДНКазы1 (D1) человека

BB #	N-якорь D1L3: Консервативные АК в D1	C-якоря D1L3: Консервативные АК в D1	Структурные блоки D1L3: Вариабельные АК в D1L3	Структурные блоки D1: Вариабельные АК в D1	Мутации структурных блоков вариантов D1L3	Кластер СБ
0	N/A	N/A	1-20 (MSRELAPLLLLLLSIHSALA)	1-22 (MRGMKLL GALLALAALLQGAVS)	M1_A20delinsMRGMKLLGALLALA ALLQGAVS	BB_0
1	Signal peptide	F26/N27	21-25 (MRICS)	23-27 (LKIAA)	M21_S25delinsLKIAA	BB_{1-3}
2	F26/N27	F31/G32	28-30 (VRS)	30-32 (IQT)	V28_S30delinsIQT	
3	F33/G34	K35	33-34 (ES)	35-36 (ET)	E33_S34delinsET	
4	K35	V46	36-45 (QEDKNAMDVI)	38-47 (MSNATLVSYI)	Q36_I45delinsMSNATLVSYI	BB_4
5	V46	R51	47-50 (KVIK)	49-52 (QILS)	K47_K50delinsQILS	BB_{5-7}
6	R51	D53	52 (C)	54 (Y)	C52Y	
7	D53	E59	54-58 (IILVM)	56-60 (IALVQ)	I54_M58delinsIALVQ	
8	E59	D62	60-61 (IK)	62-63 (VR)	I60_K61delinsVR	BB_{8-10}
9	D62	L71	63-70 (SNNRICPI)	65-72 (SHLTAVGK)	S63_I70delinsSHLTAVGK	
10	L71	L75/N76	72-74 (MEK)	74-76 (LDN)	M72_K74delinsLDN	
11	L75/N76	Y85	77-84 (RNSRRGIT)	79-84 (QDAPDT)	R77_T84delinsQDAPDT	BB_{11}
12	Y85	Y87	86 (N)	86 (H)	N86H	BB_{12-14}
13	Y87	S90	88-89 (VI)	88-89 (VV)	V88_I89delinsVV	
14	S90	L93/G94/R95	91-92 (SR)	91-92 (EP)	S91_R92delinsEP	
15	L93/G94/R95	Y98/K99/E100	96-97 (NT)	96-97 (NS)	N96_T97delinsNS	BB_{15-18}
16	Y98/K99/E100	Y102	101 (Q)	101 (R)	Q101R	
17	Y102	F104	103 (A)	103 (L)	A103L	
18	F104	Y106	105 (L)	105 (V)	L105V	
19	Y106	V111/S112	107-110 (KEKL)	107-110 (RPDQ)	K107_L110delinsRPDQ	BB_{19-22}
20	Y111/S112	Y117	113-116 (VKRS)	113-116 (AVDS)	V113_S116delinsAVDS	
21	Y117	Y119	118 (H)	118 (Y)	H118Y	
22	Y119	D121	120 (H)	120 (D)	H120D	
23	D121	D128	122-127 (YQDGDA)	122-128 (GCEPCGN)	Y122_A127delinsGCEPCGN	BB_{23-25}
24	D128	F130	129 (V)	130 (T)	V129T	
25	F130	R132/E133/P134	131 (S)	132 (N)	S131N	
26	R132/E133/P134	V137	135-136 (FV)	136-137 (AI)	135F_136VdelinsAI	BB_{26}
27	V137	F139	138 (W)	139 (R)	W138R	B_{27-34}
28	F139	T144	140-143 (QSPH)	141-144 (FSRF)	Q140_H143delinsFSRF	
29	T144	F149	145-148 (AVKD)	146-149 (EVRE)	A145_D148delinsAVKD	
30	F149	I151	150 (V)	151 (A)	V150A	
31	I151	P153/L154/H155	152 (I)	153 (V)	I152A	
32	P153/L154/H155	P157	156-157 (TT)	157-158 (AA)	T156_T157delinsAA	
33	P157	V162	159-161 (ETS)	160-162 (GDA)	E159_S161delinsGDA	
34	V162	E164/I165/D166	163 (K)	164 (A)	K163A	

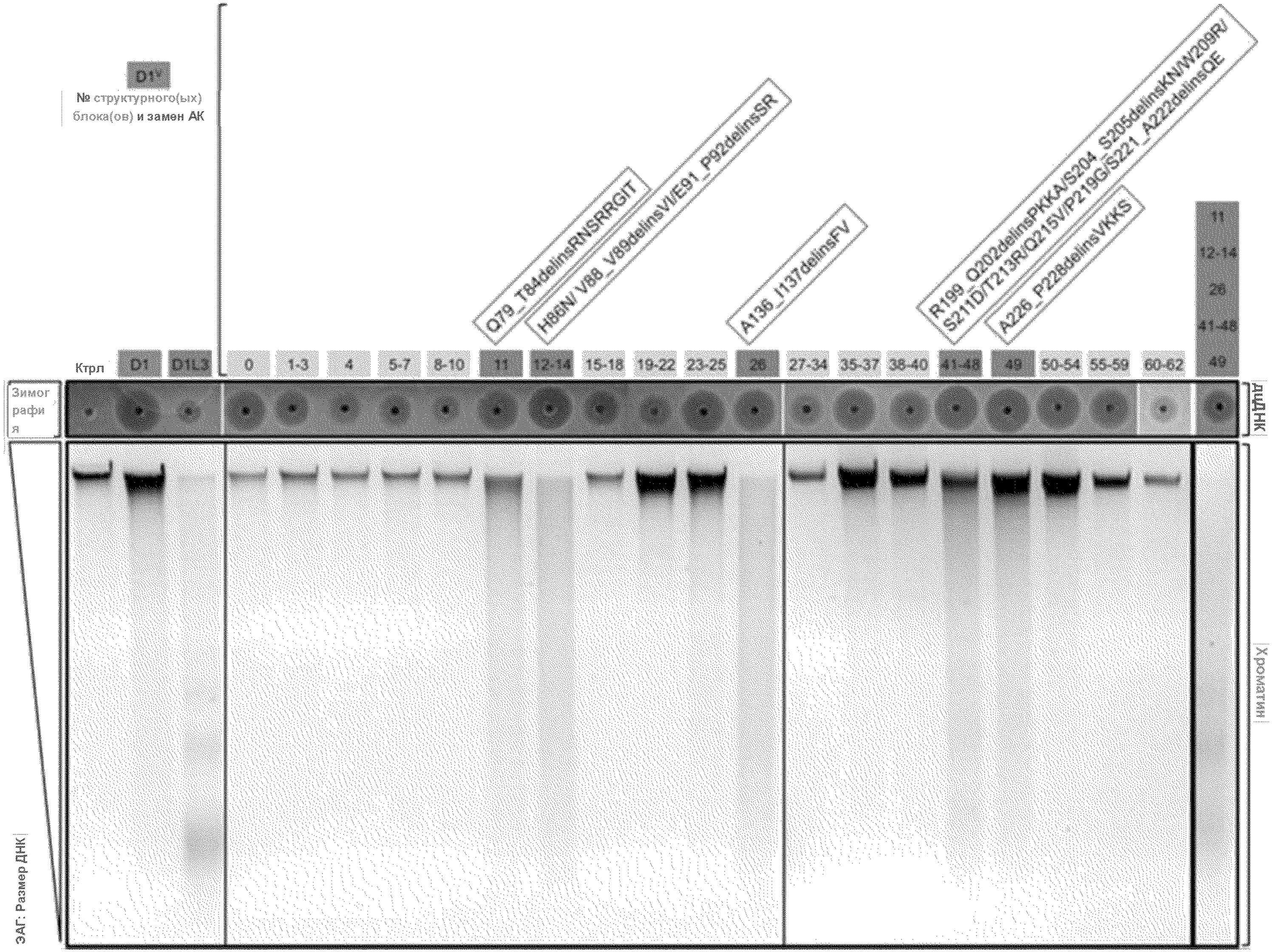
Фиг. 31B (продолжение)

BB #	N-якорь D1L3: Консервативные АК в D1L3	C-якоря D1L3: Консервативные АК в D1L3	Структурные блоки D1L3: Вариабельные АК в D1L3	Структурные блоки D1: Вариабельные АК в D1	Мутации структурных блоков вариантов D1L3	Кластер СБ
35	E164/I165/D166	L168	167 (E)	168 (A)	E167A	
36	L168	V171/Y172	169-170 (VE)	170-171 (YD)	V169_E170delinsYD	BB_{35-37}
37	V171/Y172	D174/V175	173 (T)	174 (L)	T173L	
38	D174/V175	W179	176-178 (KHR)	177-179 (QEK)	K176_R178delinsQEK	
39	W179	E182	180-181 (KA)	181-182 (GL)	K180_A181delinsGL	BB_{38-40}
40	E182	M187-GDFNAGCSY-V197	183-186 (NFIF)	184-187 (DVML)	N183_F186delinsDVML	
41	M187-GDFNAGCSY-V197	W202	198-201 (PKKA)	199-202 (RPSQ)	198P_201AdelinsRPSQ	
42	W202	I205/R206/L207	203-204 (KN)	204-205 (SS)	K203_N204delinsSS	
43	I205/R206/L207	T209	208 (R)	209 (W)	R208W	
44	T209	P211	210 (D)	211 (S)	D210S	
45	P211	F213	212 (R)	213 (T)	R212T	BB_{41-48}
46	F213	W215/L216/I217	214 (V)	215 (Q)	V214Q	
47	W215/L216/I217	D219	218 (G)	219 (P)	G218P	
48	D219	D222/T223/T224	220-221 (QE)	221-222 (SA)	Q220_E221delinsSA	
49	D222/T223/T224	T229	225-228 (VKKS)	226-228 (ATP)	V225_S228delinsATP	BB_{49}
50	T229	C231-AYDRI-V237	230 (N)	230 (H)	N230H	
51	C231-AYDRI-V237	G240	238-239 (LR)	238-239 (VA)	L238_R239delinsVA	
52	G240	V247/V248/P249	241-246 (QEIVSS)	241-246 (MLLRGA)	Q241_S246delinsMLLRGA	BB_{50-54}
53	V247/V248/P249	S251	250 (K)	250 (D)	K250D	
54	S251	F255	252-254 (NSV)	252-254 (ALP)	N252_V254delinsALP	
55	F255	F257/Q258	256 (D)	256 (N)	D256N	
56	F257/Q258	Y261	259-260 (KA)	259-260 (AA)	K259_A260delinsAA	
57	Y261	L263	262 (K)	262 (G)	K262G	BB_{55-59}
58	L263	A268	264-267 (TEEE)	264-267 (SDQL)	T264_E267delinsSDQL	
59	A268	S272/D273/H274	269-271 (LDV)	269-271 (QAI)	L269_V271delinsQAI	
60	S272/D273/H274	P276/V277/E278	275 (F)	275 (Y)	F275Y	
61	P276/V277/E278	L281	279-280 (FK)	279-280 (VM)	F279_K280delinsVM	
62	L281	-	282-305 (QSSRAFTNSKK SVTLRKKTKSKRS)	282 (K)	Q282_S305delinsK	BB_{60-62}

ФИГ. 32

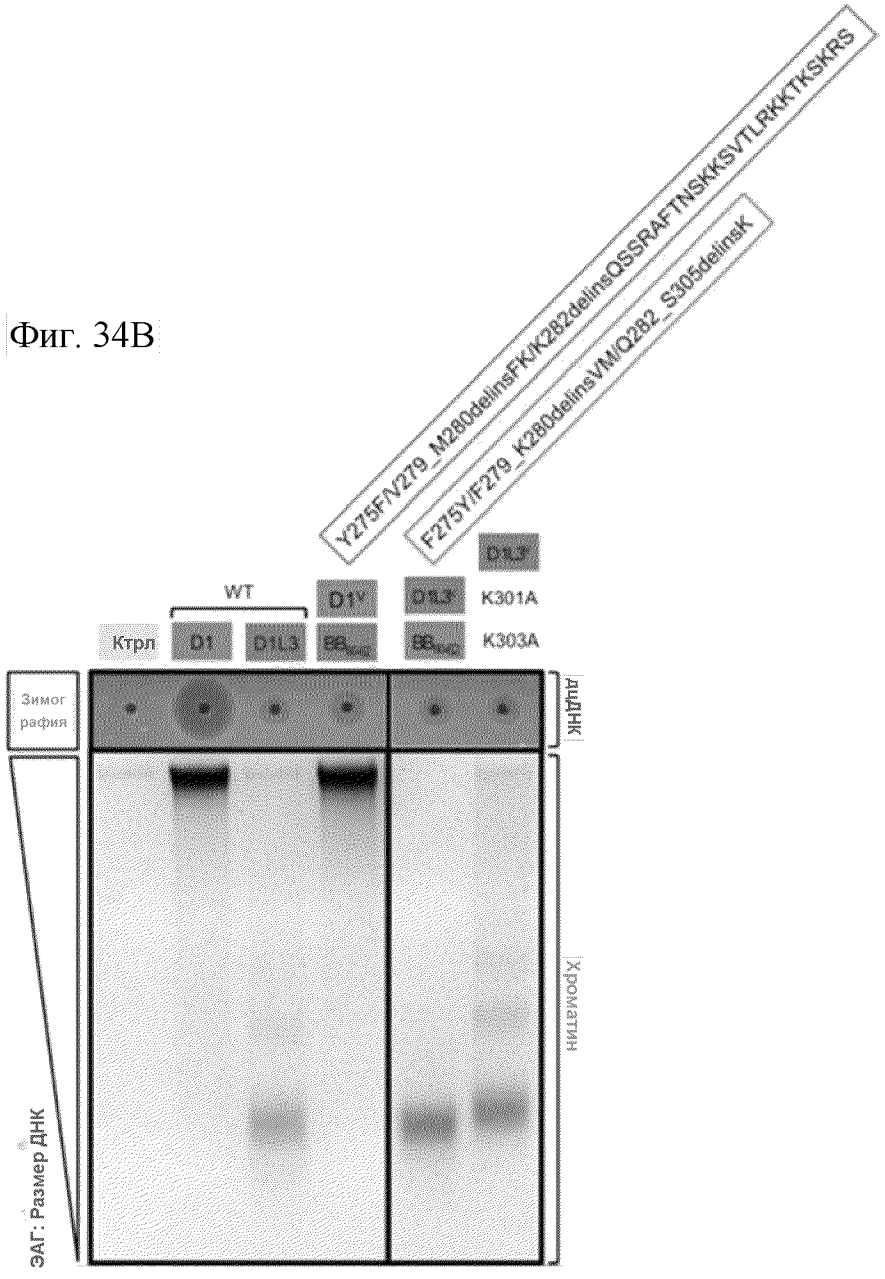

КОНСТРУИРОВАНИЕ КЛАСТЕРОВ СТРУКТУРНЫХ БЛОКОВ
I. ВЫРАВНИВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГОМОЛОГИЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ
ДОНОРНАЯ
РЕЦИПИЕНТНАЯ
II. ПЕРЕНОС КЛАСТЕРОВ СТРУКТУРНЫХ БЛОКОВ
ХИМЕРА BB1-3
ХИМЕРА BB4-6
ХИМЕРА BB7-9
III. ПЕРЕНОС ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУРНЫХ БЛОКОВ (НЕОБЯЗАТЕЛЬНО)
ХИМЕРА BB4
ХИМЕРА BB5
ХИМЕРА BB6
IV. ПЕРЕНОС ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ (НЕОБЯЗАТЕЛЬНО)
ХИМЕРА 885-AA1
ХИМЕРА 885-AA2
ХИМЕРА 885-AA3
- COOH

ФИГ. 33

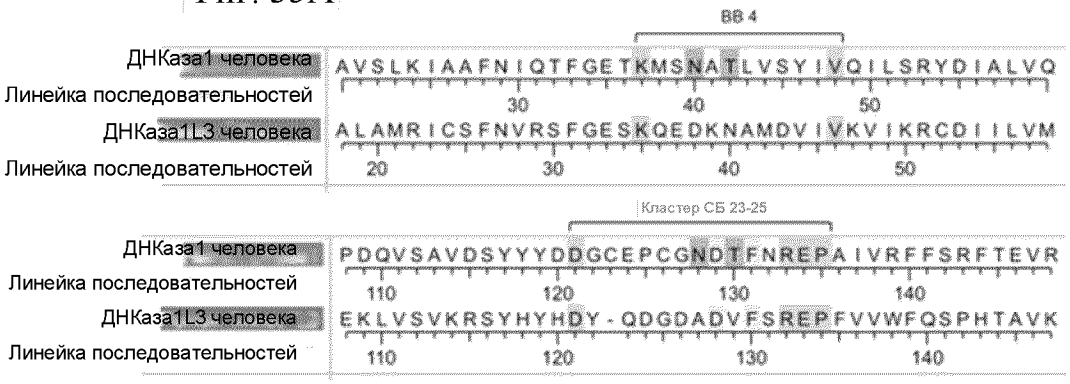

D1v
№ структурного(ых) блока(ов) и замен АК
Q79_T84delinsRNSRRGIT
H86N/ V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR
A136_I137delinsFV
R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/ S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE
A226_P228delinsVKKS
11
12-14
26
41-48
49
Ктрл
D1
D1L3
0
1-3
4
5-7
8-10
11
12-14
15-18
19-22
23-25
26
27-34
35-37
38-40
41-48
49
50-54
55-59
60-62
Зимография
дцДНК
Хроматин
ЭАГ: Размер ДНК

Фиг. 34A

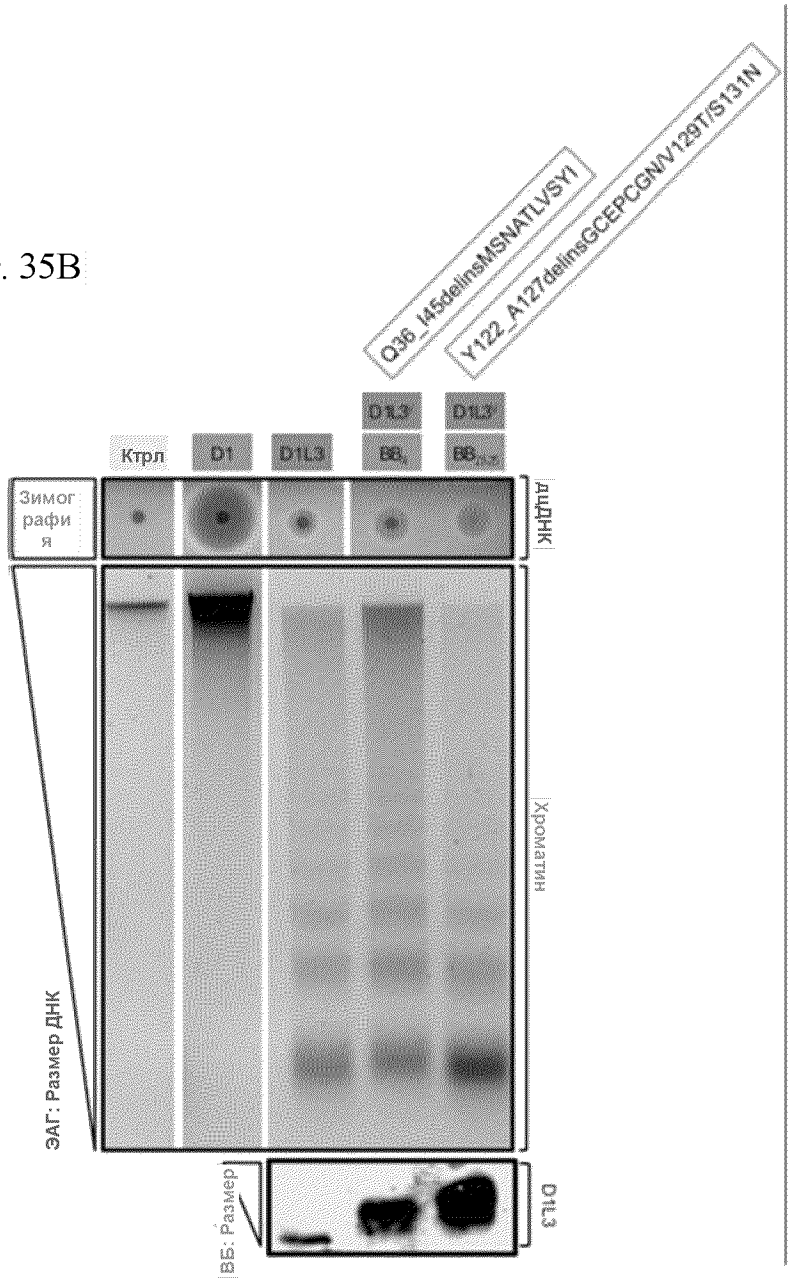
Фиг. 34B



Фиг. 35A

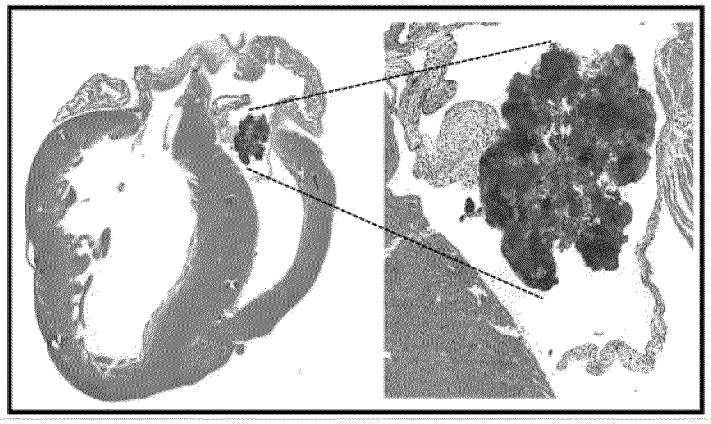


Фиг. 35B



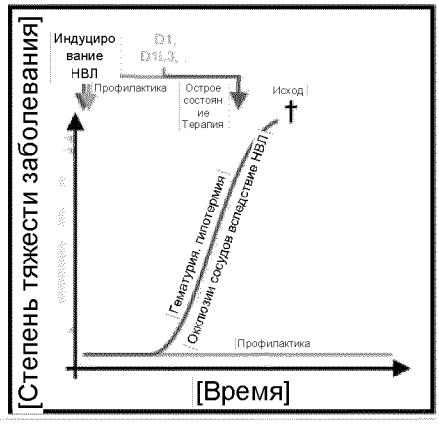
Фиг. 36A

Сгусток НВЛ в камере сердца

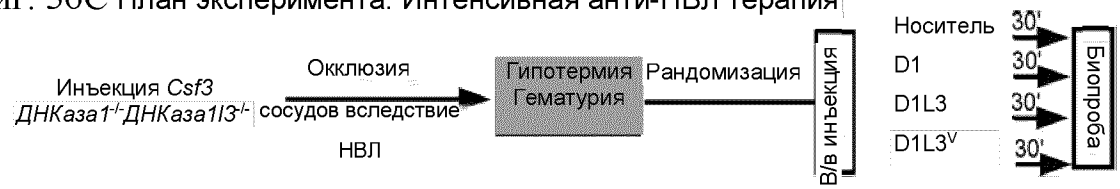


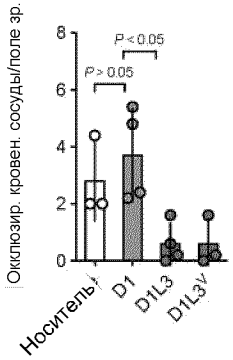
Фиг. 36B

Опосредованная НВЛ смерть

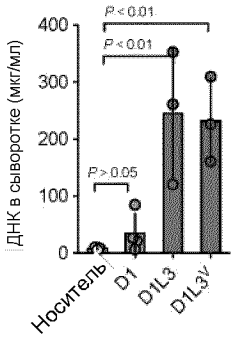


Фиг. 36C План эксперимента: Интенсивная анти-НВЛ терапия

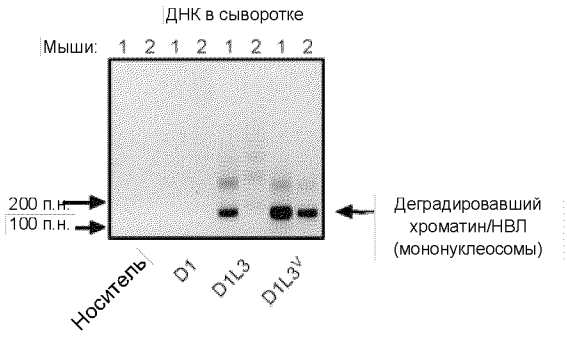




Фиг. 36D

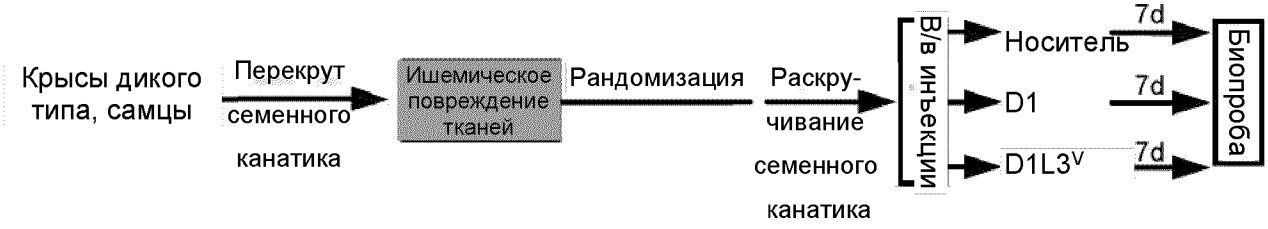


Фиг. 36E

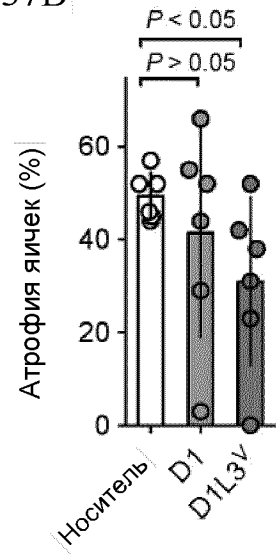


Фиг. 36F

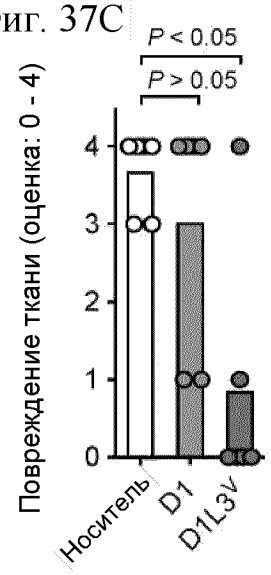
Фиг. 37A План эксперимента: Лечение ишемически-реперфузионного повреждения

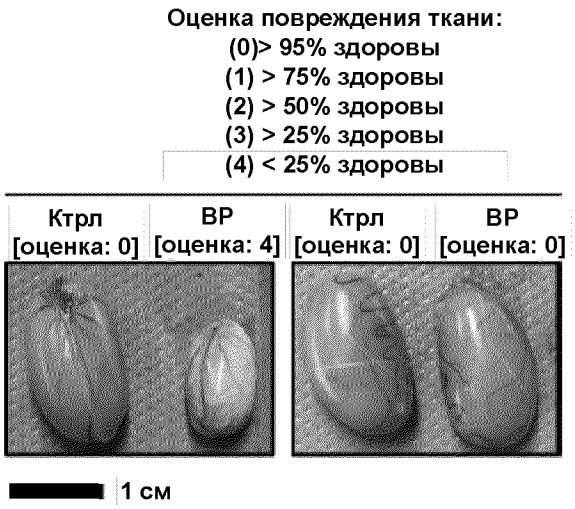


Фиг. 37B

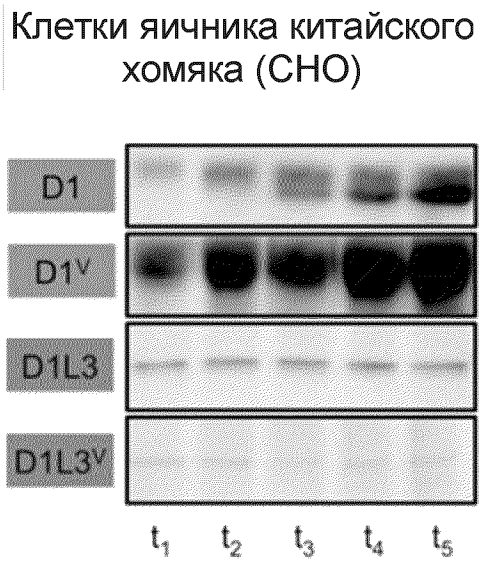


Фиг. 37C

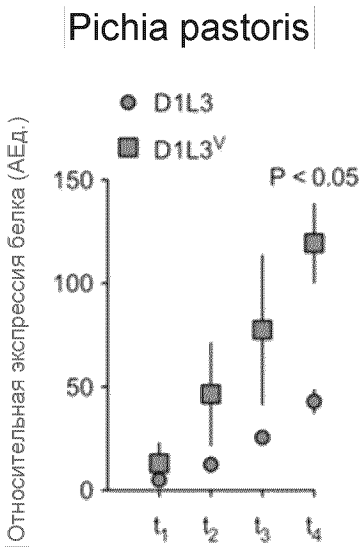




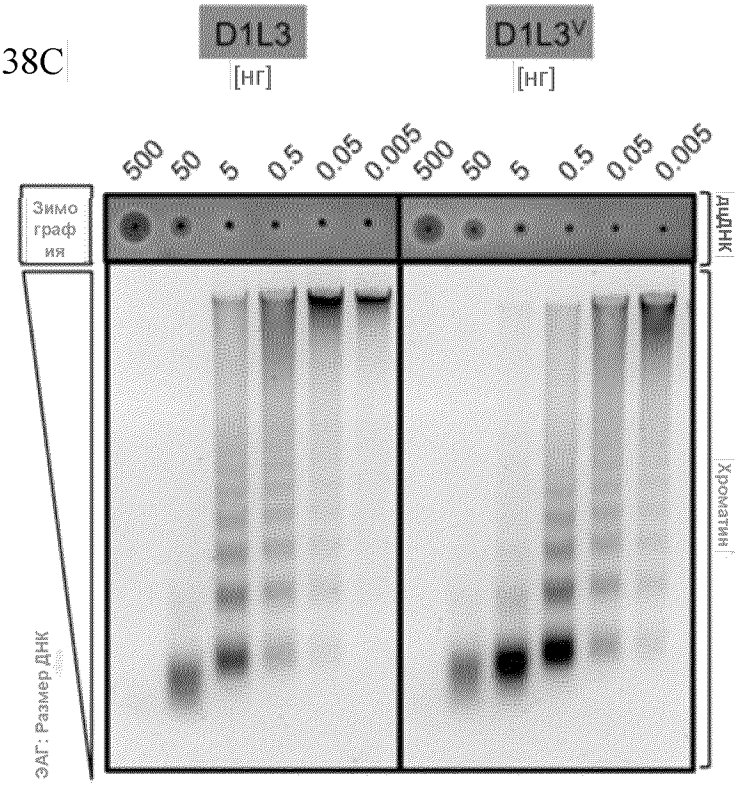
Фиг. 38A



Фиг. 38B



Фиг. 38C



ФИГ. 39

SEQ ID NO	Описание	Мутация (Зрелый белок без сигнального пептида)	Конструирование структурных блоков	Родительская SEQ ID NO
5	Вариант ДНКазы1	**Q31R/Q49K/Q79K/W209K** (Q9R/Q27K/Q57K/W187K)	-	1
6	Вариант ДНКазы1	**Q31R/Q49K/Q79K/Q177K/W209K/G262K** (Q9R/Q27K/Q57K/Q155K/W187K/G240K)	-	1
7	Вариант ДНКазы1	**Q31R/A136F/T227K** (Q9R/A114F/T205K)	-	1
9	Вариант ДНКазы1	**A136F/A164K** (A114F/A142K)	-	1
10	Вариант ДНКазы1	**Q79_T84delinsRNSRRGIT** (Q57_T62delinsRNSRRGIT)	+ (BB_{11})	1
11	Вариант ДНКазы1	**H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR** (H64N/V66_V67delinsVI/E69_P70delinsSR)	+ (BB_{12-14})	1
12	Вариант ДНКазы1	**A136_I137delinsFV** (A114_I115delinsFV)	+ (BB_{26})	1
13	Вариант ДНКазы1	**R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/ P219G/S221_A222delinsQE** (R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKN/W187R/S189D/T191R/Q193V/ P197G/S199_A200delinsQE)	+ (BB_{41-48})	1
14	Вариант ДНКазы1	**A226_P228delinsVKKS** (A204_P206delinsVKKS)	+ (BB_{49})	1
15	Вариант ДНКазы1	**Q79_T84delinsRNSRRGIT/H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR/ A136_I137delinsFV/ R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/ T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE/A226_P228delinsVKKS** (Q57_T62delinsRNSRRGIT/H64N/V66_V67delinsVI/E69_P70delinsSR/ A114_I115delinsFV/R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKN/W187R/S189D/ T191R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE/ A204_P206delinsVKKS)	+ (BB_{11}, BB_{12-14}, BB_{26}, BB_{41-48}, BB_{49})	1
17	Вариант ДНКазы1L3	**F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK** (F255Y/F259_K260delinsVM/Q262_S285delinsK)	+ (BB_{60-62})	2
19	Вариант ДНКазы1L3	**Q36_I45delinsMSNATLVSYI** (Q16_I25delinsMSNATLVSYI)	+ (BB_{4})	2
20	Вариант ДНКазы1L3	**Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N** (Y102_A107delinsGCEPCGN/V109T/S111N)	+ (BB_{23-25})	2