

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 982**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2018** **PCT/US2018/047084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2019** **WO19036719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2018** **E 18846060 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3668972**

54 Título: **Enzimas Dnasa de ingeniería y uso en terapia**

30 Prioridad:

18.08.2017 US 201762547220 P
28.12.2017 US 201762611166 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

NEUTROLIS, INC. (100.00%)
1 Broadway
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

FUCHS, TOBIAS A.;
JIMÉNEZ-ALCÁZAR, MIGUEL;
GÖBEL, JOSEPHINE (FORMERLY BITTERLING,
JOSEPHINE) y
ENGLERT, HANNA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 008 982 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enzimas Dnasa de ingeniería y uso en terapia

Prioridad

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de, y la prioridad a, Solicitud estadounidense Núm. 62/611,166 presentada el 28 de diciembre de 2017 y 62/547,220 presentada el 18 de agosto de 2017.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación es una respuesta esencial del huésped para controlar los microbios invasores y curar los tejidos dañados. La inflamación incontrolada y persistente causa lesiones tisulares en una plétora de trastornos inflamatorios. Los neutrófilos son los leucocitos predominantes en la inflamación aguda. Durante las infecciones, los neutrófilos generan trampas extracelulares de neutrófilos (TEN), entramados de filamentos de ADN decorados con histonas tóxicas y enzimas que inmovilizan y neutralizan las bacterias. La importancia de las TEN en la defensa del huésped queda ilustrada por el hecho de que las DNAsas extracelulares sirven como factores de virulencia en varias bacterias patógenas. Sin embargo, las TEN liberadas de forma inapropiada pueden dañar a las células del huésped debido a su actividad citotóxica, proinflamatoria y protrombótica. De hecho, las TEN se asocian con frecuencia a lesiones inflamatorias o isquémicas de órganos y la infusión terapéutica de DNAsas limita las lesiones del huésped en diversos modelos animales.

15 La formación de trampas extracelulares (TE) no se limita a los neutrófilos, ya que otros leucocitos, a saber, monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos y mastocitos también liberan TE. Además, las células cancerosas, incluidas las de la leucemia promielocítica aguda (LPA), y las células endoteliales lesionadas pueden exponer filamentos de ADN, que tienen características similares a las de la TE.

20 No se conoce bien cómo el huésped degrada las TEN in vivo para limitar el daño tisular durante los episodios de inflamación. Se ha demostrado que la DNasa1 (D1) presente en el suero digiere el ADN de las TEN in vitro. Se han identificado otras DNAsas extracelulares, incluyendo la DNasa1-similar a 3 (D1L3) en circulación, que puede digerir la cromatina asociada a micropartículas extracelulares. Además, se demostró que la degradación de TENs mediada por DNasa1 alterada (Jiménez-Alcázar et al. (2015), Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 13(5):732-742.

25 D1 y D1L3 forman junto con DNasa1-similar a1 (D1L1) y DNasa1-similar a 2 (D1L2) la familia de proteínas DNasa1, un grupo de enzimas DNasa secretadas homólogas que se expresan en humanos y proporcionan fármacos candidatos para enfermedades asociadas a TEN. Sin embargo, las propiedades físicas, enzimáticas y farmacocinéticas de estas enzimas no son ideales para la terapia.

30 La presente divulgación proporciona DNAsas de ingeniería, incluyendo DNasa1-similar a 3 y DNasa1, para terapia, incluyendo para prevenir o tratar oclusiones vasculares que pueden resultar de la liberación de TENs durante episodios inflamatorios agudos.

Sumario de la invención

35 La invención se define por medio de las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación proporciona proteínas DNasa modificadas (incluyendo DNasa1-similar a 3 y DNasa1) que son útiles para tratar afecciones caracterizadas por la acumulación y/o liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (TEN). La divulgación proporciona composiciones y procedimientos para prevenir o tratar la oclusión vascular que implica TENs. Como se ha demostrado aquí, las TEN participan en un mecanismo no canónico de oclusión vascular, que no depende de la fibrina y las plaquetas.

40 La divulgación proporciona variantes de DNasa1 similar a 3 (D1L3) diseñadas para tener propiedades físicas, farmacodinámicas y/o enzimáticas más adecuadas para la terapia, por ejemplo, para reducir o prevenir la acumulación de TEN en un individuo. La enzima D1L3 puede tener ventajas en la fabricación, facilitando la producción de la enzima recombinante adecuada para su uso en terapia. La divulgación proporciona una variante recombinante de D1L3 que comprende una o más alteraciones aminoácidas que resultan en una o más glicosilaciones, inactivación de una señal de localización nuclear, y/o delección de toda o parte de una cola C-terminal.

45 La variante de proteína D1L3 puede tener mayor estabilidad proteica, mayor resistencia a la inhibición por proteasas, mayor biodisponibilidad, y sustancialmente la misma o mejor actividad degradadora de ADN y/o cromatina y/o TEN (in vitro o in vivo) en comparación con la proteína D1L3 de tipo salvaje. La variante D1L3 puede comprender una o más de las siguientes propiedades relativas a D1L3 de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO:2): la misma o sustancialmente la misma (o mayor) actividad de degradación de ADN libre de proteína (ADN desnudo), a misma (o mayor) actividad de degradación de ADN cromosómico (cromatina), resistencia proteasa, una semivida circulatoria elevada, y altos niveles de producción con sistemas de expresión in vitro (por ejemplo, células de ovario de hámster chino y/o *Pichia pastoris*).

La variante D1L3 puede incluir una o una pluralidad de sustituciones en bloque de DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1), descritas en la presente memoria descriptiva como sustituciones de bloques de construcción.

La divulgación proporciona variantes de DNasa1 (D1) diseñadas para tener propiedades físicas, farmacodinámicas y/o enzimáticas más adecuadas para la terapia, por ejemplo, para reducir o prevenir la acumulación de TEN en un individuo. La enzima D1 puede tener ventajas en la fabricación, facilitando la producción de la enzima recombinante adecuada para su uso en terapia. La variante D1 de ingeniería puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la enzima madura de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, con una o más sustituciones, adiciones (incluyendo inserciones) o deleciones de aminoácidos que dan lugar a uno o más de un sitio de unión al ADN mutado, un sitio de unión a la cromatina mutado, un sitio de unión a la actina mutado, un sitio de glucosilación mutado, adición de una señal de localización nuclear (por ejemplo, que tenga similitud o identidad con SLN1 o SLN2 de D1L3), y/o un dominio C-terminal similar o idéntico a la cola C-terminal de D1L3.

La variante D1 puede diseñarse para que comprenda una o más de las siguientes características en relación con la enzima de tipo salvaje: la misma o mayor actividad de degradación de ADN libre de proteínas (ADN desnudo), mayor actividad de degradación de ADN cromosómico (cromatina), resistencia similar o mejorada a proteasas, resistencia a actina, penetración similar o mejorada de sangre a orina y/o bilis, y mayores niveles de producción en sistemas de expresión in vitro (por ejemplo, células de ovario de hámster chino y/o *Pichia pastoris*).

Las variantes de D1 descritas en la presente memoria descriptiva pueden tener una combinación de mutaciones puntuales, incluyendo adición de residuos catiónicos, y/o pueden comprender una o más sustituciones en bloque de D1L3 (SEQ ID NO:2). Dichas sustituciones de bloques se describen en la presente memoria descriptiva y se denominan "sustituciones de bloques de construcción".

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes D1L3 y/o D1, o polinucleótidos o vectores que codifican las mismas, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede formularse para administración parenteral o pulmonar. La composición puede formularse para administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intraarticular, intramuscular, tópica o subcutánea. La composición puede comprender tanto D1L3 como D1, cada una de las cuales es una variante de ingeniería opcional descrita en la presente memoria descriptiva. La composición puede comprender una proteína quimérica que contenga secuencias en bloque tanto de D1 como de D1L3. En la FIG. 31 se muestran ejemplos de sustituciones de bloques entre D1 y D1L3.

La divulgación proporciona un proceso para la ingeniería de enzimas DNasa, por medio de la producción de secuencias quiméricas. Por ejemplo, en estos aspectos el procedimiento comprende proporcionar una alineación proteína-proteína de las enzimas DNasa donante y receptora; identificar secuencias de aminoácidos variables para la transferencia ("Bloque de Construcción"). El aminoácido o aminoácidos variables están flanqueados por uno o más aminoácidos conservados en las enzimas DNasa donante y receptora (aguas arriba y aguas abajo del bloque de construcción). Estos componentes básicos pueden intercambiarse entre las proteínas receptoras y las donantes. La enzima quimérica se produce entonces de forma recombinante.

La divulgación proporciona un procedimiento de elaboración de una composición farmacéutica para reducir o prevenir la acumulación de trampas extracelulares de neutrófilos (TEN). El procedimiento emplea un ratón modificado genéticamente deficiente en la actividad D1 y D1L3, y la expresión heteróloga del polinucleótido G-CSF (por ejemplo, en células de hepatocitos) o la inducción de una expresión endógena sostenida de G-CSF (por ejemplo, por medio de la administración repetitiva de compuestos microbianos). Este modelo de ratón acumula TENs y desarrolla rápidamente oclusiones vasculares relacionadas con TEN. Por lo tanto, el procedimiento comprende administrar un inhibidor TEN candidato o una enzima DNasa candidata (incluida una variante D1L3 o D1 de acuerdo con la presente divulgación) al ratón modificado genéticamente, y seleccionar un inhibidor TEN o una enzima DNasa que reduzca la acumulación de TENs. El inhibidor o la enzima seleccionados se formulan para su administración a un paciente humano.

La divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un individuo que necesita degradación de la trampa extracelular de neutrófilos (TEN). El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un D1L3 y/o D1, y/o variantes del mismo de acuerdo con la presente divulgación. La variante D1L3 o D1 puede administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína recombinante, o el ADN o ARN codificante, o vectores que comprenden los mismos.

El procedimiento divulgado pertenece al tratamiento de enfermedades o afecciones caracterizadas por la presencia o acumulación de TENs. Tales enfermedades o afecciones incluyen, entre otras, enfermedades asociadas a la neutrofilia crónica (por ejemplo, un aumento del número de neutrófilos), agregación de neutrófilos y leucostasis, trombosis y oclusión vascular (por ejemplo, anemia falciforme), lesión por isquemia-reperfusión (por ejemplo, vólvulo del intestino medio, torsión testicular, isquemia-reperfusión de extremidades, isquemia-reperfusión vital), vólvulo intestinal medio, torsión testicular, isquemia-reperfusión de extremidades, isquemia-reperfusión de órganos vitales, trasplante de órganos), lesión tisular quirúrgica y traumática, una reacción o enfermedad inflamatoria aguda o crónica, una enfermedad autoinmune (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis reumatoide, vasculitis, esclerosis sistémica), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, aterosclerosis, tromboembolismo venoso, incluido el tratamiento trombolítico), enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes),

inflamación sistémica (por ejemplo, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), sepsis, shock séptico, coagulación intravascular diseminada (CID) y microangiopatía trombótica (MAT)), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), lesión pulmonar aguda (LPA), lesión pulmonar inducida por el humo, lesión pulmonar inducida por transfusión (TRALI), síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), y asma, atelectasia, bronquitis, empiema), enfermedades inflamatorias renales (enfermedades renales agudas y crónicas, incluida la lesión renal aguda (LRA) y la enfermedad renal crónica (ERC), enfermedades inflamatorias relacionadas con el tejido trasplantado (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped) y cáncer (por ejemplo, leucemia, metástasis tumoral y tumores sólidos).

El individuo puede tener o puede estar en riesgo de una oclusión ductal en un sistema ductal. Ejemplos no limitativos de un sistema ductal o de un órgano o tejido que contiene un sistema ductal incluyen el conducto biliar, el conducto lagrimal, el conducto galactóforo, el conducto cístico, el conducto hepático, el conducto eyaculador, el conducto parotídeo, el conducto submandibular, el conducto sublingual mayor, el conducto de Bartolino, el acueducto cerebral, el páncreas, la glándula mamaria, los conductos deferentes, el uréter, la vejiga urinaria, la vesícula biliar y el hígado. Como tales, las enzimas desveladas son útiles para tratar a un individuo que tiene pancreatitis, colangitis, conjuntivitis, mastitis, enfermedad del ojo seco, una obstrucción de los conductos deferentes, o enfermedad renal.

El individuo puede tener o puede estar en riesgo de que se acumulen TENs en superficies endoteliales (por ejemplo, adherencias quirúrgicas), la piel (por ejemplo, heridas/cicatrices, úlceras), o en articulaciones sinoviales (por ejemplo, gota, artritis). Por ejemplo, las TEN pueden contribuir a las adherencias quirúrgicas, por ejemplo, después de un procedimiento médico invasivo. Las enzimas desveladas pueden administrarse durante la cirugía para prevenir o inhibir la formación de adherencias quirúrgicas. En algunos casos, D1, D1L3 (incluyendo sus variantes), o la combinación de D1 y D1L3 (o sus variantes) como se describe en la presente memoria descriptiva pueden administrarse tópicamente a la piel para prevenir o tratar heridas y/o cicatrices. En otros casos, D1, D1L3, o variantes, o las combinaciones de los mismos como se describe en la presente memoria descriptiva se pueden administrar a las articulaciones sinoviales para prevenir o tratar la gota y la artritis.

El individuo puede tener o puede estar en riesgo de una oclusión vascular que comprende TENs.

El presente procedimiento pertenece al tratamiento de enfermedades tratables con la enzima DNasa, incluyendo D1 y estreptodornasa. Tales enfermedades o afecciones incluyen trombosis, accidente cerebrovascular, sepsis, lesión pulmonar, aterosclerosis, infección vírica, anemia falciforme, infarto de miocardio, infección de oído, cicatrización de heridas, lesión hepática, endocarditis, infección hepática, pancreatitis, disfunción primaria de injertos, isquemia reperfusion de extremidades, lesión renal, coagulación sanguínea, inflamación inducida por alumbre, lesión hepatorenal, exudados pleurales, hemotórax, coágulos sanguíneos intrabiliares, anemia postneumática, úlceras, afecciones otorrinolaringológicas, infecciones orales, heridas leves, sinusitis, rinoplastias postoperatorias, infertilidad, sonda vesical, limpieza de heridas, prueba de reacción cutánea, meningitis neumocócica, gota, úlceras de pierna, fibrosis quística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquitis crónica, bronquiectasias, lupus, disquinesia ciliar primaria, bronquiolitis, empiema, infecciones pleurales, cáncer, enfermedad de ojos secos, infecciones del tracto respiratorio inferior, hematomas crónicos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad pulmonar obstructiva.

La divulgación proporciona además un procedimiento para la producción recombinante de D1 o D1L3, o variantes de los mismos, mediante el uso de un sistema de expresión no mameliano, tal como *Pichia pastoris*. La *Pichia pastoris* puede codificar la enzima DNasa con el péptido señal nativo que permite la secreción a partir de las células huésped.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A - La FIG. 1F ilustran que la DNasa1 y la DNasa1I3 en circulación degradan TENs in vitro, y caracterizan la actividad degradadora de ADN de sueros de ratones WT, DNasa1^{-/-} (D1^{-/-}), DNasa1I3^{-/-} (D1L3^{-/-}), DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}). La FIG. 1A proporciona la detección de la actividad DNasa1 (D1), DNasa1I3 (D1L3) y DNasa total por medio de los ensayos zimográficos DPZ y SRED. La FIG. 1B proporciona imágenes y la FIG. 1C proporcionan la cuantificación de las tinciones de ADN de las TEN generadas in vitro tras la incubación con sueros de los genotipos indicados (N=6). Barra de escala: 50µm. La FIG. 1C muestra el análisis DPZ y SRED de sueros de ratones D1/D1L3^{-/-} que expresan de forma estable un plásmido con DNasa1 (D1), DNasa1I3 (D1L3) o un plásmido de control (Ctrl). La FIG. 1E muestra imágenes y la FIG. 1F muestra la cuantificación de la tinción de ADN de las TEN generadas in vitro tras la incubación con amortiguador o suero de ratones D1/D1L3^{-/-} que expresan D1, D1L3 o Ctrl (N=5). Barra de escala: 50µm. Las imágenes son representativas de dos o más experimentos independientes. Estadísticas: (FIG. 1C y FIG. 1F) ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; § P < 0,001 frente a todos los demás grupos.

La FIG. 2A- La FIG. 2I ilustran que se requiere DNasa1 o DNasa1I3 para tolerar la neutrofilia crónica. La neutrofilia crónica se indujo por medio de la inyección de un plásmido de expresión de G-CSF (CSF3). Los controles recibieron un plásmido vacío (Ctrl). La FIG. 2A muestra el recuento de neutrófilos en sangre de ratones WT y controles después de 2 semanas (N=3-6). La FIG. 2B muestra estructuras similares a TEN (flecha) en tinciones de ADN de frotis sanguíneos de ratones WT después de 1 semana (N=3). Barra de escala: 20µm. La FIG. 2C muestra la supervivencia

de ratones WT (N=7), DNasa1^{-/-} (D1^{-/-}, N=6), DNasa1I3^{-/-} (D1L3^{-/-}, N=6), DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}, N=6) y controles (Ctrl, N=4). La FIG. 2D muestra la supervivencia de los ratones D1/D1L3^{-/-} que coexpresan CSF3 con DNasa1 (CSF3/D1, N=5), DNasa1I3 (CSF3/D1L3, N=6) y controles (CSF3/Ctrl, N=4). FIGS. 2E-2I caracteriza la mortalidad durante la neutrofilia crónica (N= 4). La FIG. 2E muestra el cambio en la temperatura corporal periférica. La FIG. 2F proporciona fotografías de plasma y orina. La FIG. 2G proporciona la concentración de hemoglobina en sangre. La FIG. 2H proporciona imágenes de frotis sanguíneos. Las flechas señalan los esquistocitos. Barra de escala: 20µm. La FIG. 2I muestra la concentración de LDH en plasma. NT: ratones no tratados (N=5-6). Las imágenes son representativas de tres o más ratones. Estadísticas: (FIGS. 2A, 2H, 2I) unidireccional y (FIG. 2E) ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni, (FIG. 2B) prueba t de Student, (FIGS. 2C, 2D) Prueba de intervalos logarítmicos; # P < 0,01, § P < 0,001 frente a todos los demás grupos o el valor basal (VB).

La FIG. 3A - La FIG. 3G ilustran que la DNasa1 y la DNasa1I3 previenen la oclusión vascular por coágulos TEN durante la neutrofilia crónica. Análisis histológico de ratones DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}) que coexpresan CSF3 con DNasa1 (CSF3/D1, N=4), DNasa1I3 (CSF3/D1L3, N=4) o un plásmido de control (CSF3/Ctrl, N=4). La FIG. 3A presenta tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) de los pulmones. Barras de escala: 500 µm (vista general), 25 µm (detalle). La FIG. 3B muestra la cuantificación de vasos sanguíneos en pulmones ocluidos por coágulos positivos a la hematoxilina por campo de visión (CDV). Ratones WT no tratados (NTWT, N=4), ratones D1/D1L3^{-/-} no tratados (NT; N=4). La FIG. 3C muestra la inmunotinción de los vasos sanguíneos ocluidos para el marcador de neutrófilos mieloperoxidasa (MPO) y la cromatina. Las FIGS. 3D y 3E muestran inmunotinción para el factor von Willebrand (FvW), fibrina y ADN. Se detectaron tres tipos de coágulos TEN (α, FvW+/fibrina-; β, FvW+/fibrina+; γ, FvW-/fibrina-). La FIG. 3F proporciona la cuantificación de FvW y fibrina en los coágulos TEN. Los datos se muestran como media±DE, n = 108. La FIG. 3G muestra la supervivencia de los ratones D1/D1L3^{-/-} que expresan CSF3 tratados con IgG (N=4), antiplaquetarios-IgG (N=5) y dabigatrán (N=5). Barras de escala: 50µm. Las imágenes son representativas de tres o más ratones. (FIGS. 3C, 3D, 3E) la línea de puntos indica la pared del vaso. Estadísticas: (FIG. 3B) ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; § P < 0,001 frente a todos los demás grupos, (FIG. 3G) Prueba de intervalos logarítmicos; P > 0,05 Anti-Platelet-IgG o Dabigatran frente a IgG.

La FIG. 4A - La FIG. 4I ilustran que la DNasa1 y la DNasa1I3 protegen contra las lesiones del huésped en la septicemia. Los ratones WT (N=5) y los ratones con una deficiencia combinada de DNasa1 y DNasa1I3 (D1/D1L3^{-/-}) que expresan DNasa1 (D1, N=7), DNasa1I3 (D1L3, N=8) o un plásmido de control (Ctrl, N=11) fueron tratados con lipopolisacárido y *E. coli* muerto por calor para inducir septicemia. La FIG. 4A muestra el tiempo de supervivencia de los ratones sépticos. La FIG. 4B muestra la concentración de hemoglobina en sangre. La FIG. 4C muestra fotografías de plasma y orina. La FIG. 4D proporciona la concentración de LDH en plasma. La FIG. 4E muestra la cuantificación de esquistocitos en sangre por campo de visión (CDV). La FIG. 4F muestra la cuantificación de los vasos sanguíneos ocluidos en los pulmones por CDV. La FIG. 4G muestra tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) de los pulmones. Las puntas de flecha señalan los vasos sanguíneos ocluidos. Barras de escala: 500µm. Las FIGS. 4H y 4I muestran tinciones de H&E de vasos sanguíneos parcial y totalmente ocluidos. Las flechas señalan las TEN que cubren el espacio intercelular. Los insertos son resúmenes. Barras de escala: 50µm. Estadísticas: (La FIG. 4A) Prueba de intervalos logarítmicos; # P < 0,01 frente a todos los demás grupos, (FIGS. 4B-4F) ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; § P < 0,001, # P < 0,01.

La FIG. 5A - La FIG. 5E muestran un modelo murino de neutrofilia crónica. Se inyectó a ratones WT de cuatro semanas de edad un plásmido de expresión de CSF3 (CSF3) o un plásmido de control vacío (Ctrl). La FIG. 5A muestra los niveles de G-CSF en plasma (N=3-6). VB: valor basal, antes de la inyección; Ctrl: ratones que expresan el plásmido de control sin CSF3 durante 2 semanas (N=4-5). La FIG. 5B muestra la inmunotinción para la elastasa de neutrófilos de pulmones, riñones e hígados. Barras de escala: 200µm. La FIG. 5C muestra fotografías y pesos de bazo (N=5-6). Barra de escala: 1 cm. FIG. 5D muestra el peso corporal de los ratones en los momentos indicados (N=3-5). La FIG. 5E muestra los recuentos de neutrófilos en sangre total y los niveles plasmáticos de ALT, AST, NUS y creatinina 2 semanas después de la inyección. Las imágenes son representativas de tres o más ratones. Estadísticas: (Las FIGS. 5A, 5C) unidireccional y (la FIG. 5D) ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni, y (FIG. 5E) Prueba t de Student; # P < 0,01, § P < 0,001 frente a (FIG. 5A) VB, o (FIG. 5C) NT.

La FIG. 6A - La FIG. 6D muestran que la DNasa1 y la DNasa1I3 previenen la formación de coágulos TEN y la lesión de órganos en hígado y riñones durante la neutrofilia crónica. Análisis de ratones DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}) coexpresando CSF3 un plásmido de control (CSF3/Ctrl, N=4), con DNasa1 (CSF3/D1, N=4), o con DNasa1I3 (CSF3/D1L3, N=4). Los controles incluyen ratones WT no tratados (NTWT, N=4) y ratones D1/D1L3^{-/-} no tratados (NT; N=4). La FIG. 6A muestra los niveles plasmáticos de alanina y aspartato aminotransferasas (ALT, AST). La FIG. 6B muestra los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y creatinina. La FIG. 6C proporciona la cuantificación de coágulos intravasculares ricos en hematoxilina en hígados por sección y en riñones por campo de visión (CDV). La FIG. 6D proporciona tinciones de H&E de hígados y riñones. Barras de escala: 500 µm (vista general), 50 µm (detalle). Las imágenes son representativas de tres o más ratones. Estadísticas: (FIGS. 6A, 6B, 6C) ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; # P < 0,01, § P < 0,001 frente a todos los demás grupos.

La FIG. 7A-FIG. 7C muestran que los coágulos positivos a la hematoxilina están compuestos por TENs. Análisis de pulmones de ratones DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}) con neutrofilia crónica (D1/D1L3^{-/-} + CSF3/Ctrl) mostrados en las FIGS. 3A-3G. La FIG. 7A proporciona tinciones con hematoxilina y eosina (H&E), para ADN y para cromatina de

secciones pulmonares consecutivas. Barras de escala: 200µm. La FIG. 7B proporciona inmunotinción del vaso sanguíneo ocluido para cromatina, PARC (péptido antimicrobiano relacionado con la catelina) y ADN. Barras de escala: 50µm. La FIG. 7C muestra la inmunotinción del vaso sanguíneo ocluido para la cromatina, la histona 3 citrulinada (citH3) y el ADN. Barras de escala: 50µm. Las imágenes son representativas de tres o más ratones.

La FIG. 8A y la FIG. 8B demuestran que las TEN humanas forman coágulos in vitro. La FIG. 8A muestra una fotografía de un coágulo TEN (flecha) generado in vitro por neutrófilos humanos activados por PMA. Los neutrófilos no tratados (NT) o activados en presencia de DNasa1 humana recombinante (PMA + D1) sirvieron de control. Barras de escala: 5 mm. FIG. 8B muestra tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) e inmunotinción para cromatina y el marcador de neutrófilos mieloperoxidasa (MPO) de coágulos TEN generados in vitro. Barras de escala: 200µm. Las imágenes son representativas de tres o más experimentos independientes.

La FIG. 9A y la FIG. 9B muestran que la degradación de TEN se correlaciona con la actividad de la enfermedad en STEC-HUS. La FIG. 9A muestra imágenes y FIG. 9B muestra la cuantificación de la tinción de ADN de las TEN generadas in vitro tras la incubación con amortiguador, plasma de donantes sanos normales (N=7), o plasma recogido en el estado agudo de la enfermedad (Acute) y en remisión (Rem.) de 11 pacientes con SHU-STEC. Barra de escala: 50µm. Estadísticas: ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; § P < 0,001 frente a todos los demás grupos.

La FIG. 10 proporciona una tabla de descripciones de tejidos humanos de varios pacientes examinados, como el número de paciente, la causa de la muerte indicada en el informe de la autopsia (SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda). Sexo y edad del paciente. Tipo de tejido analizado. Los tejidos se analizaron por medio de un procedimiento de tres etapas: en primer lugar, identificación de coágulos/agregados ricos en hematoxilina en tinciones de hematoxilina y eosina; en segundo lugar, identificación de TEN en coágulos ricos en hematoxilina por medio de inmunotinción para cromatina y mieloperoxidasa (MPO); en tercer lugar, identificación de la localización de los coágulos TEN en la arquitectura pulmonar.

La FIG. 11A - La FIG. 11D muestran que las TEN humanas forman coágulos in situ. Tejido pulmonar recogido en la autopsia de dos pacientes con sepsis (pacientes Núm. 6 y Núm. 7 de la FIG. 10). La FIG. 11A muestra la tinción H&E de dos coágulos intravasculares ricos en hematoxilina en tejido pulmonar del paciente Núm. 6. La FIG. 11B muestra inmunotinción de sección consecutiva para cromatina y mieloperoxidasa (MPO) del vaso sanguíneo izquierdo mostrado en el panel A. FIG. 11C muestra un vaso sanguíneo teñido con H&E en el tejido pulmonar del paciente Núm. 7 que muestra coágulos intravasculares ricos en hematoxilina. La FIG. 11D muestra inmunotinción de sección consecutiva para cromatina y MPO. Las flechas señalan los coágulos de TENs. Barra de escala: 50µm.

La FIG. 12 muestra que los coágulos TEN ocluyen los vasos sanguíneos en ratones sépticos. Inmunotinción de vasos sanguíneos completamente ocluidos en ratones DNasa1/DNasa1l3-/- sépticos para ADN, cromatina y mieloperoxidasa (MPO). Las tinciones de ADN y cromatina de las TEN (flechas) aparecen más tenues que las tinciones nucleares (asteriscos) y cubren el espacio intercelular. Barras de escala: 10µm.

La FIG. 13A - La FIG. 13F muestra que DNasa1 y DNasa1l3 degradan TENs por mecanismos distintos. La FIG. 13A proporciona tinciones de ADN de TENs fijadas con PFA generadas in vitro tras incubación con sueros de ratones WT, DNasa1-/- (D1-/-), DNasa1l3-/- (D1L3-/-), DNasa1/DNasa1l3-/- (D1/D1L3-/-). Los datos son representativos de ≥3 experimentos independientes. Barra de escala: 50µm. La FIG. 13B muestra la concentración de fragmentos de ADN libre de células liberados de TENs fijadas con PFA tras la incubación con sueros de ratones WT, D1-/-, D1L3-/- y D1/D1L3-/- . La FIG. 13C muestra tinciones de ADN de TENs no fijadas generadas in vitro tras incubación con vehículo, DNasa1 murina recombinante (rmD1) o DNasa1l3 murina recombinante (rmD1L3). La FIG. 13D muestra la concentración de fragmentos de ADN libre de células liberados de TENs no fijadas generadas in vitro tras incubación con vehículo, rmD1 o rmD1L3. La FIG. 13E muestra tinciones de ADN de TENs fijadas con PFA generadas in vitro tras incubación con vehículo, rmD1 o rmD1L3. La FIG. 13F muestra la concentración de fragmentos de ADN libre de células liberados de TENs fijados con PFA generados in vitro tras la incubación con vehículo, rmD1 o rmD1L3. Estadísticas por medio de ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni; § P < 0,0001.

La FIG. 14A - La FIG. 14G proporcionan actividad DNasa1 y DNasa1l3 en la circulación de humanos y ratones. La FIG. 14A - La FIG. 14E muestran la actividad DNasa en plasma humano y murino cuantificada por SRED. La FIG. 14A ilustra que la suplementación de plasma de donantes sanos normales (DSN) con anticuerpos policlonales contra la DNasa1 humana (α-hDNasa1), pero no con IgG, bloquea la actividad degradadora del ADN de forma dependiente de la concentración (*: p < 0,05 frente a IgG). La FIG. 14B muestra el plasma suplementado con 200 µg/ml de α-hDNasa1 y la heparina, un inhibidor de la DNasa1l3, bloquea la actividad DNasa residual en el plasma suplementado con 200 µg/ml de α-hDNasa1 (*: p < 0,05 frente a DSN). La FIG. 14C-FIG. 14E proporcionan una comparación de la actividad DNasa en diluciones seriadas de plasma de ratones y DSN. La FIG. 14C ilustra que la actividad DNasa total de los ratones WT es aproximadamente 10 veces mayor que en los DSN. La FIG. 14D muestra que la actividad DNasa1 en el plasma de ratones DNasa1l3-/- es aproximadamente 10 veces superior a la del plasma humano suplementado con 500 µg/ml de heparina. (E La actividad DNasa1l3 en plasma de ratones DNasa1-/- es aproximadamente 10 veces superior a la del plasma humano suplementado con 200 µg/ml de α-hDNasa1. (F, G) La degradación in vitro de TEN se ilustra en la FIG. 14F y la FIG. 14G. La FIG. 14F muestra neutrófilos activados incubados con plasma de DSN solo

o suplementado con 200 µg/ml de α-hDNasa1, plasma de pacientes con MAT y plasma de ratones WT, DNasa1^{-/-} y DKO (barras de escala: 200 µm). La FIG. 14G muestra el ADN libre de células en sobrenadantes de neutrófilos activados incubados con plasma de las fuentes indicadas (§: p < 0,001 frente a DSN). La degradación in vitro de TEN por el plasma humano depende de la DNasa1, ya que la DNasa1I3 del plasma humano no es suficiente para degradar TEN.

La FIG. 15A - La FIG. 15C muestran un curso letal de neutrofilia crónica en una cepa alternativa de ratones DNasa1/DNasa1I3^{-/-}. Se cruzó una cepa alternativa de ratones DNasa1^{-/-} (véanse los Procedimientos del Ejemplo 1) con ratones DNasa1I3^{-/-} para generar ratones con una deficiencia combinada. La FIG. 15A proporciona curvas de supervivencia de neutrofilia en ratones WT (N=9), DNasa1^{-/-} (D1^{-/-}, N=5) y DNasa1/DNasa1I3^{-/-} (D1/D1L3^{-/-}, N=5). La neutrofilia crónica se indujo por medio de la inyección de un plásmido de expresión de CSF3 (CSF3). La FIG. 15B proporciona tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) de secciones pulmonares. La flecha señala los coágulos positivos a la hematoxilina en los ratones D1/D1L3^{-/-}. Barra de escala: 500µm. La FIG. 15C muestra la supervivencia de los ratones D1/D1L3^{-/-} que coexpresan CSF3 con un plásmido de control (CSF3/Ctrl, N=6), con DNasa1 (CSF3/D1, N=5) o con DNasa1I3 (CSF3/D1L3, N=6). Estadísticas: Prueba de intervalos logarítmicos; § P < 0,001.

La FIG. 16A - La FIG. 16B muestran el enfoque de cribado para identificar variantes hiperactivas de DNasa1 y DNasa1L3 in vitro. La FIG. 16A muestra una biblioteca de DNasas que incluye DNasa1L3 de tipo salvaje (I, D1L3), DNasa1 de tipo salvaje (II, D1) y variantes de las mismas. Las variantes D1 y D1L3 se diseñaron transfiriendo aminoácidos de D1L3 a D1 (III, D1^V) y de D1 a D1L3 (IV, D1L3^V). La actividad DNasa se probó mediante el uso de como sustrato la degradación de ADN de alto peso molecular (APM), dsADN y cromatina. En la FIG. 16B, la zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN como círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, D1, 0,0005 ng). D1 degrada el dsADN aproximadamente 100 veces más eficientemente que D1L3. La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. D1L3 degrada la cromatina aproximadamente 100 veces más eficientemente que D1. En una proporción de 10:1 o 1:1 (m/m), D1 y D1L3 muestran efectos sinérgicos en la degradación de la cromatina.

La FIG. 17 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1) y DNasa1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Se destacan el péptido señal, los aminoácidos conservados, los residuos adicionales de arginina y lisina en regiones variables de D1L3 y la cola C-terminal de D1L3. Las reglas de secuencia indican la posición de los aminoácidos.

La FIG. 18 muestra una lista de residuos de arginina y lisina que sólo están presentes en DNasa1L3. Se indica el aminoácido correspondiente en la DNasa1 y la sustitución de aminoácidos en la DNasa1. Los números entre paréntesis corresponden a la posición de los aminoácidos en la proteína madura sin péptido señal. Los residuos de arginina y lisina que se encuentran en la cola C-terminal de D1L3 se muestran en los carriles 29-37. Esta aplicación probó 22 de las 37 variantes posibles de DNasa1.

La FIG. 19 muestra la caracterización de las variantes de DNasa1 con sustituciones únicas de aminoácidos arginina y lisina enumeradas en la FIG. 18. La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. Las sustituciones de aminoácidos que provocan un aumento de la actividad degradadora de la cromatina aparecen resaltadas en azul. Las muestras sin tal efecto se muestran en azul claro.

La FIG. 20 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1), DNasa1 de ratón (SEQ ID NO: 3), DNasa1 de rata (SEQ ID NO: 4), y DNasa1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Las reglas de secuencia indican la posición de los aminoácidos. Los péptidos señal están resaltados en gris. Residuos de aminoácidos catiónicos (arginina: R, lisina: K) que están presentes en la DNasa1 de ratón/rata y en la DNasa1L3 humana, pero no en la DNasa1 humana. Cuatro de estos residuos R/K se muestran en la DNasa1 de ratón (Q31R, Q49K, Q79R, W209R). La DNasa1 de rata contiene dos residuos R/K adicionales (Q177K, G262K).

La FIG. 21A - La FIG. 21B muestra una comparación entre la DNasa1 murina y la humana. (FIG. 21A) La zimografía muestra la actividad degradadora del dsADN como círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, Ctrl). La DNasa1 murina (mD1) y la DNasa1 humana (D1) muestran niveles similares de actividad degradadora del dsADN. La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. La DNasa1 murina (mD1) muestra más actividad degradadora de la cromatina que la DNasa1 humana (D1). (FIG. 21B) La terapia génica con DNasa1 humana proporciona sólo una protección parcial frente a la oclusión vascular letal por TENs. La neutrofilia crónica con concomitante TEN-formación intravascular fue inducida como por la expresión hepática de *Csf3*, que codifica con G-CSF. Los datos muestran la curva de supervivencia de *Csf3* que expresan ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}*. Se inyectaron animales con *Csf3* y un

vector de control vacío (*Ctrl*, N = 6), con una mezcla de *Csf3* y DNasa1 humano (*hDnasa1*, N = 12), y con *Csf3* y DNasa1 murina (*mDnasa1*, N = 5). Los valores *P* se calcularon por medio de la prueba de intervalos logarítmicos.

La FIG. 22A - La FIG. 22B muestra la caracterización de variantes de DNasa1 humana similares a roedores in vivo e in vitro. (FIG. 20A) La terapia génica con variantes de DNasa1 similares a roedores proporciona una protección completa frente a la oclusión vascular letal por TENs. La neutrofilia crónica con concomitante TEN-formación intravascular fue inducida como por la expresión hepática de *Csf3*, que codifica con G-CSF. Los datos muestran la curva de supervivencia de *Csf3* que expresan ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}*. Se inyectaron animales con *Csf3* y un vector de control vacío (*Ctrl*, N = 6), con una mezcla de *Csf3* y DNasa1 humana (*hDnasa1*, N = 12) como se muestra en la FIG. 21. Un tercer grupo de ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}* recibieron una inyección con *Csf3* y el gen que codifica con DNasa1-variante similar a la murina, que contiene 4 mutaciones de aminoácidos Q31R/Q49K/Q79R/W209R (*Q31R/Q49K/Q79R/W209R*, N = 6). Un cuarto grupo de ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}* recibieron una inyección con *Csf3* y el gen que codifica con DNasa1-variante similar a la rata, que contiene 6 mutaciones aminoácidas Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, and G262K (*Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K*, N = 6). Los valores *P* se calcularon por medio de la prueba de intervalos logarítmicos. (FIG. 22B) La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, *Ctrl*). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. La variante murina de la DNasa1 humana (*Q31R/Q49K/Q79R/W209R*) y la variante rata de la DNasa1 humana (*Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K*) muestran una actividad de degradación del dsADN similar pero mayor que la DNasa1 humana de tipo salvaje.

La FIG. 23 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (D1, SEQ ID NO: 1) y DNasa1L3 humana (D1L3, SEQ ID NO: 2). Las reglas de secuencia marcan las posiciones de los aminoácidos. Se destacan los aminoácidos de D1 con mutaciones publicadas. La D1L3 humana contiene tres mutaciones que están asociadas con una ganancia de función en la DNasa1 humana (*Q31R/T227K/A136F*) y cuatro mutaciones que no están relacionadas con un aumento de la actividad.

Las FIGS. 24A-24B muestran la caracterización de variantes de DNasa1 (*D1^V*) con las mutaciones Q31R, T227K, y/o A136F. (FIG. 24A) Se analizaron sobrenadantes de cultivo de células HEK293 transfectadas. Las células REH transfectadas con DNasa1 de tipo salvaje (*D1*) y DNasa1L3 (*D1L3*) sirvieron de control. La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, *Ctrl*). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. La *D1^V* que presenta tres mutaciones aminoácidas Q31R/T227K/A136F tiene una actividad degradadora de dsADN similar, pero una mayor capacidad para degradar cromatina que la *D1* y la *D1^V* que presentan Q31R, T227K, A136F, o Q31R/T227K. (FIG. 24B) La terapia génica con un *D1^V* hiperactivo proporciona una protección parcial completa frente a la oclusión vascular letal por TENs. La neutrofilia crónica con concomitante TEN-formación intravascular fue inducida como por la expresión hepática de *Csf3*, que codifica con G-CSF. Los datos muestran la curva de supervivencia de *Csf3* que expresan ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}*. Se inyectaron animales con *Csf3* y un vector de control vacío (*Ctrl*, N = 6), con una mezcla de *Csf3* y DNasa1 humana (*hDnasa1*, N = 12) como se muestra en la FIG. 21. Además, un grupo de ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1I3^{-/-}* recibieron una inyección con *Csf3* y el gen que codifica con una DNasa1-variante humana, que contiene la triple mutación aminoácida Q31R/T227K/A136F (*Q31R/T227K/A136F*, N = 6). Los valores *P* se calcularon por medio de la prueba de intervalos logarítmicos.

La FIG. 25 muestra una comparación de la DNasa1 de tipo salvaje (*D1*) y las DNasa1-variantes (*D1^V*) que presentan las mutaciones Q31R/T227K/A136F. Las proteínas purificadas se analizaron en las cantidades indicadas. La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, 0 ng). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. La DNasa1-variante que presenta las mutaciones Q31R/T227K/A136F degrada la cromatina aproximadamente 10-20 veces más eficientemente que la DNasa 1 de tipo salvaje.

La FIG. 26 muestra una comparación de las variantes de DNasa1 (*D1^V*) con las mutaciones de aminoácidos A164K, A136F y A164K/A136F con DNasa1 de tipo salvaje (*D1*) y de tipo salvaje (*D1L3*). Se analizaron los sobrenadantes de cultivo de las células REH transfectadas. La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, *Ctrl*). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. Las variantes de DNasa1 con A136F/A164K degradan la cromatina de la forma más eficiente.

La FIG. 27A - La FIG. 27B muestra el desarrollo de una variante de DNasa1 con la mutación A226_T227insK. (FIG. 26A) Alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1) y DNasa1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Las reglas de secuencia marcan las posiciones de los aminoácidos. Se destacan los residuos de arginina críticos en la DNasa1L3. Los aminoácidos compartidos entre la DNasa1 y la DNasa1L3 están resaltados y sirven como anclajes para sustituir la secuencia de aminoácidos ATP de la DNasa1 por la VKKS de la DNasa1L3. (FIG. 26B) La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, Ctrl). El gel se cargó con DNasa1 de tipo salvaje (D1), variantes de DNasa1 (D1^V) que presentan las mutaciones A226_T227insK, T227K, y A226_P228delinsVKKS. A226_T227insK, pero no A226_P228delinsVKKS, se asocia con una actividad degradadora de dsADN reducida.

La FIG. 28 muestra la estructura de la DNasa1 humana [4AWN]. Se destacan la lámina beta N-terminal y la lámina beta C-terminal y el motivo S272/D273/H274, que se conserva entre los miembros de la familia de la proteína D1.

La FIG. 29 muestra el concepto de ingeniería de bloques de construcción de proteínas homólogas. La tecnología transfiere aminoácidos variables únicos o múltiples, flanqueados por aminoácidos variables únicos o múltiples conservados, entre una proteína donante y una receptora.

La FIG. 30 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de DNasa1 y DNasa1L3 de ratón (SEQ ID NOS: 3 y 34), rata (SEQ ID NOS: 4 y 35), chimpancé (SEQ ID NOS: 36 y 37), y humano (SEQ ID NOS: 1 y 2). Se destacan el péptido señal N-terminal y los aminoácidos conservados. Los aminoácidos variables no están resaltados y sirven como bloques de construcción que pueden transferirse de DNasa1 a DNasa1L3 y viceversa. Abreviaturas: AA, aminoácido.

La FIG. 31A - La FIG. 31B muestran listas de Bloques de Construcción en DNasa1 humana (D1) y DNasa1L3 humana (D1L3). La FIG. 31A muestra aminoácidos conservados en D1 y D1L3, que sirven como anclajes N y C, respectivamente. Los bloques de construcción son aminoácidos variables en D1 y D1L3. Se muestran las mutaciones que transfieren bloques de construcción de D1L3 a D1. La FIG. 31B muestra los anclajes N y C en D1L3. Se enumeran las mutaciones que transfieren bloques de construcción de D1 a D1L3. AA: aminoácido.

La FIG. 32 muestra una aplicación de la ingeniería de bloques de construcción de proteínas homólogas. La aplicación utiliza como paso inicial de cribado la transferencia de grupos de bloques de construcción entre una proteína donante y una receptora homólogas. Otros pasos opcionales son la transferencia de bloques de construcción individuales, seguida de la transferencia de aminoácidos individuales. En un último paso (no mostrado), pueden combinarse múltiples aminoácidos, bloques de construcción y grupos de bloques de construcción para degenerar una enzima química.

La FIG. 33 muestra la caracterización de variantes de DNasa1 (D1^V) que presentan bloques de construcción de DNasa1L3 (D1L3). La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, Ctrl). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. Las sustituciones de bloques de construcción que provocan un aumento de la actividad degradadora de la cromatina se resaltan en sombra oscura. Las muestras sin este efecto aparecen en tono claro. Una variante de DNasa1 que presenta la combinación de los bloques 11, 12-14, 26, 41-48 y 49 muestra una actividad degradante de la cromatina similar a la DNasa1L3 de tipo salvaje.

La FIG. 34A - La FIG. 34B muestra el desarrollo de una variante de DNasa1L3 sin la cola C-terminal de DNasa1L3 de tipo salvaje. La FIG. 34A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1) y DNasa1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Las reglas de secuencia marcan las posiciones de los aminoácidos. La cola C-terminal de la DNasa1L3 está resaltada y su señal de localización nuclear está en recuadro. Se indican los aminoácidos compartidos entre la DNasa1 y la DNasa1L3. Los aminoácidos situados después del motivo conservado SDH se intercambiaron el grupo de bloques de construcción 60-62 entre DNasa1 y DNasa1L3. La FIG. 34B muestra la zimografía que muestra la actividad degradadora del dsADN como círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, Ctrl). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. Los geles se cargaron con DNasa1 de tipo salvaje (D1), DNasa1 variante (D1^V) que presenta el clúster BC 60-62 de D1, DNasa1L3 variante (D1L3^V) que presenta el clúster BC 60-62 de D1, y un D1L3^V con dos mutaciones (K301A, K303A) se hicieron para inactivar la SLN2. D1L3^V con el clúster BC 60-62 de D1 mostró una mayor actividad degradadora de cromatina en comparación con D1L3 de tipo salvaje.

La FIG. 35A - La FIG. 35B muestra el desarrollo de variantes glicosiladas de DNasa1L3 (D1L3^V). La FIG. 35A muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la DNasa1 humana (SEQ ID NO: 1) y DNasa1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Las reglas de secuencia marcan las posiciones de los aminoácidos. Se destacan los motivos de glicosilación

N40-X-T42 y N128-X-T130 de la DNasa1. Los emplazamientos forman parte del Bloque de Construcción (BC) 4 y del clúster de Bloque de Construcción (BC) 23-25. Se destacan los aminoácidos compartidos relevantes entre la DNasa1 y la DNasa1L3. (FIG. 35B) La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, Ctrl). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. Los geles se cargaron con la DNasa1L3 de tipo salvaje (D1L3), la variante de DNasa1L3 (D1L3^V) que presenta el BC 4 de D1, y la variante de DNasa1L3 (D1L3^V) que presenta el grupo BC 23-25 de D1. Un Western Blot (WB) con anticuerpos contra D1L3 detectó que D1L3^V mostraba mayores cantidades de proteínas de mayor tamaño. Ambas variantes glicosiladas de DNasa1L3 (D1L3^V) conservaron su capacidad de degradar la cromatina.

La FIG. 36A - La FIG. 36F muestra el efecto terapéutico de la DNasa1L3 (SEQ ID NO: 2) y una variante del mismo (SEQ ID NO: 17) contra las TEN in vivo. La FIG. 36A muestra una tinción H&E de un corazón de ratón con un coágulo denso y rico en hematoxilina de TENs dentro de una cámara cardíaca. La FIG. 36B muestra una línea temporal que comienza con la inducción de TENs y conduce a la oclusión vascular por TENs y a la muerte. La hematuria y la hipotermia son signos externos de coágulos TEN in vivo. (FIG. 36C) Esquema del diseño experimental: *Csf3* se expresó en *Dnasa1^{-/-}Dnasa1l3^{-/-}* para inducir coágulos vasculares de TENs. Los ratones que mostraron hematuria e hipotermia fueron aleatorizados por medio de una inyección de vehículo (N = 3), dornasa alfa (D1, N = 3), DNasa1L3 purificada (D1L3, N = 3), o una variante de DNasa1L3 purificada (SEQ ID NO: 17, D1L3^V, N = 3). Después de 30 minutos se recogieron los pulmones y el suero. La terapia con D1L3 o D1L3^V, pero no con solución salina o D1, redujo significativamente la oclusión vascular por TENs en pulmones (FIG. 36D) y aumentaron los niveles de ADN en suero (FIG. 36E). La FIG. 36F muestra oligo-nucleosomas en el suero de ratones que reciben la terapia D1L3. Los ratones que recibieron D1L3^V mostraron mono- y di-nucleosomas más pequeños. Los aislamientos de ADN del suero de los ratones que recibieron la terapia D1 mostraron manchas tenues de ADN de diversos tamaños, mientras que no se pudo aislar ADN del suero de los ratones inyectados con vehículo.

La FIG. 37A - La FIG. 37C muestra el efecto terapéutico de una variante de DNasa1L3 (SEQ ID NO: 17) en un modelo de lesión por isquemia-reperfusión (IR) en ratas. (FIG. 37A) Esquema del diseño experimental: Se sometió a torsión testicular un testículo de ratas macho de tipo salvaje. El procedimiento provoca una lesión tisular isquémica. Los ratones fueron aleatorizados. Se realizó una destorsión del testículo, seguida de una inyección de vehículo (N = 6), dornasa alfa (D1, N = 6), o una variante purificada de DNasa1L3 (SEQ ID NO: 17, D1L3^V, N = 6). El testículo no tratado y el testículo isquémico se recogieron al cabo de 7 días. La FIG. 37B muestra que la terapia con el D1L3^V, pero no la solución salina o el D1, redujo significativamente la atrofia en el testículo isquémico. La FIG. 37C cuantificó la lesión tisular macroscópica. Todos los testículos no tratados son parduscos y vascularizados, lo que indica un tejido sano (Ctrl, Puntuación: 0). La torsión testicular seguida de perfusión dañó el tejido, que apareció blanquecino (IR, Puntuación: 4). La terapia con el D1L3^V, pero no con solución salina o D1, redujo sustancialmente la lesión tisular y 4/6 testículos no mostraron signos de lesión. Barra de escala: 1 cm.

La FIG. 38A - La FIG. 38C muestra los niveles de expresión de DNasa1, DNasa1L3 y sus variantes. (FIG. 38A) Grupos estables de células OHC que producen DNasa1 de tipo salvaje (D1), una variante de la misma (D1^V, SEQ ID NO: 7), D1L3 de tipo salvaje y una variante de la misma (D1L3^V, SEQ ID NO: 17) se cultivaron en biorreactores. Se recogieron muestras periódicamente y se analizaron por medio de Western Blot. Se detectó la expresión de D1 y D1^V, pero sólo niveles bajos de D1L3 y D1L3^V. (FIG. 38B) Se logró una expresión robusta de D1L3 y D1L3^V en *Pichia pastoris*. (FIG. 38C) La zimografía mostró la actividad degradadora del dsADN en forma de círculos oscuros. La actividad degradadora del dsADN se correlaciona con el diámetro. Las muestras sin actividad muestran el pocillo de carga como un pequeño punto negro (por ejemplo, D1L3, 0,0005 ng). La electroforesis en gel de agarosa (EGA) del ADN aislado de la cromatina digerida muestra un desplazamiento del ADN de alto peso molecular a ADN de peso molecular más bajo o inferior que se correlaciona con la actividad de degradación de la cromatina. D1L3^V degrada la cromatina aproximadamente 10 veces más eficientemente que D1L3.

La FIG. 39 ilustra ciertas variantes de DNasa de acuerdo con la presente divulgación. Se enumeran las mutaciones de aminoácidos en DNasa1 y DNasa1L3 con péptido señal, así como las proteínas maduras sin péptido señal. Las mutaciones generadas por medio de ingeniería de bloques de construcción se marcan con "+" y los bloques de construcción se indican entre paréntesis.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona proteínas DNasa de ingeniería, miembros de la familia de proteínas DNasa1 (incluyendo DNasa1-similar a 3 y DNasa1) que son útiles para tratar afecciones caracterizadas por acumulación y/o liberación de trampa extracelular de neutrófilos (TEN). La divulgación proporciona además composiciones y procedimientos para prevenir o tratar la oclusión vascular que implica TENs. Como se ha demostrado aquí, las TEN participan en un mecanismo no canónico de oclusión vascular, que no depende de la fibrina y las plaquetas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "trampa extracelular de neutrófilos" o "TEN" se relaciona con cualquier trampa extracelular ("TE") que comprende ADN extracelular formado por células tales como, pero no limitadas a, neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células cancerosas, células

lesionadas (por ejemplo, células endoteliales lesionadas), y similares. Salvo que el contexto indique lo contrario, los términos TEN y TE se utilizan indistintamente en la presente memoria descriptiva.

Hay dos enzimas DNasa extracelulares que se encuentran en la circulación de humanos y ratones, DNasa1 (D1) y DNasa1-similar a 3 (D1L3). Estas enzimas pueden ser deficientes en su capacidad y mecanismo para degradar TENs in vitro e in vivo, y se encuentran en concentraciones relativamente bajas en humanos y ratones. Las enzimas naturales no tienen las propiedades físicas, enzimáticas y/o farmacodinámicas ideales para la terapia recombinante y, en particular, para la terapia sistémica.

D1 y D1L3 pertenecen, junto con DNasa1-similar a 1 (D1L1) y DNasa1-similar a 2 (D1L2), a la familia de proteínas DNasa1. D1 y D1L3 se expresan en una variedad de especies, incluyendo humanos, primates y roedores. En humanos y ratones, D1 y D1L3 muestran una similitud proteica del 49-52%. Sin embargo, a pesar de su homología, D1 y D1L3 difieren en su origen celular, su sensibilidad a los inhibidores y su afinidad por los sustratos. D1 escinde preferentemente ADN libre de proteínas (por ejemplo, ADN bacteriano, ADN plasmídico), mientras que D1L3 se dirige a la cromatina, el complejo de ADN e histonas, que se encuentra habitualmente en el núcleo de las células eucariotas. La actividad D1 se inhibe al unirse a la actina monomérica y es sensible a concentraciones fisiológicas de sal. Además, D1 está glicosilada en N40 (corresponde a N18 en la enzima madura sin péptido señal) y N128 (N106), lo que hace que la enzima sea resistente a la inactivación por proteasas séricas. En cambio, D1L3 carece de sitios de glicosilación y de unión a actina, lo que provoca su susceptibilidad a varias proteasas y su resistencia a la actina, respectivamente.

La divulgación proporciona variantes de D1L3 diseñadas para tener propiedades físicas, farmacodinámicas y/o enzimáticas más adecuadas para la terapia, por ejemplo, para reducir o prevenir la acumulación de TEN en un individuo. La divulgación proporciona una variante recombinante de la proteína D1L3 que comprende: una o más glucosilaciones, una o más alteraciones aminoácidas que dan lugar a una mayor afinidad por el sustrato, inactivación de una señal de localización nuclear, delección de toda o parte de una cola C-terminal, pegilación y fusión con una proteína o fracción portadora. La variante D1L3 puede tener mayor estabilidad proteica, mayor resistencia a la proteasa, mayor biodisponibilidad, mayor semivida en circulación, y/o sustancialmente la misma o mejor actividad degradadora de ADN y/o cromatina y/o TEN, mayores niveles de producción con sistemas de expresión in vitro (por ejemplo, células de ovario de hámster chino y/o *Pichia pastoris*) en comparación con la proteína D1L3 de tipo salvaje de SEQ ID NO:2.

La variante D1L3 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad de secuencia con la enzima definida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, con una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:2 como se describe en la presente memoria descriptiva. La variante D1L3 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98% de identidad de secuencia con la enzima DNasa definida por SEQ ID NO:2.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, cuando se hace referencia a la identidad de secuencia con enzimas DNasa de tipo salvaje, y a menos que se indique lo contrario, las secuencias se refieren a enzimas maduras que carecen del péptido señal. Además, a menos que se indique lo contrario, las posiciones de los aminoácidos se numeran con respecto a la secuencia completa traducida de la DNasa, incluido el péptido señal, para mayor claridad. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a la identidad de secuencia con la enzima de SEQ ID NO:2 se relaciona con un porcentaje de identidad con la enzima madura que tiene M21 en el N-terminal. Del mismo modo, la referencia a la identidad de secuencia con la enzima de SEQ ID NO:1 (D1 humana) se relaciona con un porcentaje de identidad con la enzima madura que tiene L23 en el N-terminal.

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, puede determinarse por medio de alineaciones de secuencias como se conoce en la técnica. Tales alineaciones pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos, como el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmmalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80). Se han incorporado algoritmos ejemplares a los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Al utilizar los programas BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los respectivos programas.

La variante de proteína D1L3 recombinante puede comprender una o más secuencias consenso de glicosilación, por ejemplo, NX(T/S). La enzima humana de tipo salvaje (SEQ ID NO:2) no contiene una secuencia de glicosilación consenso. Sin embargo, la ingeniería de una secuencia consenso de glicosilación en D1L3 puede proporcionar glicosilación (y resistencia a la proteasa) sin impacto sustancial en la actividad de la enzima. La secuencia consenso de glicosilación puede incluir una sustitución D38N y una sustitución N40T o N40S, y/o una sustitución A127N y una sustitución V129T o V129S de la secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO:2). La enzima recombinante D1L3 puede tener uno, dos, tres o cuatro sitios de glicosilación. La secuencia consenso puede introducirse en la proteína en un lugar que no afecte a su actividad enzimática, y puede estar situada cerca de porciones de la enzima que son importantes para mantener la estructura de la enzima (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 25 a 289, y dentro de los aminoácidos 24 a 150).

La divulgación proporciona una enzima DNasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:2, en la que la enzima tiene una

sustitución de asparagina en la posición correspondiente a la posición 38 y/o posición 127 de SEQ ID NO:2, y la N38 y/o N127 está glicosilada. La sustitución en la posición 38 y/o 127 puede realizarse por medio de una sustitución de bloques de construcción a partir del SEQ ID NO: 1 como se describe en la presente memoria descriptiva.

5 Las variantes de D1L3 que tienen una o más glicosilaciones pueden presentar una mayor resistencia a la degradación por proteasas séricas y/o una mayor semivida sérica en comparación con la proteína D1L3 de tipo salvaje (SEQ ID NO:2).

10 La variante de proteína D1L3 puede comprender una inactivación de una señal de localización nuclear (SLN). D1L3 presenta dos sitios de localización nuclear (SLN1, SLN2), que dirigen la enzima al núcleo durante la apoptosis. De hecho, D1L3 es necesario para la fragmentación del ADN nuclear en células apoptóticas y necróticas *in vivo*. SLN1 se localiza cerca del N-terminal (aproximadamente de las posiciones de aminoácidos 80 a 96 con respecto a SEQ ID NO: 2). SLN2 (posiciones de aminoácidos 291 a 304 con respecto a SEQ ID NO: 2) está incrustada dentro de una cola C-terminal (posiciones de aminoácidos 283 a 305 con respecto a SEQ ID NO: 2) que es exclusivo de D1L3 y no está presente en D1. Se cree que la cola C-terminal es necesaria para que D1L3 degrade diferentes sustratos de ADN extracelular, concretamente ADN encapsulado en lípidos y cromatina dentro de cuerpos apoptóticos. Los lípidos encapsulan el ADN durante las transfecciones. En resumen, el ADNc, el ADN sin proteínas y los lípidos catiónicos forman un complejo que penetra a través de la membrana plasmática de las células diana. D1L3 interfiere con las transfecciones y la cola C-terminal es crítica para esta función. Los sustratos fisiológicos de D1L3 son los cuerpos apoptóticos, vesículas lipídicas extracelulares llenas de cromatina procedentes de células apoptóticas. La cola C-terminal permite a D1L3 penetrar a través de las membranas lipídicas de los cuerpos apoptóticos y degradar la carga de cromatina. También se cree que la cola C-terminal es necesaria para la degradación de la cromatina extracelular libre de lípidos por D1L3. Así pues, la cola C-terminal, una característica molecular exclusiva de D1L3, parece ser responsable de las distintas afinidades de sustrato de D1 y D1L3.

25 La inactivación de uno o más SLN aumenta la disponibilidad y/o actividad de la enzima en la circulación. La inactivación de SLN puede ser por delección total o parcial de SLN1 y/o SLN2. La SLN puede inactivarse por sustitución y/o delección de aminoácidos dentro de SLN1 y/o SLN2. SLN2 puede suprimirse, total o parcialmente. La variante de la proteína D1L3 puede comprender una delección de toda o parte de la cola C-terminal, y/o la sustitución de uno o más aminoácidos en la cola C-terminal.

30 La variante D1L3 puede contener una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o más sustituciones de aminoácidos, adiciones (por ejemplo, inserciones), o delecciones en el dominio SLN1. Puede suprimirse el dominio SLN2 o una parte del mismo. La variante de la proteína D1L3 puede contener una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos en el dominio de cola C-terminal. El dominio de cola C-terminal o una porción del mismo puede suprimirse. La variante de la proteína D1L3 puede contener una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos en el dominio SLN2 que está situado en el dominio de cola C-terminal. El dominio SLN2 o una parte del mismo puede suprimirse en la variante de proteína D1L3.

35 La divulgación proporciona una tecnología de ingeniería de proteínas que se basa en una transferencia de un único aminoácido o múltiples aminoácidos adyacentes, denominado "bloque de construcción", entre dos miembros de una familia de proteínas, tales como miembros de la familia de proteínas DNasa1 para generar variantes enzimáticamente activas de miembros de la familia de proteínas DNasa1 (incluyendo variante de D1 y D1L3). Un "bloque de construcción" se define por aminoácidos que son variables entre dos o más miembros de la familia de proteínas DNasa1. Estos aminoácidos variables están flanqueados por aminoácidos que se conservan entre dos o más miembros de la familia de proteínas DNasa1 ("anclajes"). El aminoácido único variable o los aminoácidos múltiples contiguos ("bloques de construcción") se intercambian entre los miembros de la familia de proteínas DNasa1 implantándolos entre aminoácidos únicos conservados o aminoácidos múltiples contiguos ("anclajes").

45 Este enfoque se denomina en la presente memoria descriptiva "ingeniería de proteínas de bloques de construcción". Cuando se transfieren tres o más aminoácidos, se pueden sustituir hasta 1/3 de los aminoácidos. Por ejemplo, cuando se transfieren tres o seis aminoácidos como bloque de construcción, se puede sustituir uno o hasta dos, respectivamente. Pueden transferirse cuatro o más aminoácidos como sustitución de un bloque de construcción, y hasta el 25% de los aminoácidos transferidos se sustituyen además, por ejemplo, con modificaciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Por ejemplo, cuando se transfieren cuatro, ocho o doce aminoácidos, se pueden sustituir uno, dos o tres aminoácidos (respectivamente) en la sustitución del bloque de construcción.

La variante D1L3 puede comprender además al menos una sustitución de bloques de construcción de D1. La FIG. 31 ilustra 62 sustituciones de bloques de construcción entre D1 y D1L3.

55 Las sustituciones de bloques de construcción ejemplares de D1 incluyen una o más de: sustitución de 1-20 (MSRELAPLLLLSIHSALA) de SEQ ID NO:2 por 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) de SEQ ID NO:1; sustitución de 21-25 (MRICS) de SEQ ID NO:2 por 23-27 (LKIAA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 28-30 (VRS) de SEQ ID NO:2 por 30-32 (IQT) de SEQ ID NO:1; sustitución de 33-34 (ES) de SEQ ID NO:2 por 35-36 (ET) de SEQ ID NO:1; sustitución de 36-45 (QEDKNAMDVI) de SEQ ID NO:2 por 38-47 (MSNATLVSYI) de SEQ ID NO:1; sustitución de 47-51 (KVIK) de SEQ ID NO:2 por 49-53 (QILS) de SEQ ID NO:1; sustitución de 52 (C) de SEQ ID NO:2 por 54 (Y) de SEQ ID NO:1; sustitución de 54-58 (ILVM) de SEQ ID NO:2 por 56-60 (IALVQ) de SEQ ID NO:1; sustitución de 60-61

(IK) de SEQ ID NO:2 por 62-63 (VR) de SEQ ID NO:1; sustitución de 63-70 (SNNRICPI) de SEQ ID NO:2 por 65-72 (SHLTAVGK) de SEQ ID NO:1; sustitución de 72-74 (MEK) de SEQ ID NO:2 por 74-76 (LDN) de SEQ ID NO:1; sustitución de 77-84 (RNSRRGIT) de SEQ ID NO:2 por 79-84 (QDAPDT) de SEQ ID NO:1; sustitución de 86 (N) de SEQ ID NO:2 por 86 (H) de SEQ ID NO:1; sustitución de 88-89 (VI) de SEQ ID NO:2 por 88-89 (VV) de SEQ ID NO:1; sustitución de 91-92 (SR) de SEQ ID NO:2 por 91-92 (EP) de SEQ ID NO:1; sustitución de 96-97 (NT) de SEQ ID NO:2 por 96-97 (NS) de SEQ ID NO:1; sustitución de 101 (Q) de SEQ ID NO:2 por 101 (R) de SEQ ID NO:1; sustitución de 103 (A) de SEQ ID NO:2 por 103 (L) de SEQ ID NO:1; sustitución de 105 (L) de SEQ ID NO:2 por 105 (V) de SEQ ID NO:1; sustitución de 107-110 (KEKL) de SEQ ID NO:2 por 107-110 (RPDQ) de SEQ ID NO:1; sustitución de 113-116 (VKRS) de SEQ ID NO:2 por 113-116 (AVDS) de SEQ ID NO:1; sustitución de 118 (H) de SEQ ID NO:2 por 118 (Y) de SEQ ID NO:1; sustitución de 120 (H) de SEQ ID NO:2 por 120 (D) de SEQ ID NO:1; sustitución de 122-127 (YQDGDG) de SEQ ID NO:2 por 122-128 (GCEPCGN) de SEQ ID NO:1; sustitución de 129 (V) de SEQ ID NO:2 por 130 (T) de SEQ ID NO:1; sustitución de 131 (S) de SEQ ID NO:2 por 132 (N) de SEQ ID NO:1; sustitución de 135-136 (FV) de SEQ ID NO:2 por 136-137 (AIV) de SEQ ID NO:1; sustitución de 138 (W) de SEQ ID NO:2 por 139 (R) de SEQ ID NO:1; sustitución de 140-143 (QSPH) de SEQ ID NO:2 por 141-144 (FSRF) de SEQ ID NO:1; sustitución de 145-148 (AVKD) de SEQ ID NO:2 por 146-149 (EVRE) de SEQ ID NO:1; sustitución de 150 (V) de SEQ ID NO:2 por 151 (A) de SEQ ID NO:1; sustitución de 152 (I) de SEQ ID NO:2 por 153 (V) de SEQ ID NO:1; sustitución de 156-157 (TT) de SEQ ID NO:2 por 157-158 (AA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 159-161 (ETS) de SEQ ID NO:2 por 160-162 (GDA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 163 (K) de SEQ ID NO:2 por 164 (A) de SEQ ID NO:1; sustitución de 167 (E) de SEQ ID NO:2 por 168 (A) de SEQ ID NO:1; sustitución de 169-170 (VE) de SEQ ID NO:2 por 170-171 (YD) de SEQ ID NO:1; sustitución de 173 (T) de SEQ ID NO:2 por 174 (L) de SEQ ID NO:1; sustitución de 176-178 (KHR) de SEQ ID NO:2 por 177-179 (QEK) de SEQ ID NO:1; sustitución de 180-181 (KA) de SEQ ID NO:2 por 181-182 (GL) de SEQ ID NO:1; sustitución de 183-186 (NFIF) de SEQ ID NO:2 por 184-187 (DVML) de SEQ ID NO:1; sustitución de 198-201 (PKKA) de SEQ ID NO:2 por 199-202 (RPSQ) de SEQ ID NO:1; sustitución de 203-204 (KN) de SEQ ID NO:2 por 204-205 (SS) de SEQ ID NO:1; sustitución de 208 (R) de SEQ ID NO:2 por 209 (W) de SEQ ID NO:1; sustitución de 210 (D) de SEQ ID NO:2 por 211 (S) de SEQ ID NO:1; sustitución de 212 (R) de SEQ ID NO:2 por 213 (T) de SEQ ID NO:1; sustitución de 214 (V) de SEQ ID NO:2 por 215 (Q) de SEQ ID NO:1; sustitución de 218 (G) de SEQ ID NO:2 por 219 (P) de SEQ ID NO:1; sustitución de 220-221 (QE) de SEQ ID NO:2 por 221-222 (SA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 225-228 (VKKS) de SEQ ID NO:2 por 226-228 (ATP) de SEQ ID NO:1; sustitución de 230 (N) de SEQ ID NO:2 por 230 (H) de SEQ ID NO:1; sustitución de 238-240 (LRG) de SEQ ID NO:2 por 238-240 (VAG) de SEQ ID NO:1; sustitución de 241-246 (QEIVSS) de SEQ ID NO:2 por 241-246 (MLLRGA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 250 (K) de SEQ ID NO:2 por 250 (D) de SEQ ID NO:1; sustitución de 252-254 (NSV) de SEQ ID NO:2 por 252-254 (ALP) de SEQ ID NO:1; sustitución de 256 (D) de SEQ ID NO:2 por 256 (N) de SEQ ID NO:1; sustitución de 259-260 (KA) de SEQ ID NO:2 por 259-260 (AA) de SEQ ID NO:1; sustitución de 262 (K) de SEQ ID NO:2 por 262 (G) de SEQ ID NO:1; sustitución de 264-267 (TEEE) de SEQ ID NO:2 por 264-267 (SDQL) de SEQ ID NO:1; sustitución de 269-271 (LDV) de SEQ ID NO:2 por 269-271 (QAI) de SEQ ID NO:1; sustitución de 275 (F) de SEQ ID NO:2 por 275 (Y) de SEQ ID NO:1; sustitución de 279-280 (FK) de SEQ ID NO:2 por 279-280 (VM) de SEQ ID NO:1; y sustitución de 282-305 (QSSRAFTNSKKSIVTLRKKTKSKRS) de SEQ ID NO:2 por 282 (K) de SEQ ID NO:1.

Estas sustituciones de bloques de construcción de D1 dan lugar a variantes de D1L3 que presentan una o más de las siguientes mutaciones: M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsLQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSYI, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, I35F_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.

El término "delins" se relaciona con una delección entre e incluyendo dos aminoácidos indicados, con una inserción de un aminoácido o secuencia de aminoácidos en el sitio de la delección. Por ejemplo, la notación E91_P92delinsSR significa que los aminoácidos de E91 a P92 se suprimen y los aminoácidos SR se insertan en el lugar de la supresión (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos resultante tendrá S91 y R92).

El término "ins" se relaciona con una inserción de aminoácidos entre dos aminoácidos indicados. Por ejemplo, la notación E91_P92insSR significa que los aminoácidos SR se insertan entre E91 y P92, dando lugar a la secuencia E91, S92, R93 y P94.

Múltiples mutaciones en una enzima se separan por "/" por ejemplo, T227K/A136F o R199_Q202delinsPKKA/5204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE.

La variante D1L3 puede comprender una o más sustituciones de bloques de construcción adyacentes. Por ejemplo, la variante D1L3 puede comprender con respecto a SEQ ID NO:2 la mutación F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). La variante D1L3 puede comprender con respecto

a SEQ ID NO:2 la mutación Q36_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19). La variante D1L3 puede comprender con respecto a SEQ ID NO:2 la mutación Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20).

La variante D1L3 puede comprender 2 o 3 sustituciones seleccionadas de las mutaciones con respecto a SEQ ID NO:2:

5 Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N, F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK.

Así, la divulgación proporciona una enzima DNasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:2, y comprende al menos una sustitución de bloques de construcción a partir de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Sustituciones de bloques de construcción entre SEQ ID NOS: 1 y 2 se ilustran y numeran en la **FIG. 31**. Por ejemplo, la enzima comprende la mutación F275Y/F279_K280delinsVM/ Q282_S305delinsK, y que opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. La enzima puede comprender las mutaciones Q36_I45delinsMSNATLVSYI, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, o S131N, y opcionalmente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

Las variantes D1L3 ejemplares incluyen las que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nos: 17 a 20. La divulgación también incluye derivados que tienen de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 5) inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a cualquiera de los SEQ ID NOS: 17 a 20. La variante D1L3 puede así comprender una o más sustituciones adicionales de aminoácidos en bloque de una DNasa homóloga (por ejemplo, de D1). Tales sustituciones en bloque pueden reemplazar al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 aminoácidos. Las sustituciones de bloques de te pueden reemplazar de 2 a 20 aminoácidos, tales como de 3 a 15 aminoácidos, o de 3 a 10 aminoácidos, con el bloque de construcción comparable de la DNasa homóloga.

Las variantes de ingeniería de la proteína D1L3 pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, adiciones (inserciones), delecciones o truncamientos en la secuencia de aminoácidos de D1L3 humana (SEQ ID NO: 2). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones conservativas y/o no conservativas.

Por ejemplo, pueden realizarse "sustituciones conservadoras", por ejemplo, sobre la base de la similitud en polaridad, carga, tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos de aminoácidos implicados. Los 20 aminoácidos naturales pueden agruparse en los siguientes seis grupos de aminoácidos estándar: (1) hidrófobo: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácido: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromático: Trp, Tyr, Phe. Las "sustituciones conservadoras" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido incluido en el mismo grupo de los seis grupos de aminoácidos estándar mostrados anteriormente. Por ejemplo, el intercambio de Asp por Glu retiene una carga negativa en el polipéptido así modificado. Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse entre sí en función de su capacidad para interrumpir las α -hélices. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, las "sustituciones no conservadoras" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido incluido en un grupo diferente de los seis grupos de aminoácidos estándar (1) a (6) mostrados anteriormente.

La variante de proteína DIL3 puede comprender una fusión N-terminal o C-terminal a una fracción de extensión de vida media, tal como albúmina, transferrina, un Fc, o proteína similar a la elastina. Véase el documento US 9,458,218. El D1L3 puede estar dimerizado por una región bisagra de inmunoglobulina. Por ejemplo, las enzimas de ingeniería descritas en la presente memoria descriptiva también pueden incluir un dominio de fusión Fc (por ejemplo, una bisagra y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina). En otros casos, la proteína D1L3 modificada se fusiona con albúmina, por ejemplo, albúmina humana o un fragmento de la misma. Véase los documentos WO 2015/066550; US 9,221,896. La albúmina puede unirse al N-terminal o al C-terminal de la proteína D1 modificada, y puede comprender opcionalmente un enlazador de aminoácidos. D1L3 y D1 pueden dimerizarse conjuntamente por una región bisagra Fc, creando una molécula dimérica con propiedades funcionales sinérgicas para degradar TENs.

La variante de proteína D1L3 recombinante puede comprender alternativa o adicionalmente una o más moléculas de polietilenglicol (PEG), que pueden conjugarse en una o más de las posiciones o el C-terminal. El aminoácido nativo en esa posición puede sustituirse por un aminoácido que tenga una cadena lateral adecuada para la reticulación con fracciones hidrófilas, para facilitar la unión de la fracción hidrófila al péptido. Puede añadirse al péptido un aminoácido modificado para incluir un grupo hidrófilo en el extremo C-terminal. La cadena o cadenas de PEG pueden tener un peso molecular comprendido entre 500 y 40.000 daltons. La cadena o cadenas de PEG pueden tener un peso molecular comprendido entre 500 y 5.000 daltons. Alternativamente, la(s) cadena(s) de PEG tiene(n) un peso molecular de unos 10.000 a unos 20.000 Daltons.

La variante de proteína D1L3 puede tener mayor estabilidad de proteína, mayor disponibilidad sérica, y sustancialmente la misma o mejor actividad degradadora de TEN (de acuerdo con se determina in vitro o in vivo) en comparación con la proteína D1L3 de tipo salvaje. La variante D1L3 puede comprender una o más de las siguientes propiedades en relación con la D1L3 de tipo salvaje: mayor actividad de degradación de ADN libre de proteínas (ADN desnudo), la misma o sustancialmente la misma (por ejemplo, al menos 50%) actividad de degradación de ADN cromosómico, resistencia a proteasas, una semivida aumentada, y mayores niveles de producción con sistemas de expresión in vitro (por ejemplo, células de ovario de hámster chino y/o *Pichia pastoris*).

La fragmentación del ADN puede medirse mediante el uso de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como electroforesis en gel y ensayos de actividad DNasa. Los procedimientos para cuantificar las TEN, la degradación de las TEN y la actividad de fragmentación del ADN se describen, por ejemplo, en 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, y Jiménez-Alcázar et al., J Thromb Haemost, 2015, 13, 732-742.

La divulgación proporciona variantes de DNasa1 (D1) diseñadas para tener propiedades físicas, farmacodinámicas y/o enzimáticas más adecuadas para la terapia, por ejemplo, para reducir o prevenir la acumulación de TEN en un individuo. La variante puede ser más susceptible de expresión recombinante, proporcionando así considerables ventajas de fabricación. La variante D1 modificada puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80% idéntica a la enzima madura definida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, con una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que den lugar a uno o más de un sitio de unión al ADN mutado, la adición de un sitio de unión a la cromatina, un sitio de unión a la actina mutado, la mutación de un sitio de glicosilación, la adición de una señal de localización nuclear (por ejemplo, que tenga similitud o identidad con SLN1 o SLN2 de D1L3), y/o un dominio C-terminal similar a la cola C-terminal de D1L3. La variante D1 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:1, con una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:1 como se describe en la presente memoria descriptiva. La variante D1L3 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 97%, o al menos un 98% de identidad con la enzima de SEQ ID NO:1.

La variante D1 puede comprender una o más sustituciones, adiciones, delecciones o truncamientos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de D1 humana (SEQ ID NO: 1). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones conservativas y/o no conservativas como se ha descrito. Por ejemplo, la variante D1 puede tener de 1 a 20 (o de 1 a 10, o de 1 a 5) sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos con respecto a la enzima de SEQ ID NO:1.

La variante D1 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en bloque adicionales de una DNasa homóloga (por ejemplo, de D1L3). Tales sustituciones en bloque pueden reemplazar cada una de 1 a 24 aminoácidos, como por ejemplo de 3 a 15 aminoácidos, o de 3 a 10 aminoácidos, de la DNasa homóloga. La variante D1 puede incluir de 2 a 5 sustituciones de bloque de la DNasa homóloga (por ejemplo, D1L3), por ejemplo Se transfieren 2 o 3 sustituciones contiguas de bloques de construcción.

La variante D1 puede diseñarse para comprender una o más de las siguientes características relativas a la enzima de tipo salvaje: la actividad de degradación de ADN libre de proteínas (ADN desnudo) sustancialmente igual o superior (por ejemplo, al menos 50% o mejor), actividad de degradación de ADN cromosómico superior, resistencia a proteasas similar o mejorada, resistencia a actina, una semivida en suero aumentada, penetración mejorada desde la sangre a la orina o bilis, o una combinación de tales propiedades.

La enzima D1 manipulada puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 50% (o al menos 70%, 80%, 90%) de identidad de secuencia con el dominio C-terminal de la proteína D1L3 de tipo salvaje (por ejemplo, aminoácidos 283 a 305 de SEQ ID NO:2).

La enzima D1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50% o al menos 75% de identidad de secuencia con la SLN1 de la proteína D1L3 de tipo salvaje (aminoácidos 35 a 51 de SEQ ID NO:2), una señal de localización nuclear 2 (SLN2) que tiene identidad de secuencia sustancial con la SLN2 de la proteína D1L3 de tipo salvaje (aminoácidos 296 a 304 de SEQ ID NO:2).

En diversos aspectos, la variante D1 recombinante comprende una o más sustituciones de bloques de construcción seleccionadas de entre: sustitución de 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) de SEQ ID NO:1 con 1-20 (MSRELAPLLL LLLSIHSALA) de SEQ ID NO:2; sustitución de 23-27 (LKIAA) de SEQ ID NO:1 con 21-25 (MRICS) de SEQ ID NO:2; sustitución de 30-32 (IQT) de SEQ ID NO: 1 por 28-30 (VRS) de SEQ ID NO:2; sustitución de 35-36 (ET) de SEQ ID NO:1 por 33-34 (ES) de SEQ ID NO:2; sustitución de 38-47 (MSNATLVSYI) de SEQ ID NO:1 por 36-45 (QEDKNAMDV) de SEQ ID NO:2; sustitución de 49-52 (QILS) de SEQ ID NO:1 por 47-50 (KVIK) de SEQ ID NO:2; sustitución de 54 (Y) de SEQ ID NO:1 por 52 (C) de SEQ ID NO:2; sustitución de 56-60 (IALVQ) de SEQ ID NO:1 por 54-58 (III,VM) de SEQ ID NO:2; sustitución de 62-63 (VR) de la SEQ ID NO:1 por 60-61 (IK) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 65-72 (SHLTAVGK) de la SEQ ID NO:1 por 63-70 (SNNRICPI) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 74-76 (LDN) de SEQ ID NO:1 por 72-74 (MEK) de SEQ ID NO:2; sustitución de 79-84 (QDAPDT) de SEQ ID NO:1 por 77-84 (RNSRRGIT) de SEQ ID NO:2; sustitución de 86 (H) de SEQ ID NO:1 por 86 (N) de SEQ ID NO:2; sustitución de 88-89 (VV) de SEQ ID NO:1 por 88-89 (VI) de SEQ ID NO:2; sustitución de 91-92 (EP) de SEQ ID NO:1 por 91-92 (SR) de SEQ ID NO:2; sustitución de 96-97 (NS) de SEQ ID NO:1 por 96-97 (NT) de SEQ ID NO:2; sustitución de 101 (R) de SEQ ID NO:1 por 101 (Q) de SEQ ID NO:2; sustitución de 103 (L) de SEQ ID NO: 1 por 103 (A) de SEQ ID NO:2; sustitución de 105 (V) de SEQ ID NO:1 por 105 (L) de SEQ ID NO:2; sustitución de 107-110 (RPDQ) de SEQ ID NO:1 por 107-110 (KEKL) de SEQ ID NO:2; sustitución de 113-116 (AVDS) de SEQ ID NO:1 por 113-116 (VKRS) de SEQ ID NO:2; sustitución de 118 (Y) de SEQ ID NO:1 por 118 (H) de SEQ ID NO:2; sustitución de 120 (D) de SEQ ID NO:1 por 120 (H) de SEQ ID NO:2; sustitución de 122-128 (GCEPCGN) de SEQ ID NO:1 con 122-127 (YQDGDA) de SEQ ID NO:2; sustitución de 130 (TF) de SEQ ID NO:1 con 129 (V) de SEQ ID NO:2; sustitución de 132 (N) de

SEQ ID NO:1 con 131 (S) de SEQ ID NO:2; sustitución de 136-137 (AI) de SEQ ID NO:1 por 135-136 (FV) de SEQ ID NO:2; sustitución de 139 (R) de SEQ ID NO:1 por 138 (W) de SEQ ID NO:2; sustitución de 141-144 (FSRF) de SEQ ID NO:1 por 140-143 (QSPH) de SEQ ID NO:2; sustitución de 146-149 (EVRE) de la SEQ ID NO:1 por 145-148 (AVKD) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 151 (A) de la SEQ ID NO:1 por 150 (V) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 153 (V) de la SEQ ID NO:1 por 152 (I) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 157-158 (AA) de SEQ ID NO:1 por 156-157 (TT) de SEQ ID NO:2; sustitución de 160-162 (GDA) de SEQ ID NO:1 por 159-161 (ETS) de SEQ ID NO:2; sustitución de 164 (A) de SEQ ID NO:1 por 163 (K) de SEQ ID NO:2; sustitución de 168 (A) de SEQ ID NO:1 por 167 (E) de SEQ ID NO:2; sustitución de 170-171 (YD) de SEQ ID NO:1 por 169-171 (VE) de SEQ ID NO:2; sustitución de 174 (L) de SEQ ID NO:1 por 173 (T) de SEQ ID NO:2; sustitución de 177-179 (QEK) de SEQ ID NO:1 por 176-178 (KHR) de SEQ ID NO:2; sustitución de 181-182 (GL) de SEQ ID NO:1 por 180-181 (KA) de SEQ ID NO:2; sustitución de 184-187 (DVML) de SEQ ID NO:1 por 183-187 (NFIF) de SEQ ID NO:2; sustitución de 199-202 (RPSQ) de SEQ ID NO:1 por 198-201 (PKKA) de SEQ ID NO:2; sustitución de 204-205 (SS) de SEQ ID NO:1 por 203-204 (KN) de SEQ ID NO:2; sustitución de 209 (W) de SEQ ID NO:1 por 208 (R) de SEQ ID NO:2; sustitución de 211 (S) de SEQ ID NO:1 por 210 (D) de SEQ ID NO:2; sustitución de 213 (T) de SEQ ID NO:1 por 212 (R) de SEQ ID NO:2; sustitución de 215 (Q) de SEQ ID NO:1 por 214 (V) de SEQ ID NO:2; sustitución de 219 (P) de SEQ ID NO:1 por 218 (G) de SEQ ID NO:2; sustitución de 221-222 (SA) de SEQ ID NO:1 por 220-221 (QE) de SEQ ID NO:2; sustitución de 226-228 (ATP) de SEQ ID NO:1 por 225-228 (VKKS) de SEQ ID NO:2; sustitución de 230 (H) de SEQ ID NO:1 por 230(N) de SEQ ID NO:2; sustitución de 238-239 (VA) de SEQ ID NO:1 por 238-239 (LR) de SEQ ID NO:2; sustitución de 241-246 (MLLRGA) de la SEQ ID NO:1 por 241-246 (QEIVSS) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 250-251 (D) de la SEQ ID NO:1 por 250-251 (K) de la SEQ ID NO:2; sustitución de 252-254 (ALP) de la SEQ ID NO:1 por 252-254 (NSV) de SEQ ID NO:2; sustitución de 256 (N) de SEQ ID NO:1 por 256 (D) de SEQ ID NO:2; sustitución de 259-260 (AA) de SEQ ID NO:1 por 259-260 (KA) de SEQ ID NO:2; sustitución de 262 (G) de SEQ ID NO:1 por 262 (K) de SEQ ID NO:2; sustitución de 264-267 (SDQ) de SEQ ID NO:1 por 264-267 (TEEE) de SEQ ID NO:2; sustitución de 269-271 (QAI) de SEQ ID NO:1 por 269-271 (LDV) de SEQ ID NO:2; sustitución de 275 (Y) de SEQ ID NO:1 por 275 (F) de SEQ ID NO:2; sustitución de 279-280 (VM) de SEQ ID NO:1 por 279-280 (FK) de SEQ ID NO:2; y sustitución de 282 (K) de SEQ ID NO:1 por 282-305 (QSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS) de SEQ ID NO:2.

Estas sustituciones de bloques de construcción de D1L3 dan lugar a variantes de D1, que presentan una o más de las siguientes mutaciones: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsILVM, V62_R63delinsIK, S65_K72delinsSNNRICPI, L74_N76delinsMEK, Q79_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88_V89delinsVI, E91_P92delinsSR, N96_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107_Q110delinsKEKL, A113_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122_N128delinsYQDGD, 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, K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS.

Una variante D1 recombinante puede comprender las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: Y275F, V279_M280delinsFK, y K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16). Estas variantes incluyen una cola C-terminal y muestran una mayor afinidad por los complejos ADN-lípido.

Una variante D1 recombinante puede comprender las siguientes modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT (por ejemplo, SEQ ID NO: 10); H86N, y/o, V88_V89delinsVI, y/o E91_P92delinsSR (por ejemplo, SEQ ID NO: 11, que incluye las tres); A136_I137delinsFV (por ejemplo, SEQ ID NO: 12); R199_Q202delinsPKKA, y/o S204_S205delinsKN, y/o W209R, y/o S211D, y/o T213R, y/o Q215V, y/o P219G, y/o S221_A222delinsQE (por ejemplo, SEQ ID NO: 13, que incluye las ocho); y A226_P228delinsVKKS (por ejemplo, SEQ ID NO: 14).

Cuando la variante D1 comprende la sustitución H86N, la variante comprende al menos una modificación de adición, tal como una sustitución de bloque de construcción u otra mutación puntual descrita en la presente memoria descriptiva (tal como la adición de un aminoácido catiónico o sustitución que da lugar a resistencia a actina).

La variante D1 puede comprender al menos dos sustituciones de bloques de construcción contiguos y adyacentes que dan lugar a mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 1 de: H86N/V88_V89delinsVI (por ejemplo, SEQ ID NO: 11); R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE (por ejemplo, SEQ ID NO: 13); Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16).

La divulgación proporciona una enzima DNasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:1, y que comprende al menos una sustitución de bloques de construcción a partir de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que la enzima DNasa tiene una actividad de degradación de cromatina aumentada en comparación con la enzima DNasa de SEQ ID NO:1. La enzima puede incluir al menos dos sustituciones de bloques adyacentes de SEQ ID NO:2. Las sustituciones de bloques de construcción entre D1 (SEQ ID NO:1) y D1L3 (SEQ ID NO:2) se ilustran en la FIG. 31.

La enzima puede comprender la siguiente modificación con respecto a SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

La enzima puede comprender la siguiente modificación con respecto a SEQ ID NO:1: H86N/V88_V89delinsVI/E91_P92delinsSR, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

La enzima puede comprender las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: A136_I137delinsFV, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

La enzima puede comprender dos o más de las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: R199_Q202delinsPKKA, y/o S204_S205delinsKN, y/o W209R, y/o S211D, y/o T213R, y/o Q215V, y/o P219G, y/o S221_A222delinsQE, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (que comprende los ocho).

La enzima puede comprender las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: A226_P228delinsVKKS, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

La enzima puede comprender dos o más de las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: Q79_T84delinsRNSRRGIT, y/o H86N, y/o V88_V89delinsVI, y/o E91_P92delinsSR, y/o A136_I137delinsFV, y/o R199_Q202delinsPKKA, y/o S204_S205delinsKN, y/o W209R, y/o S211D, y/o T213R, y/o Q215V, y/o P219G, y/o S221_A222delinsQE, y/o A226_P228delinsVKKS, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

La enzima puede comprender dos o más de las siguientes modificaciones con respecto a SEQ ID NO:1: Y275F, y/o V279_M280delinsFK, y/o K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKTKSKRS, y opcionalmente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

Las variantes D1 ejemplares incluyen aquellas que comprenden la secuencia de aminoácidos de 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, y SEQ ID NO:16. La divulgación incluye derivados que tienen de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 5) inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a cualquiera de los SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. La variante D1 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en bloque adicionales de una DNasa homóloga (por ejemplo, de D1L3). Tales sustituciones en bloque pueden reemplazar de 2 a 20 aminoácidos, tales como de 3 a 15 aminoácidos, o de 3 a 10 aminoácidos de la variante D1, con aminoácidos en bloque de la DNasa homóloga (por ejemplo, D1L3, SEQ ID NO:2). Las sustituciones de bloques de construcción entre D1 y D1L3 se ilustran en **FIG. 31**. La enzima DNasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 95% o al menos un 97% idéntica a SEQ ID NO:15.

La enzima puede presentar una o más propiedades seleccionadas entre: una afinidad similar o mayor por ADN libre de proteínas en comparación con la enzima de SEQ ID NO:1, una actividad de degradación de cromatina mayor en comparación con la enzima de SEQ ID NO:1, una actividad enzimática que es resistente a la inhibición por actina en comparación con la enzima de SEQ ID NO:1, y una combinación de las mismas.

La variante D1 puede comprender una fusión N-terminal o C-terminal a una fracción de extensión de vida media, tal como albúmina, transferrina, un Fc, o proteína similar a elastina, tal como se describe para D1L3. La enzima D1 puede estar dimerizada por una región bisagra de inmunoglobulina.

La variante D1 puede presentar una o más propiedades seleccionadas de entre: la misma o mayor actividad de degradación de ADN libre de proteínas (ADN desnudo), mayor actividad de degradación de ADN cromosómico (cromatina), resistencia similar o mejorada a proteasas, resistencia a actina, penetración similar o mejorada de sangre a orina y/o bilis, y mayores niveles de producción en sistemas de expresión in vitro (por ejemplo, células de ovario de hámster chino y/o *Pichia pastoris*), y una combinación de los mismos.

La enzima DNasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:1, y comprende la sustitución, inserción o adición de uno o más residuos de arginina y/o lisina, en la que la enzima DNasa tiene una mayor actividad de degradación de cromatina en comparación con la enzima de SEQ ID NO:1. Los uno o más residuos de arginina y/o lisina pueden ser sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre sustituciones en posiciones correspondientes a las posiciones 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, y 280 de SEQ ID NO:1. Las modificaciones ejemplares en estas posiciones incluyen 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 y K280M. La enzima puede comprender la sustitución y/o inserción de al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro, o al menos cinco, o al menos seis residuos de arginina y/o lisina. La enzima DNasa puede comprender una arginina o lisina en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 31, 49, 76, 79, 92, 109, 164, 177, 200, 201, 204, 209, 213 y 262 de SEQ ID NO:1, que se seleccionan opcionalmente de Q31R, Q49R, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R,

W209R, y G262K. Estas posiciones/sustituciones pueden proporcionar independientemente una mejor actividad, incluida la actividad para degradar la cromatina.

Si la enzima comprende una sustitución de Q31R o T227K, la enzima comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos seleccionadas de 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, y K280M. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir Q31R y T227K con respecto a SEQ ID NO:1.

La enzima DNasa puede tener una arginina o una lisina en las posiciones correspondientes a las posiciones 31, 49, 79 y 209 de SEQ ID NO:1, y puede comprender opcionalmente las siguientes sustituciones de aminoácidos: Q31R, Q49K, Q79R y W209R. Estas posiciones albergan una arginina o una lisina en la D1 murina, pero no en la D1 humana de tipo salvaje, y pueden transferir la actividad de degradación de la cromatina a la D1 humana.

La enzima DNasa puede tener una arginina o lisina en las posiciones correspondientes a las posiciones 31, 49, 79, 177, 209 y 262 de SEQ ID NO:1, y puede comprender opcionalmente las sustituciones de aminoácidos Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K. Cuatro de estas posiciones albergan una arginina o una lisina en la D1 de rata, pero no en la D1 humana de tipo salvaje, y juntas pueden transferir la actividad degradadora de la cromatina a la D1 humana.

La enzima DNasa puede tener un residuo de lisina o arginina en las posiciones correspondientes a las posiciones 31 y 227 de SEQ ID NO:1.

La enzima DNasa puede tener una lisina o arginina en la posición correspondiente a la posición 164 de SEQ ID NO:1, que es opcionalmente lisina (A164K).

La proteína D1 de ingeniería puede contener una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, adiciones y deleciones) en el sitio de unión a actina (por ejemplo, sustitución de A136, tal como A136F), y por lo tanto dificultando o impidiendo la unión a actina. Como tal, la proteína D1 modificada puede ser resistente a la actina o sustancialmente resistente a la actina. Véase Ulmer et al., PNAS USA Vol. 93, pp 8225-8229 (1996). Así, la enzima DNasa puede comprender una sustitución de aminoácidos en la posición 136 con respecto a SEQ ID NO:1, y que es opcionalmente A136F. Las mutaciones en D1 que proporcionan resistencia a la actina, como las mutaciones en la posición 136 (por ejemplo, A136F, o la sustitución de otro aminoácido voluminoso, hidrofóbico, cíclico o aromático en esta posición), pueden combinarse con cualquier otra mutación descrita en la presente memoria descriptiva, incluida la adición de residuos catiónicos o sustituciones de bloques de construcción.

La variante D1 puede ser resistente a la inhibición de actina y capaz de degradar cromatina. Por ejemplo, la variante D1 puede incluir las siguientes sustituciones de aminoácidos: Q31R, T227K y A136F con respecto a SEQ ID NO:1. La enzima DNasa puede incluir las siguientes sustituciones de aminoácidos: A164K y A136F.

La enzima DNasa puede comprender una secuencia consenso de glicosilación que comprende una sustitución N40S y/o una sustitución N128S con respecto a SEQ ID NO:1. Por ejemplo, la enzima comprende las sustituciones de aminoácidos: Q31R, N40S, A136F, N128S y T227K con respecto a SEQ ID NO:1.

La variante D1 puede contener una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, adiciones, inserciones y supresiones) en los sitios de glicosilación, y por lo tanto aumentar la afinidad hacia el ADN encapsulado en lípidos. De este modo, la proteína D1 modificada puede degradar el ADN encapsulado en lípidos en reacciones de transfección. Véase Wilber et al., Mol Ther 6, 35-42 (2002).

La variante D1 puede estar glicosilada, o puede no estar glicosilada particularmente cuando no se necesita una vida media circulante larga. Las alteraciones de aminoácidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden realizarse en el contexto de variantes glicosiladas o no glicosiladas.

La variante D1 puede ser resistente a la inhibición de actina y capaz de degradar cromatina dentro de vesículas lipídicas. Las variantes D1 ejemplares comprenden una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre: Q31R, T227K, A136F, N40D o N40A, y N128D o N128S, con aminoácidos numerados de acuerdo con SEQ ID NO:1. Estas variantes pueden carecer de sitios de glicosilación, lo que es beneficioso desde el punto de vista de la fabricación.

La variante D1 puede ser resistente a la inhibición de actina y capaz de degradar cromatina dentro de vesículas lipídicas, y comprende modificaciones de aminoácidos Q31R, T227K, A136F, N40D y N128D con respecto a SEQ ID NO:1.

Otras modificaciones de D1 pueden ser las descritas en Pan et al., J Biol Chem, 1998, 273, 11701-11708 y en US 2014/0199329.

La variante D1 diseñada puede tener una semivida sérica aumentada o prolongada en comparación con la proteína D1 de tipo salvaje (SEQ ID NO:1). El D1 modificado puede incluir un dominio de fusión Fc (por ejemplo, una región

bisagra y/o los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina). La D1 modificada puede fusionarse con albúmina, por ejemplo, albúmina humana o un fragmento de la misma. La albúmina puede unirse al N-terminal o al C-terminal de la enzima D1 modificada, opcionalmente a través de un enlace de aminoácidos.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes D1L3 y/o D1 recombinantes, o polinucleótidos o vectores que codifican las mismas, y un portador farmacéuticamente aceptable. La variante de proteína D1L3 recombinante puede formularse para administración parenteral o pulmonar, para administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intraarticular, intramuscular, tópica o subcutánea, u otra vía descrita en la presente memoria descriptiva. La composición puede comprender tanto D1L3 como D1, que son variantes de ingeniería opcionales descritas en la presente memoria descriptiva. La variante recombinante D1L3 y la variante recombinante D1 pueden formularse para administración parenteral o pulmonar.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes y que no sea tóxico para el paciente al que se administra. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Dichos portadores pueden formularse por procedimientos convencionales y administrarse al individuo a una dosis adecuada. Preferentemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes como conservantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse por medio de la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos.

Las vías de administración incluyen, por ejemplo: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, intravenosa, subcutánea, intraarterial, oral, sublingual, pulmonar o transdérmica. La administración puede realizarse por vía oral o por medio de inyección parenteral o infusión. Alternativamente, la vía de administración puede ser tópica, incluso como colirio o enjuague bucal.

La divulgación también proporciona un procedimiento para hacer una composición farmacéutica para reducir o prevenir la acumulación de trampas extracelulares de neutrófilos (TEN). El procedimiento puede emplear un ratón modificado genéticamente deficiente en la actividad D1 y D1L3, y la expresión heteróloga de un polinucleótido de G-CSF (por ejemplo, en células de hepatocitos) o la inducción de una expresión endógena sostenida de G-CSF (por ejemplo, por medio de la administración repetitiva de compuestos microbianos). Este modelo de ratón acumula TENs y desarrolla rápidamente oclusiones vasculares relacionadas con TEN. el procedimiento puede comprender administrar un inhibidor de TEN candidato o una enzima DNasa candidata (incluyendo una variante D1L3 o D1 de acuerdo con la presente divulgación) al ratón modificado genéticamente, y seleccionar un inhibidor de TEN o una enzima DNasa que reduzca la acumulación de TENs. El inhibidor o enzima seleccionado se formula (como se ha descrito) para su administración a un paciente humano.

Un experto en la materia reconoce procedimientos estándar para generar ratones *Dnasa1*^{-doble knockout.1-}*Dnasa1/3*^{-/-}. Pueden encontrarse descripciones detalladas en, por ejemplo, la solicitud europea Núm. EP 17152528.0.

Procedimiento de tratamientos, desvelados en la presente memoria descriptiva no forman parte de la invención. La divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un individuo que necesita degradación de la trampa extracelular de neutrófilos (TEN). El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de D1L3 y/o D1 (que puede incluir variantes descritas en la presente memoria descriptiva, o una o más enzimas de tipo salvaje, incluso para terapia combinada de D1L3 y D1) de acuerdo con la presente divulgación. La D1L3 o D1 puede administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína recombinante, o en algunas realizaciones que comprenden el ADN o ARN codificante o vectores que comprenden el mismo.

El procedimiento puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un D1L3 o variante del mismo y un D1 o variante del mismo. El D1L3 o su variante, y el D1 o su variante, pueden administrarse en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. La proporción de D1L3 o variante del mismo con respecto a D1 o variante del mismo puede estar comprendida entre 100:1 y 1:100 en masa, o 10: 1 a 1:10 en masa, y opcionalmente aproximadamente de 1:1.

El individuo puede exhibir una degradación TEN alterada y/o exhibe una acumulación TEN patológica. El individuo puede tener un trastorno inflamatorio crónico o agudo o una infección aguda o crónica.

El procedimiento divulgado pertenece al tratamiento de enfermedades o afecciones caracterizadas por la presencia o acumulación de TENs. Tales enfermedades o afecciones incluyen, entre otras, enfermedades asociadas a la neutrofilia crónica (por ejemplo, un aumento del número de neutrófilos), agregación de neutrófilos y leucostasis, trombosis y oclusión vascular (por ejemplo, anemia falciforme), lesión por isquemia-reperfusión (por ejemplo, vólvulo del intestino medio, torsión testicular, isquemia-reperfusión de extremidades, isquemia-reperfusión vital), vólvulo intestinal medio, torsión testicular, isquemia-reperfusión de extremidades, isquemia-reperfusión de órganos vitales, trasplante de órganos), lesión tisular quirúrgica y traumática, una reacción o enfermedad inflamatoria aguda o crónica, una enfermedad autoinmune (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis reumatoide, vasculitis, esclerosis sistémica), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, aterosclerosis,

- tromboembolismo venoso, incluido el tratamiento trombolítico), enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes), inflamación sistémica (por ejemplo, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), sepsis, shock séptico, coagulación intravascular diseminada (CID) y microangiopatía trombótica (MAT)), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), lesión pulmonar aguda (LPA), lesión pulmonar inducida por el humo, lesión pulmonar inducida por transfusión (TRALI), síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), y asma, atelectasia, bronquitis, empiema), enfermedades inflamatorias renales (enfermedades renales agudas y crónicas, incluida la lesión renal aguda (LRA) y la enfermedad renal crónica (ERC), enfermedades inflamatorias relacionadas con el tejido trasplantado (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped) y cáncer (por ejemplo, leucemia, metástasis tumoral y tumores sólidos).
- 5 El individuo puede tener o puede estar en riesgo de que TENs ocluyan sistemas ducturales. Las enzimas desveladas en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a un individuo para tratar pancreatitis, colangitis, conjuntivitis, mastitis, enfermedad del ojo seco, obstrucciones de los conductos deferentes o enfermedades renales. En tal situación, el procedimiento puede comprender la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un D1L3 o una variante del mismo, y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de D1 o una variante del mismo. Por ejemplo, al individuo se le puede administrar una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad de secuencia con la enzima definida por la SEQ ID NO:2, y una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80% o más de identidad de secuencia con la enzima definida por la SEQ ID NO:1. Las enzimas pueden comprender la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por la SEQ ID NO:2 y la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por la SEQ ID NO:1.
- 10 El sistema ductal puede ser conducto biliar, conducto lagrimal, conducto galactóforo, conducto cístico, conducto hepático, conducto eyaculador, conducto parotídeo, conducto submandibular, conducto sublingual mayor, conducto de Bartolino, acueducto cerebral, páncreas, glándula mamaria, conducto deferente, uréter, vejiga urinaria, vesícula biliar e hígado. Por ejemplo, el individuo puede padecer pancreatitis, colangitis (por ejemplo, colangitis esclerosante primaria), conjuntivitis, mastitis, enfermedad del ojo seco, obstrucción de los conductos deferentes o enfermedad renal.
- 15 La enzima DNasa puede administrarse por vía intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. La DNasa, cuando se aplica, por ejemplo, por vía intravenosa, estará presente en forma enzimáticamente activa en diversos sistemas ductales, tal como en el líquido biliar.
- 20 El individuo puede tener o puede estar en riesgo de que se acumulen TENs en superficies endoteliales (por ejemplo, adherencias quirúrgicas), la piel (por ejemplo, heridas/cicatrices) o en articulaciones sinoviales (por ejemplo, gota y artritis). Las enzimas descritas en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a un individuo para tratar una afección caracterizada por la acumulación de TEN en una superficie endotelial, tal como por ejemplo, aunque no exclusivamente, una adherencia quirúrgica. Las enzimas descritas en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a un individuo para tratar una afección caracterizada por la acumulación de TEN en la piel, como heridas y cicatrices, entre otras. Las enzimas descritas en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a un individuo para tratar una enfermedad caracterizada por la acumulación de TEN en una articulación sinovial, como la gota y la artritis, entre otras.
- 25 El individuo puede tener o puede estar en riesgo de una oclusión vascular que comprende TENs. En tal situación, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un D1L3 o una variante del mismo, y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de D1 o una variante del mismo. Por ejemplo, al individuo se le puede administrar una enzima que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga un 80% o más de identidad de secuencia con la enzima definida por la SEQ ID NO:2. La enzima puede comprender la secuencia de aminoácidos de la enzima definida por SEQ ID NO:2. Al individuo se le puede administrar además una enzima que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga un 80% o más de identidad de secuencia con la enzima definida por SEQ ID NO:1, tal como la enzima definida por SEQ ID NO:1.
- 30 El individuo puede tener una afección relacionada con TENs como se describe en los documentos WO 2016/118476 y US 9,642,822.
- 35 El individuo puede tener una enfermedad que es o ha sido tratada con DNasas de tipo salvaje, incluyendo D1 y estreptodornasa. Tales enfermedades o afecciones incluyen trombosis, accidente cerebrovascular, sepsis, lesión pulmonar, aterosclerosis, infección vírica, anemia falciforme, infarto de miocardio, infección de oído, cicatrización de heridas, lesión hepática, endocarditis, infección hepática, pancreatitis, disfunción primaria de injertos, isquemia reperfusion de extremidades, lesión renal, coagulación sanguínea, inflamación inducida por alumbre, lesión hepatorenal, exudados pleurales, hemotórax, coágulos sanguíneos intrabiliares, anemia postneumática, úlceras, afecciones otorrinolaringológicas, infecciones orales, heridas leves, sinusitis, rinoplastias postoperatorias, infertilidad, sonda vesical, limpieza de heridas, prueba de reacción cutánea, meningitis neumocócica, gota, úlceras de pierna, fibrosis quística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquitis crónica, bronquiectasias, lupus, disquinesia ciliar primaria, bronquiolitis, empiema, infecciones pleurales, cáncer, enfermedad de ojos secos, infecciones del tracto respiratorio inferior, hematomas crónicos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad pulmonar obstructiva.
- 40 La divulgación se refiere además al tratamiento de enfermedades o afecciones caracterizadas por deficiencia de D1, deficiencia de D1L3, y deficiencia de D1 y D1L3. En algunos casos, el individuo tiene una mutación en el
- 45
- 50
- 55
- 60

gen *Dnasa1* y/o en el gen *Dnasa1/3*. Dichos sujetos también pueden padecer una enfermedad autoinmune (por ejemplo, LES, esclerosis sistémica) o una enfermedad inflamatoria. En algunos casos, el individuo tiene un inhibidor adquirido de D1 (por ejemplo, anticuerpo anti-DNasa1 y actina) y/o el D1L3 (por ejemplo, anticuerpo anti-DNasa1/3). Dichos sujetos también pueden padecer una enfermedad autoinmune (por ejemplo, LES, esclerosis sistémica) o una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sepsis y lesión por isquemia-reperusión).

El individuo puede tener fibrosis quística, y la composición de DNasa se administra por vía pulmonar.

Por ejemplo, cuando el individuo está en riesgo de, o muestra síntomas de, oclusión vascular relacionada con TEN, la proteína o composición (por ejemplo, que comprende D1L3, D1, o una variante de D1L3 o D1, incluyendo las variantes descritas en la presente memoria descriptiva) puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraarterial.

Se puede monitorizar al individuo para la actividad degradadora de TEN de la sangre, plasma o suero. Por ejemplo, el individuo puede ser monitorizado durante aproximadamente una semana a aproximadamente cuatro semanas, para reducir el riesgo de oclusión vascular o ductal por TENs, o daño a órganos relacionado con TENs. El individuo puede recibir de una a cuatro administraciones en el transcurso de una semana a un mes (o 1-2 semanas), de acuerdo con sea necesario para prevenir o reducir la acumulación intravascular de TEN (incluidas las oclusiones intravasculares relacionadas con TEN) durante una infección aguda o un evento inflamatorio. Alternativamente, el individuo puede recibir una infusión continua en el transcurso de una hora a un mes (o 1-2 semanas). En algunos casos, el individuo puede recibir al menos una, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más infusiones diarias, por ejemplo (sin limitación), en caso de enfermedad crítica como sepsis, ictus o infarto de miocardio.

El tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con TENs puede comprender la administración de una variante D1, una variante D1L3, o una combinación que comprende una variante D1 y una variante D1L3. Pueden administrarse dos o más de las variantes de la proteína D1 descritas en la presente memoria descriptiva. Alternativamente, pueden administrarse dos o más de las variantes de la proteína D1L3 descritas en la presente memoria descriptiva.

Las presentes variantes de proteína D1 y variantes de proteína D1L3 pueden administrarse como terapia profiláctica, tal como antes de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" o "tratar" o "tratado" se relaciona con el tratamiento terapéutico en el que el objeto es frenar (disminuir) una condición fisiológica, trastorno o enfermedad no deseada, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas; la disminución de la extensión de la afección, trastorno o enfermedad; la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad; el retraso en el inicio o la ralentización de la progresión de la afección, trastorno o enfermedad; la mejora del estado de la afección, trastorno o enfermedad; y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable, o la potenciación o mejora de la afección, trastorno o enfermedad. El tratamiento incluye la obtención de una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. "Tratamiento" o "tratar" o "tratado" se relaciona con medidas profilácticas, en las que el objeto es retrasar la aparición o reducir la gravedad de una condición fisiológica, trastorno o enfermedad no deseada, como, por ejemplo, es una persona predispuesta a una enfermedad (por ejemplo, un individuo portador de un marcador genético de una enfermedad como el lupus).

La terapia se utiliza para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejora de la enfermedad o afección, y/o una mejora de los síntomas asociados a la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras de la enfermedad: (1) una reducción de las trampas extracelulares de neutrófilos; (2) una reducción de los coágulos intravasculares; (3) una reducción de los coágulos ductales; (4) una reducción de la acumulación de TEN en las articulaciones sinoviales; (5) un aumento de la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos; (6) un aumento de la degradación del ADN extracelular libre de proteínas; (7) un aumento de la degradación del ADN cromosómico extracelular o del ADN unido a proteínas; (8) un aumento de la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos en presencia de autoanticuerpos; (9) una reducción de la inflamación tisular/organal; (10) una reducción de las lesiones tisulares/organales; (11) una reducción de la atrofia tisular/organal; (12) un aumento de la tasa de supervivencia del paciente; y (13) cierto alivio de uno o más síntomas asociados a la enfermedad o afección.

Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada pueden determinarse por medio de criterios de respuesta estandarizados específicos para dicha enfermedad o afección. La respuesta clínica puede evaluarse para detectar cambios en la oclusión vascular y la presencia de TEN por medio de técnicas de cribado tales como la resonancia magnética (RM), la ecografía, la histología y el recuento de TEN en la circulación. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el individuo sometido a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora de los síntomas asociados a la enfermedad.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis

puede reducirse o aumentarse proporcionalmente de acuerdo con indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

La divulgación proporciona además un vector de expresión, que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de tipo salvaje o D1L3 o D1 descrita en la presente memoria descriptiva, que puede encontrar uso para terapia genética. La terapia genética puede ser útil para enfermedades crónicas como una deficiencia genética de D1L3 y/o D1 (como una mutación deletérea). El vector de expresión puede comprender ADN o ARN. El vector de expresión puede ser un vector de expresión de mamíferos.

Los vectores de expresión pueden comprender un ácido nucleico que codifica las variantes de la proteína unido operablemente a una región de control de expresión, o complemento de la misma, que es funcional en una célula hospedadora (por ejemplo, célula procariota, eucariota o de mamífero). La región de control de la expresión es capaz de conducir la expresión del ácido nucleico codificante del agente bloqueante y/o estimulante enlazado operablemente, de forma que el agente bloqueante y/o estimulante se produzca en una célula humana transformada con el vector de expresión.

Las regiones de control de la expresión son polinucleótidos reguladores (a veces denominados en la presente memoria descriptiva elementos), tales como promotores y potenciadores, que influyen en la expresión de un ácido nucleico enlazado operablemente. Una región de control de expresión de un vector de expresión divulgado en la presente memoria descriptiva es capaz de expresar ácido nucleico codificante enlazado operablemente en una célula humana. La región de control de expresión puede conferir una expresión regulable a un ácido nucleico enlazado operablemente. Una señal (a veces denominada estímulo) puede aumentar o disminuir la expresión de un ácido nucleico operativamente ligado a dicha región de control de expresión. Estas regiones de control de la expresión que aumentan la expresión en respuesta a una señal suelen denominarse inducibles. Estas regiones de control de la expresión que disminuyen la expresión en respuesta a una señal suelen denominarse reprimibles. Típicamente, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal presente; cuanto mayor sea la cantidad de señal, mayor será el aumento o disminución de la expresión.

Los sistemas de expresión funcionales en células humanas son bien conocidos en el arte, e incluyen sistemas virales. En general, un promotor funcional en una célula humana es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción descendente (3') de una secuencia codificante en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción, que suele situarse proximal al extremo 5' de la secuencia codificante, y normalmente una caja TATA situada 25-30 pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se cree que la caja TATA dirige a la ARN polimerasa II para que inicie la síntesis de ARN en el lugar correcto. Un promotor también suele contener un elemento promotor aguas arriba (elemento potenciador), normalmente situado entre 100 y 200 pares de bases aguas arriba de la caja TATA. Un elemento promotor aguas arriba determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación. Los promotores de genes víricos de mamíferos son especialmente útiles como promotores, ya que los genes víricos suelen expresarse en gran medida y tienen una amplia gama de huéspedes. Algunos ejemplos son el promotor temprano del SV40, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor del adenovirus, el promotor del virus del herpes simple y el promotor del CMV.

Cuando proceda, también pueden emplearse agentes de administración de genes tales como, *por ejemplo*, secuencias de integración. Numerosas secuencias de integración son conocidas en la técnica (*véase, por ejemplo*, 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). Entre ellas se encuentran las recombinasas y las transposasas. Algunos ejemplos son Cre (Sternberg y Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), lambda (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp (Broach, et al, Cell, 29:227-234, 1982), R (Matsuzaki, et al., J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31 (*véase, por ejemplo*, Groth et al., J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004), bella durmiente, transposasas de la familia manner (Plasterk *et al.*, supra), y componentes para integrar virus como AAV, retrovirus y antirvirus que tienen componentes que permiten la integración de virus como las secuencias LTR de retrovirus o lentivirus y las secuencias ITR de AAV (Kootstra et al, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). Además, pueden utilizarse estrategias de integración genética directa y dirigida para insertar secuencias de ácido nucleico que codifiquen las proteínas de fusión quiméricas, incluidas las tecnologías de edición genética CRISPR/CAS9, zinc finger, TALEN y meganucleasas.

Ejemplo 1: Las DNAsas del huésped impiden la oclusión vascular por las trampas extracelulares de neutrófilos

Los coágulos de plaquetas y fibrina ocluyen los vasos sanguíneos en la hemostasia y la trombosis. Aquí informamos de un mecanismo no canónico de oclusión vascular basado en las trampas extracelulares de neutrófilos (TENs), fibras de ADN antimicrobiano liberadas por neutrófilos activados. Demostramos que dos DNAsas, DNasa1 y DNasa1-similar a 3, degradan TENs en circulación durante episodios de inflamación murina. En ausencia de ambas DNAsas, las TEN intravasculares forman coágulos que obstruyen los vasos sanguíneos y causan daños en los órganos. Las oclusiones

vasculares en pacientes con infecciones bacterianas graves se asocian a un defecto para degradar las TEN ex vivo y a la formación de coágulos TEN intravasculares. La DNasa1 y la DNasa1-similar a 3 se expresan de forma independiente, por lo que proporcionan una doble protección al huésped frente a los efectos deletéreos de las TEN en la inflamación.

La inflamación es una respuesta esencial del huésped para controlar los microbios invasores y curar los tejidos dañados (1). La inflamación incontrolada y persistente causa lesiones tisulares en una plétora de trastornos inflamatorios. Los neutrófilos son los leucocitos predominantes en la inflamación aguda. Durante las infecciones, los neutrófilos generan trampas extracelulares (TEN), entramados de filamentos de ADN decorados con histonas tóxicas y enzimas que inmovilizan y neutralizan las bacterias (2). La relevancia de las TEN en la defensa del huésped queda ilustrada por el hecho de que las DNasas extracelulares sirven como factores de virulencia en varias bacterias patógenas (3, 4). Sin embargo, las TEN liberadas de forma inapropiada pueden dañar a las células huésped debido a su actividad citotóxica, proinflamatoria y protrombótica (5-7). De hecho, las TEN se asocian con frecuencia a lesiones inflamatorias o isquémicas de órganos y la infusión terapéutica de DNasas limita las lesiones del huésped en diversos modelos animales (8, 9).

No se conoce bien cómo el huésped degrada las TEN in vivo para limitar el daño tisular durante los episodios de inflamación. Trabajos anteriores han demostrado que la DNasa1 presente en el suero digiere el ADN de las TEN in vitro (10). Analizamos el suero de ratones de tipo salvaje por medio de zimografía y detectamos dos DNasas enzimáticamente activas, la DNasa1 y la DNasa1-similar a 3 [DNasa113] (FIG. 1A). Ambas enzimas son miembros de la familia de proteínas DNasa1, pero difieren en su origen y afinidad por el sustrato. La DNasa1 se expresa en los tejidos no hematopoyéticos y escinde preferentemente el ADN libre de proteínas (11,12). La DNasa113, también conocida como DNasa γ , es secretada por las células inmunitarias y se dirige a los complejos ADN-proteína, tales como los nucleosomas (11,13). Generamos ratones que carecían de actividad degradadora de ADN en suero debido a una deficiencia combinada de DNasa1 y DNasa113 (FIG. 1A). Las TEN generadas in vitro permanecieron intactas tras la exposición a sueros DNasa1/DNasa113^{-/-}, mientras que los sueros de ratones de tipo salvaje, DNasa1^{-/-} y DNasa113^{-/-} degradaron las TEN (FIG. 1B y FIG. 1C). Utilizamos un plásmido de expresión específico de hepatocitos junto con la liberación hidrodinámica de genes para expresar de forma estable el ADNc de DNasa1 o DNasa113 en el hígado de ratones DNasa1/DNasa113^{-/-}. Dado que ambas enzimas contienen una secuencia señal de proteína secretora (11), este enfoque restauró la actividad de DNasa1 o DNasa113 en circulación (FIG. 1D) y la capacidad de los sueros de ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} para degradar TENs (FIG. 1E y FIG. 1F). En conjunto, estos datos muestran que dos enzimas huésped expresadas independientemente, DNasa1 y DNasa113, degradan TENs in vitro.

Para probar el requisito de DNasa1 y DNasa113 para la degradación TEN in vivo, nos propusimos estimular crónicamente ratones de tipo salvaje, DNasa1^{-/-}, DNasa113^{-/-} y DNasa1/DNasa113^{-/-} con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). El G-CSF desencadena la neutrofilia, una característica distintiva de la inflamación aguda, y estimula a una subpoblación de neutrófilos a liberar espontáneamente TEN ex vivo (14). Clonamos el ADNc del CSF3, que codifica el G-CSF, en el plásmido de expresión específico de hepatocitos. La inyección hidrodinámica de ratones de tipo salvaje con el plásmido CSF3 dio lugar a niveles crónicamente elevados de G-CSF en plasma (FIG. 5A). En consecuencia, el recuento de neutrófilos en sangre aumentó de forma constante y se detectaron TENs formados espontáneamente en frotis sanguíneos (FIG. 2A y FIG. 2B). Además, observamos un aumento del número de neutrófilos residentes en órganos vitales y esplenomegalia (FIG. 5B y FIG. 5C). Es importante destacar que los ratones de tipo salvaje inyectados con CSF3 crecieron normalmente, no desarrollaron lesiones orgánicas y no mostraron signos macroscópicos de angustia o comportamiento anormal (FIG. 5D y FIG. 5E). En conjunto, estos datos sugieren que la neutrofilia crónica con formación concomitante de TEN se tolera bien en ratones de tipo salvaje.

A continuación, expresamos de forma estable CSF3 en el hígado de ratones DNasa1^{-/-}, DNasa113^{-/-} y DNasa1/DNasa113^{-/-}. Los ratones con una única deficiencia de DNasa1 o DNasa113 no mostraron signos de sufrimiento (no mostrado), mientras que todos los ratones con una deficiencia combinada murieron en los 6 días siguientes a la inyección de CSF3 (FIG. 2C). Los ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} que recibieron el plásmido de control carente de CSF3 sobrevivieron sin mostrar ninguna anomalía (FIG. 2C, no mostrado). Hemos coexpresado DNasa1 o DNasa113 con CSF3 en ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} para inducir neutrofilia y TENs y simultáneamente restaurar DNasa1 o DNasa113 en circulación. La expresión de cualquiera de las DNasas fue suficiente para que los ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} sobrevivieran sin mostrar signos de sufrimiento (FIG. 2D). Los ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} que coexpresan CSF3 con un plásmido de control que carece de DNasa1 y DNasa113 murieron a los 5 días de la administración del gen (FIG. 2D). La mortalidad en estos ratones fue precedida por una hipotermia de rápida progresión, que se evidenció como un fuerte descenso de la temperatura corporal periférica en las 8 horas previas al exitus (FIG. 2E). La hipotermia se acompañó de anemia hemolítica mostrada por plasma y orina rojizos y hemoglobina sanguínea reducida (FIG. 2F y FIG. 2G). La abundancia de esquistocitos en los frotis sanguíneos indicaba que la anemia hemolítica estaba causada por la fragmentación eritrocitaria (FIG. 2H). Además, detectamos niveles plasmáticos elevados de lactato deshidrogenasa (LDH), transaminasas hepáticas y los marcadores de lesión renal nitrógeno ureico en sangre y creatinina, que indicaban daño orgánico múltiple (FIG. 2I, FIG. 6A, y FIG. 6B). La coexpresión de DNasa1 o DNasa113 con CSF3 mantuvo la temperatura corporal y la integridad de eritrocitos y órganos (FIG. 2E a FIG. 2I; FIG. 6A y FIG. 6B). En conclusión, estos datos indican que la DNasa1 o la DNasa113 son necesarias para prevenir la lesión del huésped durante la neutrofilia crónica.

El análisis histológico de ratones DNasa1/DNasa1I3-/- con neutrofilia crónica mostró coágulos intravasculares positivos para hematoxilina con eritrocitos atrapados que ocluían total o parcialmente vasos sanguíneos en pulmones, hígado y riñones (FIG. 3A y B; FIG. 6C y FIG. 6D). La expresión de DNasa1 o DNasa1I3 en la circulación evitó estas oclusiones vasculares. Los coágulos positivos a la hematoxilina mostraban un patrón de tinción abundante de color violeta claro, moteado esporádicamente con una tinción violeta oscuro de núcleos leucocitarios individuales, lo que sugiere que el ADN descondensado es un componente principal del coágulo (FIG. 3A). Dado que la ruptura nuclear y el desdoblamiento de la cromatina fuertemente empaquetada es una característica distintiva de la formación de TEN (15), teñimos los coágulos positivos a la hematoxilina en busca de marcadores TEN. Observamos una tinción robusta con colorantes fluorescentes intercalantes de ADN de doble cadena y anticuerpos contra la cromatina (FIG. 7A). La co-localización de la cromatina descondensada con la enzima mieloperoxidasa derivada de los gránulos de neutrófilos, los péptidos antimicrobianos catelicidina, y el marcador indirecto TEN citrullinated histones confirmó que los coágulos estaban compuestos de TENs (FIG. 3C, FIG. 7B y FIG. 7C). Para identificar los componentes de los trombos canónicos, se tiñeron los coágulos TEN en busca de fibrina y factor von Willebrand (FvW), una proteína almacenada en las vesículas secretoras de las plaquetas y el endotelio vascular. Los coágulos TEN eran muy heterogéneos en su contenido de FvW y fibrina (FIG. 3D y FIG. 3E). Los cortes transversales de los coágulos TEN estaban cubiertos por una media del 46% de FvW, mientras que el 9% de los coágulos TEN no se teñían para el FvW (FIG. 3E y FIG. 3F). La fibrina estaba prácticamente ausente y se detectó en menos del 23% de los vasos ocluidos (FIG. 3E). Estos datos concuerdan con los hallazgos de que las TEN sirven como andamio independiente de la fibrina para inmovilizar plaquetas y eritrocitos *in vitro* (6). La ausencia de FvW y fibrina en algunos coágulos sugiere que las TEN pueden ser suficientes para la oclusión vascular. Para corroborar esta noción, nos propusimos generar coágulos TEN a partir de neutrófilos puros *in vitro*. Aislamos neutrófilos de la sangre e indujimos la formación de TEN, al tiempo que exponíamos las células a fuerzas de cizallamiento para imitar el flujo sanguíneo. En esta configuración, observamos coágulos macroscópicamente visibles y sensibles a la DNasa (FIG. 8A), que se asemejaba a la aparición de coágulos TEN dentro de la vasculatura murina (FIG. 8B). Ahora, agotamos las plaquetas de la circulación e inhibimos farmacológicamente la trombina para bloquear la formación de fibrina en ratones DNasa1/DNasa1I3-/- que expresan CSF3. A diferencia de la expresión de DNasa1- o DNasa1I3-, ninguno de los tratamientos antitrombóticos pudo evitar la mortalidad en estos animales (FIG. 3H). En conjunto, los datos sugieren que los coágulos de TENs son suficientes para obstruir los vasos sanguíneos durante la neutrofilia crónica en ratones DNasa1/DNasa1I3-/-.

La formación de coágulos TEN en ratones DNasa1/DNasa1I3-/- se asocia con características de microangiopatías trombóticas (MAT) inducidas por infección y coagulación intravascular diseminada en pacientes, incluyendo esquistocitos, anemia hemolítica y fallo orgánico debido a oclusiones vasculares. Analizamos el plasma de pacientes de MAT con síndrome urémico hemolítico debido a una infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga [STEC-HUS, (16)]. La sepsis y el shock séptico fueron una complicación frecuente en estos pacientes (17). Las TEN generadas *in vitro* permanecieron intactas tras la exposición al plasma de pacientes recogido en el estado agudo de la enfermedad, mientras que el plasma de pacientes en remisión degradó las TEN (FIG. 9A y FIG. 9B). Los datos indican un defecto adquirido y temporal en la degradación de TEN, ampliando así informes anteriores (18,19). Cabe destacar que los pacientes con SHU-STEC fueron tratados eficazmente con un régimen que incluía la infusión de plasma de donantes sanos (17), una fuente de DNasas, que potencialmente restauró la degradación de TEN.

Se ha informado de la formación de grandes agregados de TENs en el líquido sinovial y en los conductos pancreáticos de pacientes (21,22), pero aún no se han descrito en otros tejidos. Por lo tanto, nuestro objetivo fue identificar agregados intravasculares de TENs en pacientes con enfermedades inflamatorias graves. Examinamos el tejido pulmonar recogido en autopsias de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda y/o sepsis (FIG. 10). Detectamos coágulos positivos a la hematoxilina en los vasos sanguíneos de dos pacientes sépticos (FIG. 11A y FIG. 11C). En ambos casos, los coágulos estaban formados por cromatina y MPO (FIG. 11B y FIG. 11D), lo que indica que las TEN pueden formar coágulos intravasculares en la sepsis humana.

La septicemia es un desencadenante potente y rápido de la formación de TEN intravasculares en ratones (7). Por lo tanto, nuestra hipótesis es que un defecto en la degradación de TEN puede agravar la enfermedad. De hecho, observamos que los ratones con una deficiencia combinada de DNasa1 y DNasa1I3, pero no los ratones de tipo salvaje eran altamente susceptibles a dosis bajas de lipopolisacárido y a *E. coli* muerta por calor (FIG. 4A). De forma similar a los ratones DNasa1/DNasa1I3-/- neutrófilos, el análisis sanguíneo de los ratones DNasa1/DNasa1I3-/- sépticos mostró anemia hemolítica y hematuria (FIG. 4B y FIG. 4C), junto con mayores niveles de LDH plasmática y esquistocitos en frotis sanguíneos (FIG. 4D y FIG. 4E). Además, detectamos abundantes vasos sanguíneos parcial o totalmente ocluidos en el pulmón (FIG. 4F y FIG. 4G). El análisis detallado de los vasos parcialmente ocluidos reveló coágulos de TEN dentro de la luz vascular (FIG. 4H). En los vasos completamente ocluidos, los coágulos TEN estaban congestionados con eritrocitos y leucocitos atrapados (FIG. 4I; FIG. 12A y FIG. 12B). Es importante destacar que la expresión hepática de DNasa1 o DNasa1I3 en ratones DNasa1/DNasa1I3-/- previno la oclusión vascular y restauró el fenotipo de tipo salvaje. En conjunto, estos datos indican que la DNasa1 o DNasa1I3 circulante previene la formación de coágulos TEN y la lesión del huésped en la septicemia.

En resumen, mientras que las plaquetas y la fibrina forman coágulos hemostáticos y trombos patológicos (23), nuestros datos introducen los coágulos TEN como un mecanismo no canónico de oclusión vascular en estados inflamatorios. Al igual que las hebras de fibrina, las TEN son moléculas ultragrandes y estables (6). En concentraciones elevadas, como las que se dan en la neutrofilia crónica o la septicemia, las TEN intravasculares pueden formar coágulos, cuyo tamaño es suficiente para obstruir los vasos sanguíneos y causar así daños en los eritrocitos y los órganos. Para

mantener la integridad de la sangre y los tejidos durante la inflamación, el huésped expresa de forma independiente DNasa1 y DNasa113 como sistema de protección dual contra las TEN intravasculares. Sin embargo, los defectos adquiridos y genéticos en estos factores del huésped pueden retrasar la degradación de las TEN y precipitar así la enfermedad. Los defectos adquiridos pueden implicar la inhibición de la DNasa1 por la actina monomérica externalizada del tejido dañado y la inactivación de la DNasa113 por proteasas séricas (11). Se han identificado mutaciones en DNasa1 y DNasa113 en pacientes y se asocian al lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmune sistémica (24,25). Curiosamente, los ratones deficientes en DNasa1 y DNasa113 desarrollan espontáneamente una enfermedad similar al LES con la edad (13,26). Los TEN están compuestos por autoantígenos prominentes y los neutrófilos de pacientes con LES tienen una mayor capacidad para liberar TEN (27). Una capacidad de despeje reducida puede aumentar la semivida de las TENs y de este modo promover la enfermedad autoinmune (10,27). En conclusión, los defectos en las DNasas del huésped pueden adelantar los efectos deletéreos de las TEN en una plétora de enfermedades inflamatorias.

En consecuencia, la degradación de TEN mediada por DNasa1 y DNasa113 proporciona una oportunidad terapéutica atractiva para los pacientes que sufren afecciones inflamatorias. Para comprobar si la DNasa1 y la DNasa113 degradan las TENs por el mismo mecanismo o por mecanismos distintos, reticulamos proteínas en las TENs mediante el uso de fijador. Las TEN fijadas fueron degradadas eficazmente por los sueros DNasa113^{-/-}, pero fueron resistentes a la degradación por los sueros DNasa1^{-/-} (FIG. 13A y FIG. 13B). En consonancia con estos resultados, la exposición de las TEN a la DNasa1 recombinante o a la DNasa113 demostró que ambas DNasas degradan las TEN ingenuas (FIG. 13C y FIG. 13D), mientras que las TEN fijadas son resistentes a la actividad DNasa113 (FIG. 13E y FIG. 13F). En conjunto, estos datos *in vitro* sugieren que la DNasa1 y la DNasa113 degradan TENs a través de mecanismos distintos.

Por último, comparamos la actividad de DNasa1 y DNasa113 en la circulación de ratones con la de humanos. Para discriminar la actividad DNasa1 y DNasa113, generamos anticuerpos contra DNasa1 humana (α -hDNasa1), que bloquean la actividad DNasa1 en plasma de donantes sanos normales (DSN) (FIG. 14A). La heparina es un inhibidor conocido de la DNasa113 y se utilizó para bloquear la actividad de degradación del ADN por la DNasa113 (FIG. 14B). El plasma murino mostró una actividad DNasa total aproximadamente 10 veces superior (FIG. 14C), actividad DNasa1 (FIG. 14D), y la actividad DNasa113 (FIG. 14E) que el plasma humano. Además, la DNasa113 en plasma murino, pero no en plasma humano, degrada las TENs de forma eficiente (FIG. 14F y FIG. 14G). Los datos sugieren que la concentración de DNasa113 en la circulación humana no es suficiente para degradar las TEN. Por lo tanto, permitir la degradación de TEN mediada por DNasa113 en pacientes una estrategia terapéutica novedosa y prometedora para las enfermedades inflamatorias.

Materiales y procedimientos

Plasma del paciente

Se obtuvieron muestras de plasma citratado de pacientes durante el brote de STEC-HUS de 2011 en Alemania (16). Los criterios de inclusión en nuestro estudio fueron la identificación positiva de STEC/enterohemorrágica *E. coli* o diarrea sanguinolenta, recuento de plaquetas $\leq 150 \times 10^9$ /L o disminuido en $\geq 25\%$ en 1 semana, evidencia de hemólisis (LDH por encima del límite normal, haptoglobina por debajo del límite normal o presencia de esquistocitos) y estadio de lesión renal aguda ≥ 1 .

Tejido humano

Los tejidos humanos se fijaron a temperatura ambiente durante la noche en formalina tamponada con fosfato al 5%. Todos los tejidos se recogieron en la autopsia y nos fueron remitidos originalmente con fines diagnósticos y estudiados de acuerdo con los principios éticos nacionales. La causa de muerte de los pacientes se indica en la FIG. 10.

Ratones

Todos los ratones tenían un fondo genético C57BL/6. Cruzamos ratones DNasa1^{-/-} y DNasa1-similar a 3^{-/-} descritos previamente (26,28) para generar ratones DNasa1/DNasa113^{-/-}. Recientemente se ha informado de que esta cepa de ratones DNasa1^{-/-} contiene una mutación en el gen *DNasa1* superpuesto *Trap1/Hsp75*, que codifica una chaperona mitocondrial (29). Por lo tanto, incluimos una cepa DNasa1^{-/-} alternativa (30) para generar ratones DNasa1/DNasa113^{-/-} para los experimentos de control (FIG. 15A - FIG. 15C).

Detección de DNasa1 por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (DPZ)

Realizamos DPZ, como se ha descrito previamente con modificaciones (19). En resumen, se prepararon geles de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida con geles de apilamiento al 4% (v/v) sin ADN y geles de resolución al 10% (v/v) con 200 μ g/ml de ADN de testículos de salmón (Sigma- Aldrich, Alemania). Para la detección de DNasa1, se mezclaron 0,5 μ l de suero murino con 14,5 μ l de agua y 5 μ l de amortiguador de carga de gel SDS (BioRad, Alemania). La mezcla se hirvió durante 5 minutos y se cargó en los geles. La electroforesis se realizó a 120 V mediante el uso del amortiguador de electroforesis Tris/glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,7). Tras la electroforesis, las proteínas se volvieron a plegar incubando los geles durante una noche a 37 °C en un amortiguador de plegado que contenía 5% (p/v) de leche en polvo, 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 3 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin. Los geles se transfirieron a un amortiguador de plegado sin leche en polvo y se

incubaron durante 24 horas adicionales a 37°C. El ADN se marcó fluorescentemente con 1x SYBR Safe (Thermo Scientific, Alemania) y las imágenes fluorescentes de los geles se registraron mediante el uso de un escáner de fluorescencia (Molecular Imager FX, BioRad, Alemania).

Detección de DNasa113 por DPZ

- 5 Para la detección de DNasa113, se mezclaron 2 µl de suero con 12 µl de agua, 5 µl de amortiguador de carga en gel SDS y 1 µl de beta-mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich). La BME reduce los puentes disulfuro de la DNasa1, lo que provoca su inactivación (11). La mezcla se hirvió durante 5 minutos y se cargó en los geles. La electroforesis se llevó a cabo como se ha descrito para la DNasa1. El SDS se eliminó lavando los geles con 10 mM Tris/HCl pH 7,8 durante 30 minutos a 50°C dos veces. Las proteínas se volvieron a plegar incubando los geles durante 48 horas a 37°C en un amortiguador de plegado que contenía 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 1 mM BME, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. A continuación, los geles se incubaron durante 48 horas más a 37 °C en amortiguador de plegado suplementado con 3 mM CaCl₂ y 3 mM MnCl₂. La adición de Mn²⁺ es necesaria para permitir una degradación eficaz del ADN libre de proteínas por la DNasa113 (11). El ADN se marcó y se visualizó como se describe para la DNasa1.

Detección de la actividad DNasa total por medio del ensayo de difusión enzimática radial simple (SRED)

- 15 Para medir la actividad DNasa total, disolvimos 55 µg/ml de ADN de testículos de salmón en un amortiguador que contenía Mn²⁺ (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MnCl₂, 2 mM CaCl₂, y 2x SYBR Safe). La solución de ADN se calentó a 50°C durante 10 minutos y se mezcló con un volumen igual de agarosa ultrapura al 2% (Thermo Scientific). La mezcla se vertió en bandejas de plástico y se almacenó a temperatura ambiente hasta su solidificación. Se cargaron 2 µl de suero murino en pocillos de 1,0 mm de diámetro. Los geles se incubaron durante 4 horas a 37°C en una cámara húmeda. La fluorescencia del ADN de los geles se registró con un escáner de fluorescencia.

Ensayo de degradación de TEN in vitro

- La degradación de TEN se analizó como se ha descrito previamente (19). Los neutrófilos humanos purificados en DMEM sin suero se sembraron en placas estériles de 96 pocillos (Falcon, BD Technologies, Alemania) recubiertas con polilisina al 0,001% (Sigma) a una concentración de 5×10^4 células por pocillo. Para inducir la formación de TEN, los neutrófilos se activaron con 100 nM de forbol 12-miristato 13- acetato (PMA; Sigma-Aldrich) durante 4 h a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad. Se añadió solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se almacenaron las placas de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Las TEN se lavaron con PBS, se trataron durante 5 minutos con PBS que contenía 0,5% de Triton X-100 y se lavaron de nuevo con PBS. Las TEN se incubaron con un 10% de suero murino o un 10% de plasma humano citratado suplementado con 10 µM de PPACK (Santa Cruz, Heidelberg, Alemania) en HBSS con cationes divalentes (HBSS+; Thermo Scientific). Las TEN se dejaron degradar durante 3 horas a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad. Se desecharon los sobrenadantes y se detuvo la degradación de TEN añadiendo PFA al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó el PFA y las TEN no degradadas se marcaron fluorescentemente añadiendo 2 µM del colorante fluorescente de ADN SytoxGreen (Thermo Scientific) en PBS. Las imágenes de las TEN teñidas con fluorescencia se adquirieron con un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 200M, Zeiss, Alemania). Cuantificamos las TEN no degradadas registrando la intensidad de fluorescencia con un lector de placas (Excitación: 485 nm; Emisión: 535 nm) o midiendo el área de cobertura de las TEN en imágenes de microscopía mediante el uso del software ImageJ (NIH, EE.UU.).

Preparación de vectores de expresión in vivo

- Utilizamos el plásmido pLIVE (Mirus Bio, EE.UU.) para expresar proteínas en ratones. El vector permite una expresión duradera y específica de las proteínas en los hepatocitos. Generamos plásmidos pLIVE con murinos *DNasa1*, *DNasa13* y *CSF3*. Para la murina *DNasa1*, se realizó una PCR del ADNc (número de acceso al Genbank NM010061) mediante el uso del par de cebadores DNasa1-F 5'-GTCGACATGCGGTACACAGG (SEQ ID NO:27) y DNasa1-R 5'-CTCGAGTCAGATTTTCTGAGTGTC (SEQ ID NO:28) que contenían sitios de restricción Sall y XhoI. Para la *DNasa113*, se realizó una PCR del ADNc (número de acceso al Genbank AF047355) mediante el uso del par de cebadores DNasa113-F 5'-GAAGTCCCAGGAATTCAAAGATGT (SEQ ID NO:29) y DNasa113-R 5'-GCGTGATACCCGGGAGCGATTG (SEQ ID NO:30) que contienen sitios de restricción BamHI y SacI. Ambos ADNc se clonaron mediante el uso de la ligasa T4 (New England Biolabs, Alemania) en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pLIVE, que fue predigerido con las enzimas apropiadas. El vector pLIVE que contenía la DNasa113 se sometió a mutagénesis dirigida al sitio con el par de cebadores mutDNasa113-F 5'-AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA (SEQ ID NO:31) y su complementario mutDNasa113-R 5'-TGCAGGGACATGGGGCCGGGAGTCGACT (SEQ ID NO:32) con el fin de igualar la secuencia consenso de Kozak y optimizar la expresión de la proteína. La generación del vector pLIVE que contiene elADNc de *CSF3* fue subcontratada (Eurofins Genomics, Alemania). El ADNc de *CSF3* (número de acceso al Genbank BC120761) se insertó en el MCS entre los sitios de restricción Sall y XhoI. La secuencia de todos los vectores generados se confirmó por medio de secuenciación de ADN de doble cadena. Como control utilizamos el plásmido pLIVE parental sin inserciones adicionales. Todos los plásmidos se purificaron mediante el uso del kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep y las posibles contaminaciones de endotoxinas se eliminaron mediante el uso de columnas de centrifugado de alta capacidad para la eliminación de endotoxinas (ambas Thermo Scientific).

Expresión in vitro de murinas DNasa1 y DNasa1I3.

Los plásmidos que contienen el ADNc para DNasa1 o DNasa1I3, descritos en otro lugar se transfectaron en células de riñón embrionario humano (REH) con Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) en condiciones libres de suero con medio DMEM (Thermo Scientific) suplementado con un 10% de sustitución de suero KnockOut (Thermo Scientific). Tras 72 horas, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 500 xg durante 10 minutos, se filtraron estérilmente y se concentraron por ultracentrifugación con columnas 3K (Amicon Ultra, Millipore, Darmstadt, Alemania).

Expresión génica in vivo

Los plásmidos pLIVE que contenían *DNasa1*, *DNasa1I3*, *CSF3*, o plásmidos de control vacíos se administraron a ratones por medio de inyección hidrodinámica en la vena de la cola. En resumen, se diluyeron 50 µg de plásmido en solución salina al 0,9% en un volumen equivalente al 10% de la masa corporal del ratón. Se anestesió a los ratones con isoflurano y, a continuación, se inyectó la solución plasmídica por vía intravenosa durante 5 a 8 segundos a través de la vena de la cola. En raras ocasiones, los ratones no se recuperaron totalmente de la inyección en las primeras 24 horas y estos animales fueron excluidos del estudio. Para los estudios de coexpresión, se mezclaron 50 µg del plásmido *CSF3* con 50 µg del plásmido de control vacío, o los plásmidos que contenían *DNasa1* y *DNasa1I3*. La solución que contenía ambos plásmidos se administró por medio de inyección hidrodinámica en la vena de la cola.

Neutrofilia crónica

Se inyectaron ratones hembra de 4 semanas u 8-12 semanas de edad con 50 µg del plásmido pLIVE que contenía *CSF3* para inducir la sobreexpresión de G-CSF y la neutrofilia. Los ratones fueron monitorizados cada 8 horas durante la primera semana tras la inyección, y diariamente después. La temperatura se midió en la zona perianal con un termómetro infrarrojo sin contacto (Etekcity, Alemania). Para los estudios de supervivencia, los ratones fueron eutanasiados y calificados como "no supervivientes" si los animales mostraban signos de angustia (ausencia de movimiento espontáneo, ojos cerrados, jadeo ocasional). En todos los casos, estos signos de angustia se acompañaron de una hipotermia grave y de rápida progresión, definida como una disminución de la temperatura corporal de $\geq 4^{\circ}\text{C}$ en comparación con la temperatura corporal antes de la inyección del plásmido, y con hematuria. Los ratones no hipotérmicos no mostraron signos de sufrimiento y fueron eutanasiados al final del experimento. Para la recogida de órganos, sangre y orina, analizamos cuatro grupos de tres ratones *D1/D1L3*-. A los ratones de cada grupo se les inyectó una mezcla de *CSF3* con plasma vacío, *DNasa1*, o *DNasa1I3*. Cada grupo de ratones fue eutanasiado para la recogida de muestras biológicas cuando el primer animal del grupo mostró signos de sufrimiento, hipotermia grave y hematuria. Este punto temporal se definió como "exitus" y se produjo entre 3 y 6 días después de la inyección.

Disminución de plaquetas

Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 2 µg/g de anticuerpo depletor de plaquetas o anticuerpo de control del isotipo (ambos Emfret, Alemania). Este tratamiento elimina de la circulación más del 95% de las plaquetas. El tratamiento se inició 24 horas después de la inyección de *CSF3* y se repitió cada 48 horas hasta la finalización del experimento.

Inhibición de la trombina

Se mezcló dabigatrán etexilato en polvo (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, Alemania) con pienso normal en polvo (Altromin, Alemania) a una dosis de 40 mg/g. Los gránulos se prepararon mezclando el polvo con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. La alimentación de dabigatrán se inició 24 horas después de la inyección de *CSF3*. Los ratones WT alimentados con la dieta de dabigatrán durante 1 día mostraron un tiempo de tromboplastina parcial activada $6,48 \pm 1,19$ veces mayor (media $\pm$ DE, N=4) en comparación con los ratones que recibieron la dieta normal sin dabigatrán (prueba t de Student; $P < 0,001$).

Preparación de bacterias para la septicemia

Escherichia coli (XEN 14, Perkin Elmer) se cultivó durante la noche en medio de caldo de lisogenia que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Las bacterias se precipitaron por centrifugación a $4000 \times g$ durante 10 minutos, se lavaron y se resuspendieron en PBS. Se incubaron alícuotas de $1,5 \times 10^9$ bacterias/ml a 70°C durante 15 minutos para matarlas por calor. Alícuotas almacenadas a -20°C hasta su uso posterior.

Septicemia

Ratones macho de 8-15 semanas de edad recibieron tres inyecciones intraperitoneales diarias de 1 µg/g de LPS de *Salmonella enterica* serotipo *thyphimurium* (Sigma-Aldrich) en solución salina al 0,9%. Junto con la tercera inyección de LPS, los ratones recibieron una inyección intravenosa de $1,5 \times 10^7$ *E.coli*/g. El tiempo de supervivencia mostrado indica el tiempo transcurrido tras la inyección de *E.coli*. Se recogieron sangre y órganos en el momento de la eutanasia. No se obtuvieron suficientes muestras biológicas de dos animales ($1 \times D1/D1L3$ - + *Ctrl*, $1 \times D1/D1L3$ - + *D1L3*) para realizar el análisis completo mostrado en la FIG. 4A-FIG 4I. Los ratones fueron eutanasiados y calificados como "no supervivientes" si mostraban signos de sufrimiento grave (irresponsabilidad al tacto). Todos los ratones que

no sobrevivieron mostraron hematuria y palidez en las extremidades. Todos los ratones supervivientes fueron eutanasiados y puntuados como "supervivientes" 24 horas después de la inyección intravenosa de *E.coli* muerto por calor.

Recogida de sangre, plasma y tejidos murinos

- 5 La sangre se extrajo por punción submandibular o por el seno retroorbitario. La sangre se recogió en tubos de suero de 200 µl (Monovette; Sarstedt, Alemania) y en tubos de EDTA de 200 µl (GK 150, KABE labortechnik, Alemania). El plasma se obtuvo recogiendo el sobrenadante de la sangre tras centrifugación a 3000 × g durante 15 minutos. El suero se obtuvo dejando coagular la sangre durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación durante 15 minutos a 3000 × g. Las muestras de suero y plasma se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su uso posterior.
- 10 Para el análisis de los órganos, se perfundió a los ratones por medio de infusión intracardiaca de PBS. Se recogieron los órganos y se fijaron durante 24 horas en PFA al 4% a 4°C. Los órganos fijados se incluyeron en parafina.

Análisis de sangre y plasma

- 15 LDH, AST, ALT, creatinina y NUS en plasma se cuantificaron mediante el uso de kits estandarizados (Biotron Diagnostics, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El G-CSF de ratón se cuantificó con un kit ELISA Quantikine (I+D, Reino Unido). La hemoglobina en sangre EDTA se cuantificó por medio de un hemocitómetro automatizado (Idexx ProCyt Dx Hematology Analyzer, Países Bajos). Para cuantificar los neutrófilos por medio de FACS, la sangre total se incubó en hielo durante 15 minutos con 0,2 µg de anti-ratón CD11b marcado con ficoeritrina (M1/70, Biolegend, Alemania) y 0,5 µg de anti-ratón Ly6G marcado con Alexa Fluor 488 (1AB, Biolegend, Alemania).
- 20 A continuación, la sangre se diluyó con 0,5 ml de PBS y se analizó con un FACSCalibur (BD Bioscience, EE.UU.). Se prepararon frotis de sangre anticoagulada con EDTA en portaobjetos recubiertos de polilisina (Hecht Assistant, Alemania). Tras secarse al aire, se incubaron durante 1 minuto en metanol suplementado con 1µM de SytoxGreen sobre hielo seco o se tñieron con Giemsa mediante el uso de un kit comercial (In Vitro Diagnostikum, Alemania).

Tinciones de inmunofluorescencia

- 25 Las secciones incluidas en parafina se desparafinaron, se rehidrataron y se sometieron a recuperación de antígenos durante 25 minutos a 100 °C en amortiguador citrato (citrato sódico 10 mM, 0,1% de Tween, pH 6). A continuación, las secciones se bloquearon durante 30 minutos con suero de cabra normal al 2,5% (Vector, Reino Unido), seguido de una incubación con un kit de bloqueo ratón sobre ratón (Vector) durante una hora. A continuación, las secciones se incubaron durante la noche a 4 °C con 2 µg/ml del anticuerpo primario contra MPO (A0398, Agilent, Alemania), PARC (PA-CRLP-100, Innovagen, Suecia), histona 3 citrulinada (ab5103, Abcam, Reino Unido), fibrina [clon 59D8] o el complejo de histonas H2A, H2B y ADN para detectar la cromatina (2). Las secciones se incubaron con anticuerpos
- 30 IgG anti-conejo y anti-ratón conjugados con AlexaFluor488 o AlexaFluor555 (todos Thermo Scientific) durante 1 hora. Tras el lavado, se marcó el ADN con 1 µg/ml de DAPI durante 2 minutos. La autofluorescencia se apagó por medio de una incubación de 25 minutos con negro de Sudán (0,1% en etanol al 70%), y las secciones se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech, EE.UU.). Las imágenes de las secciones marcadas con fluorescencia se
- 35 adquirieron con un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 200M, Zeiss, Alemania) o un microscopio confocal (TCS SP5, Leica, Alemania). Las imágenes de los coágulos TEN se cuantificaron por medio de software (ImageJ). Un área de tinción de FvW o fibrina inferior al 3% de los coágulos TEN se consideró negativa.

Inmunohistoquímica

- 40 Tras la recuperación de antígenos, las secciones desparafinadas se bloquearon durante 30 minutos con suero de caballo normal al 2,5% (Vector). Las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con 2 µg/ml del anticuerpo primario contra la elastasa de neutrófilos (ab68672, Abcam). Tras el lavado, las secciones se tñieron con el kit anti-conejo IgG-AP, (ImmPRESS, Vector) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones se tñían con hemalum (Merck, Alemania) y se montaban con Neo-Mount media (Merck). Las imágenes de las secciones teñidas se adquirieron con un microscopio invertido (Axiovert 200M, Zeiss).

Generación de coágulos TEN in vitro

- 45 Los neutrófilos humanos purificados se sembraron en placas de cultivo tisular a 3×10^7 células / ml en DMEM suplementado con 2% de BSA. Las células se activaron con 0,1 µM de PMA durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ con humedad y condiciones de rotación (300 rpm). Se utilizaron neutrófilos no estimulados y neutrófilos activados con PMA en presencia de 10 U/ml de DNasa1 humana recombinante (dornasa alfa, Roche, Alemania) como controles.
- 50 Los coágulos TEN se fijaron con PFA al 2% durante la noche a 4°C. Los coágulos TEN fijados se embebieron en parafina y las secciones se tñieron para TENs como se ha descrito anteriormente.

Evaluación estadística

- 55 Los datos se muestran como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism (GraphPad, EE.UU.) e incluyó la prueba t de Student, ANOVA unidireccional y bidireccional seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, y la prueba de intervalos logarítmicos. Los resultados se consideraron significativos a $P < 0,05$.

Películas

La neutrofilia crónica se tolera en ratones de tipo salvaje. Una película generada muestra los ratones de tipo salvaje una semana después de la inyección de un plásmido de expresión de CSF3 (CSF3) o un plásmido de control que carece de CSF3 (Ctrl). Ambos animales muestran un comportamiento normal y ningún signo de angustia.

- 5 La neutrofilia crónica causa angustia en ratones que carecen de DNase1 y DNase1L3. La película muestra ratones DNase1/DNase1L3-/- expresando CSF3 con un plásmido de control (CSF3/Ctrl), con DNase1 (CSF3/D1), o con DNase1L3 (CSF3/D1L3). Los ratones que expresan DNases circulantes, DNase1 o DNase1L3, muestran un comportamiento normal. Los ratones que carecen de DNases circulatorias (CSF3/Ctrl) muestran signos de angustia (ausencia de movimiento espontáneo, ojos cerrados, jadeo ocasional).

Referencias

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, *Inflamación aguda y crónica*. En Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), cap. II. 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).
- 15 3. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PALM 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. *La ciencia*. 342, 863-866 (2013).
- 20 5. S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13, 463-469 (2007).
6. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Las trampas de ADN extracelular promueven la trombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15880-15885 (2010).
- 25 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, La trombosis como efector intravascular de la inmunidad innata. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34-45 (2013).
- 30 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. El deterioro de la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos está asociado a la nefritis lúpica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9813-9818 (2010).
- 35 11. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezhrab, 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).
- 40 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).
- 45 14. M. Demers, D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, D. D. Wagner, Los cánceres predisponen a los neutrófilos a liberar trampas extracelulares de ADN que contribuyen a la trombosis asociada al cáncer. *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. Características clínicas de los pacientes críticos con síndrome urémico hemolítico inducido por toxina Shiga. *Crit. Cuidado. Med.* 41, 1702-1710 (2013).

18. M. Jiménez-Alcázar, 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. Maueroeder, S. Hirth, S. Nowecki, C. Gunther, U. Billmeier, S. Paulus, M. Biermann, L. E. Muñoz, 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, Trastornos hemodinámicos, enfermedad tromboembólica y shock. En Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), cap. II. 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. Una variante de pérdida de función en DNASE1L3 causa una forma familiar de lupus eritematoso sistémico. *Nat. Genet.* 43, 1186-1188 (2011).

24. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda. Mutación de DNASE1 en personas con lupus eritematoso sistémico. *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. *Sangre* 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. Friendewey, R. H. Friedel, F. G. Grosveld, J. Hansen, Y. Herauld, 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. Ramírez-Solís, D. E. Rancourt, M. Raspa, J. E. Rencle, M. Ringwald, B. Rosen, N. Rosenthal, J. Rossaint, 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. Genoma* 23, 580-586 (2012).

Ejemplo 2: Desarrollo y uso de DNase1L3 y variantes para terapia

Introducción

La inflamación incontrolada causa una plétora de afecciones (7). Las trampas extracelulares de neutrófilos (TEN) son filamentos de ADN decorados con proteínas tóxicas (2). Las TEN protegen contra las infecciones microbianas, pero la

formación excesiva de TEN desencadena y exacerba las enfermedades inflamatorias y autoinmunes (3). La DNasa1 (D1), una enzima que degrada el ADN y se encuentra en la sangre, se ha utilizado ampliamente para desarmar TENs in vitro e in vivo. De hecho, la infusión de D1 humano recombinante, un fármaco aprobado por la FDA (dornasa alfa) para la fibrosis quística (FQ), previene los efectos patológicos de las TEN en varios modelos de enfermedad (3), lo que respalda el uso de D1 para la terapia profiláctica.

La DNasa1-similar a 3 es un nuevo fármaco candidato para las enfermedades asociadas a la TEN

En el Ejemplo 1, descubrimos que además de D1, DNasa1-similar a 3 (D1L3) también degrada TENs. Ambas enzimas mantienen la homeostasis sanguínea y tisular durante las respuestas inflamatorias. En resumen, demostramos que las TEN se generan en los vasos sanguíneos durante la neutrofilia, una característica distintiva de la inflamación, tanto en condiciones estériles como infecciosas. D1 y D1L3 escinden TENs y así previenen la agregación de filamentos de ADN de TENs a coágulos vasculares. En ausencia de D1 y D1L3, los coágulos de TENs obstruyen el flujo sanguíneo y causan daños en los órganos y la muerte. Los coágulos TEN se forman independientemente de las plaquetas o la fibrina, por lo que son resistentes al tratamiento antitrombótico convencional. Así, descubrimos coágulos de TENs como un nuevo mecanismo de oclusión vascular y D1L3 una nueva terapia profiláctica contra TENs (ver **Ejemplo 1**).

D1 y D1L3 pertenecen, junto con DNasa1-similar a 1 (D1L1) y DNasa1-similar a 2 (D1L2), a la familia de proteínas DNasa1 (4). D1 y D1L3 se expresan en una variedad de especies, incluyendo humanos, primates y roedores. D1 se expresa predominantemente en el tracto gastrointestinal y las glándulas exocrinas (5), mientras que las células hematopoyéticas, concretamente los macrófagos y las células dendríticas producen D1L3 (6, 7). Encontramos ambas DNasas en bajas concentraciones en suero de ratones y humanos (Ejemplo 1, **FIG. 14**), pero se desconoce el origen de D1 y D1L3 en circulación (7, 8). D1 escinde preferentemente ADN libre de proteínas (por ejemplo, ADN bacteriano, ADN plasmídico), mientras que D1L3 se dirige a la cromatina, el complejo de ADN e histonas, que se encuentra habitualmente en el núcleo de las células eucariotas (7, 9, 10). La actividad D1 se inhibe al unirse a actina monomérica y es sensible a concentraciones fisiológicas de sal (11-13). Además, D1 está glicosilada en N40 (corresponde a N18 en la enzima madura sin péptido señal) y N128 (N106), lo que hace que la enzima sea resistente a la inactivación por proteasas séricas (9). En cambio, D1L3 carece de sitios de glicosilación y de unión a actina, lo que provoca su susceptibilidad a varias proteasas y su resistencia a la actina, respectivamente (9).

D1 se descubrió por primera vez en fluidos corporales del tracto gastrointestinal y la orina, participando en la digestión del ADN procedente de la ingesta de alimentos. En el curso de esta divulgación observamos que la DNasa1 administrada sistémicamente (por ejemplo, por medio de inyección intraperitoneal o intravenosa) tiene una semivida relativamente corta en circulación y se secreta en forma enzimáticamente activa en la orina e, inesperadamente, en la bilis. Su secreción en el líquido biliar abre la oportunidad de atacar el ADN extracelular y/o las TENs en el conducto biliar por medio de la terapia sistémica con DNasa1.

D1L3 se describió por primera vez en el contexto de la muerte celular programada (14). D1L3 presenta dos sitios de localización nuclear (SLN1, SLN2). SLN2 está incrustado en una cola C-terminal que es exclusiva de D1L3 y no está presente en D1. Ambos SLN dirigen la enzima al núcleo durante la apoptosis (14). De hecho, el D1L3 intracelular es necesario para la fragmentación del ADN nuclear en células apoptóticas y necróticas *in vivo* (15). D1L3 requiere su cola C-terminal para degradar ADN extracelular, concretamente ADN encapsulado en lípidos, como el que se encuentra en las transfecciones, y cromatina dentro de cuerpos apoptóticos (7, 10). En las transfecciones, el ADNc y los lípidos catiónicos forman un complejo que penetra a través de la membrana plasmática de las células diana. D1L3 interfiere con las transfecciones y la cola C-terminal es crítica para esta función (10). Los cuerpos apoptóticos, vesículas lipídicas llenas de cromatina procedentes de células apoptóticas, son sustratos fisiológicos de D1L3 (7). En este caso, la cola C-terminal permite a D1L3 penetrar a través de las membranas lipídicas de los cuerpos apoptóticos y degradar la carga de cromatina. Es importante destacar que la cola C-terminal también es necesaria para la degradación de la cromatina extracelular libre de lípidos por D1L3 (7). Se cree que la cola C-terminal es crítica para las funciones de D1L3 en el espacio extracelular.

Mientras que hD1 se dirige eficazmente contra las TENs en modelos animales, principalmente ratones, ha mostrado un efecto terapéutico limitado o nulo en ensayos clínicos de FQ (16) y enfisema (17), respectivamente. En la FQ se forman TENs (18), lo que indica que la hD1 de tipo salvaje no es óptima para dirigir TENs en pacientes. Se han generado variantes hiperactivas para eludir las limitaciones terapéuticas de D1, pero su fabricación clínica supone un reto (12). En particular, el TEN-ADN contiene histonas y está organizado estructuralmente como la cromatina (2). Así, especulamos que la degradación eficiente de la cromatina es necesaria para una terapia óptima contra las TENs.

Se ha descrito una terapia combinatoria de hD1 y activador tisular del plasminógeno (tPA, alteplasa) de pacientes con enfisema (17). Los datos concuerdan con nuestra hipótesis porque el tPA permite a D1 degradar la cromatina in vitro (19). El documento US 9,642,822, desvela además la terapia de combinación con tPA y D1 para el objetivo terapéutico de TENs (20). Sin embargo, el tratamiento con tPA suele asociarse a un mayor riesgo de hemorragia debido a su actividad fibrinolítica (17). La proteína D1L3 puede proporcionar una estrategia más segura para atacar las TEN sin poner a los pacientes en riesgo de hemorragia, pero no se ha explorado una terapia con la proteína D1L3.

Ingeniería de variantes de DNasa1 y DNasa1-similar 3 por medio de transferencia de aminoácidos

En este Ejemplo generamos variantes de D1 y D1L3 que están diseñadas para terapia contra cromatina extracelular (incluyendo TENs). Para diseñar variantes, planteamos la hipótesis de que la capacidad de la D1L3 humana para degradar la cromatina está codificada por aminoácidos individuales y/o secuencias de aminoácidos, que están ausentes en la D1 humana. Además, especulamos que la transferencia de estos aminoácidos individuales y/o una secuencia de aminoácidos de la D1L3 humana a la D1 genera variantes de D1 hiperactivas con una mayor actividad de degradación de la cromatina. Del mismo modo, las propiedades enzimáticas (por ejemplo, la glicosilación) pueden transferirse de D1 a D1L3. Para probar nuestra hipótesis, empleamos mutaciones convencionales de aminoácidos y desarrollamos una novedosa tecnología de bloques de construcción (BC) para diseñar variantes de DNAsas de la familia de proteínas DNasa1.

Para producir variantes de D1 y D1L3, se utilizaron sistemas de expresión in vitro [por ejemplo, células de ovario de hámster chino (OHC), células de riñón embrionario humano (REH), *Pichia pastoris*]. La actividad enzimática se caracterizó mediante el uso de la degradación de ADN de alto peso molecular (APM) como lectura (**FIG. 16**). Elegimos dos tipos de ADN APM: (a) ADN de doble cadena (dsADN) aislado de testículos de salmón. La degradación del HMW-dsDNA se analizó por medio de zimografía; (b) cromatina de núcleos purificados de células HEK293. Para analizar su degradación, la cromatina APM se incubó primero con las variantes de DNasa, tras lo cual se aisló el ADN y se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa (EGA). La degradación de la cromatina se detectó por medio de ADN de bajo peso molecular (BPM). En esta configuración, D1 humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) tiene una actividad aproximadamente 100 veces mayor para degradar dsADN que la D1L3 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2), mientras que la D1L3 de tipo salvaje degrada la cromatina con aproximadamente 100 veces más eficiencia que la D1 de tipo salvaje (**FIG. 16**). Encontramos efectos sinérgicos de D1 y D1L3 en la degradación de la cromatina, pero no del dsADN. Si D1 y D1L3 se mezclan en una proporción de 10: 1 o 1: 1, observamos un aumento de la degradación de la cromatina, en comparación con cada D1 o D1L3 solos (**FIG. 16**). Así pues, buscamos variantes de D1 y/o D1L3, que muestran una mayor actividad degradadora de cromatina y/o dsADN.

Las variantes D1 y D1L3 seleccionadas se probaron además para degradar TENs intravasculares, mediante el uso de un sistema de expresión in vivo para miembros de la familia de proteínas D1. Véase el documento PCT/EP2018/051444. El sistema se basa en dos componentes, (a) un plásmido de expresión que permite la transfección estable in vivo de hepatocitos con ADNc de D1, D1L3 y sus variantes en ratones receptores, y (b) *Dnasa1^{-/-}Dnasa1i3^{-/-}* ratones deficientes, que se caracterizan por la ausencia de actividad DNasa en el suero. En resumen, el ADNc de las DNAsas candidatas se clona en el vector de expresión hepática. A continuación, el vector es co-expresado en ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1i3^{-/-}* deficientes en conjunto con el ADNc de *Csf3 murina*, el cual codifica para el factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF). La expresión de *Csf3* induce neutrofilia con formación concomitante de TEN intravasculares, que a su vez causa la agregación de TENs no digeridos dentro de los vasos sanguíneos y la muerte en ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1i3^{-/-}*. Para identificar fármacos candidatos, buscamos D1, D1L3 y sus variantes que degradan eficazmente las TEN y, por tanto, previenen la morbilidad y la mortalidad en este modelo.

Resultados

Ingeniería de variantes de DNasa1 por medio de sustituciones convencionales de aminoácidos

Nuestra hipótesis central es que la capacidad de D1L3 humana para degradar cromatina está mediada por aminoácidos que no están presentes en D1. La alineación de secuencias mostró que el 44% de los aminoácidos en D1 humano y D1L3 humano son idénticos (**FIG. 17**). Mutamos exclusivamente aminoácidos variables (56% de aminoácidos no compartidos) para generar las variantes D1 y DL3.

D1L3 es una proteína catiónica con un punto isoelectrónico de 9,35, mientras que D1 y los demás miembros son proteínas más básicas. Por lo tanto, especulamos que la naturaleza catiónica de D1L3 permite a la enzima degradar la cromatina. Por medio de la alineación de secuencias, identificamos 37 residuos de arginina o lisina en los aminoácidos variables, ausentes en D1 (**FIG. 17**). Estos residuos de aminoácidos se localizan en las posiciones 29 (posición 9 con el péptido señal), 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) con respecto a SEQ ID NO: 2.

Veintiséis de estos residuos adicionales de arginina o lisina en D1L3 corresponden a las siguientes posiciones de aminoácidos en D1 (SEQ ID NO: 1): 31 (posición 9 con el péptido señal), 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) y 280 (260). Además, D1L3 presenta 3 sitios de inserciones de residuos de arginina o lisina: R80, K226 y una cola C-terminal (después de la posición de aminoácidos 282 en SEQ ID NO: 2), que presenta 3 residuos de arginina y 6 de lisina.

Nuestro objetivo era transferir los residuos de arginina y lisina que forman parte del cuerpo central de D1L3 a D1 introduciendo las siguientes mutaciones en D1 de tipo salvaje (**FIG. 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, y K280M con respecto a SEQ ID NO:1, generando así 28 variantes de D1.

En este Ejemplo, pudimos generar variantes D1 que contienen 23 de las 28 sustituciones de aminoácidos. Expresamos el ADNc de estas variantes D1 en células HEK293 y analizamos la actividad degradadora de dsADN y cromatina en los sobrenadantes de cultivo. Observamos que las siguientes modificaciones de aminoácidos aumentaban parcialmente la actividad degradadora de la cromatina, mientras que no se observaron diferencias importantes en la degradación del dsADN (**FIG. 19**): Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R. Curiosamente, D1 de ratón y rata (SEQ ID NO: 4), que comparten el 79% y el 78% de los aminoácidos de la D1 humana, respectivamente, presentan varias de las sustituciones de aminoácidos analizadas, entre ellas Q31R, Q49K y Q79K (**FIG. 20**). El análisis de sobrenadantes de células HEK293 que expresan D1 murino y D1 humano mostró que el D1 murino tiene una mayor actividad para degradar la cromatina, en comparación con el D1 humano (**FIG. 21**). Inyectamos ratones *Dnasa1⁺Dnasa1/3⁻* con una mezcla de *Csf3* y D1 murino (*mDnasa1*, SEQ ID NO: 3), D1 humana (*hDnasa1*, SEQ ID NO: 1), o un plásmido de control vacío (*Ctrf*). Los ratones que recibieron el plásmido de control murieron en 7 días, mientras que la expresión de D1 murino proporcionó una protección completa durante al menos 28 días (**FIG. 21**). Inesperadamente, la expresión de D1 humano sólo mostró una protección parcial frente a la muerte y más de la mitad de los animales murieron a los 14 días (**FIG. 21**), lo que indica que la D1 humana es menos eficaz en la degradación de las TEN intravasculares que la D1 murina. Ahora mutamos Q31R, Q49K, Q79R y W209R en la D1 humana para generar una variante D1 similar a la murina (SEQ ID NO: 5). Se realizaron un total de seis mutaciones (Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, G262K) para generar una variante D1 similar a la rata (SEQ ID NO: 6). Ambas variantes D1 similares a roedores se clonaron en el vector de expresión de hepatocitos y se administraron junto con *Csf3* en ratones *Dnasa1⁺Dnasa1/3⁻*. Observamos que la terapia génica con la variante de D1 similar a la de murinos y ratas proporcionaba una protección completa contra las oclusiones vasculares y la muerte mediadas por TEN (**FIG. 22**). Es importante destacar que la expresión in vitro de las variantes D1 humanas similares a roedores mostraron una mayor actividad para degradar la cromatina (**FIG. 22**). En conjunto, los datos ilustran que (a) la D1 humana tiene una capacidad limitada para degradar TENs in vivo; (b) la transferencia de múltiples aminoácidos catiónicos de la D1L3 humana a la D1 humana genera variantes hiperactivas.

Se han realizado varios intentos de generar variantes hiperactivas de D1 (6, 12, 13, 21-29). Encontramos 184 mutaciones, que alteraban 82 de los 282 aminoácidos de la D1 humana de tipo salvaje (**FIG. 23**). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos del D1 humano de tipo salvaje y del D1L3 humano reveló tres mutaciones de ganancia de función en el D1 humano que ya están presentes en el D1L3 humano de tipo salvaje (**FIG. 23**): Q31R (corresponde a Q9R en D1 sin péptido señal), T227K (T205K) y A136F (A114F). Mientras que las mutaciones Q31R y T227K pueden alterar las propiedades de unión al ADN de hD1 y causar así hiperactividad, A136F confiere resistencia a la inhibición por actina monomérica (21-24, 26, 29).

Diseñamos una nueva variante D1 que porta la combinación de Q31R/T227K/A136F (SEQ ID NO: 7) y se comparó su actividad enzimática con la del tipo salvaje D1 (SEQ ID NO: 1), así como a las variantes D1 que portan mutaciones únicas en Q31R, T227K, A136F, o una mutación combinada en Q31R y T227K (SEQ ID NO: 8). Hemos caracterizado la actividad de degradación del dsADN y de la cromatina en los sobrenadantes de cultivo de células HEK293 transfectadas. No observamos diferencias importantes en la actividad de degradación del dsADN con las variantes D1 portadoras de mutaciones simples o combinadas de Q31R y T227K (**FIG. 24**). Curiosamente, la cromatina se degradó parcial y totalmente en los mutantes A136F y en la mutación combinacional de Q31R/T227K/A136F, respectivamente (**FIG. 24**). A continuación, probamos si el Q31R/T227K/A136F variante de D1 es capaz de prevenir oclusiones vasculares letales mediadas por TEN en *DNasa1⁺DNasa1/3⁻* neutrofílicas. Todos los ratones que recibieron un plásmido de control sin DNAsas murieron, mientras que todos los ratones que expresaron la variante D1 (SEQ ID NO: 7) sobrevivieron hasta el final del experimento sin mostrar signos de angustia (**FIG. 24**). Mediante el uso de proteínas purificadas, observamos que la triple sustitución aminoacídica aumenta la actividad degradadora de cromatina aproximadamente 10-20 veces en comparación con la D1 de tipo salvaje sin diferencias detectables en la actividad degradadora de dsADN (**FIG. 25**). La cromatina de núcleos y TENs contiene actina (30, 31). Los datos sugieren que la degradación de la cromatina por las variantes de D1 requiere sustituciones de aminoácidos catiónicos, así como mutaciones que confieren resistencia a la actina, dos características que están presentes en D1L3 de tipo salvaje. Para corroborar aún más esta noción, generamos una variante D1 que presenta la combinación de las mutaciones A164K y A136F (SEQ ID NO: 9). De hecho, observamos un fuerte aumento de la actividad degradadora de cromatina en la variante D1 con ambas mutaciones (**FIG. 26**), apoyando nuestra hipótesis.

Desarrollo de la ingeniería de bloques de construcción de los miembros de la familia de proteínas DNasa1

D1L3 presenta tres sitios que contienen aminoácidos adicionales: la cola C-terminal que comienza después de Q282 (NH₂-SSRAFTBSKKSVTLRKTKSKRS-COOH) (SEQ ID NO:33), y en dos sitios dentro de la enzima en S79/R80 y en K226 (**FIG. 17**). Los 23 aminoácidos de la cola C-terminal de D1L3 se han unido al C-terminal de D1 (10, 28). Observamos que la inserción de un residuo de arginina en la posición 226 de la DNasa 1 (A226_T227insK) generaba una variante D1 con actividad enzimática reducida para degradar dsADN, mientras que no se observó tal efecto con la sustitución T227K (**FIG. 27**). Así, la inserción de un residuo K/R conlleva el riesgo de reducir la función D1. La inserción de un aminoácido cargado puede influir en la estructura local de la proteína. Dado que D1 es una enzima globular que comprende una cadena de aminoácidos [FIG. 28, (27)], es concebible que dicha alteración local pueda inactivar toda la enzima. De hecho, numerosas mutaciones no conservativas a lo largo de la secuencia de aminoácidos D1 inactivan la enzima (12, 25, 26). Nuestra hipótesis es que la transferencia de estructuras proteicas locales por medio de la implantación no sólo de residuos individuales de arginina y lisina, sino también de las secuencias de aminoácidos vecinas, reduce el riesgo de inactivación. Hemos buscado dentro de D1 y D1L3 aminoácidos conservados

en las proximidades de A226_T227insK que puedan utilizarse como anclajes para la inserción. Identificamos un motivo D223/T224/T225 y un T229 conservado en D1 como anclajes N-terminal y C-terminal, respectivamente (**FIG. 27**). Sustituimos 3 aminoácidos dentro de D1 (ATP) por 4 aminoácidos, incluido K226, de D1L3 (VKKS) in silico. La expresión del ADNc de la nueva variante D1 (A226_P228delinsVKKS) en células HEK239 reveló una enzima funcionalmente activa con una actividad de degradación de dsADN similar, en comparación con la D1 de tipo salvaje (**FIG. 27**). Los datos sugieren que los aminoácidos variables entre aminoácidos conservados son intercambiables entre D1 y D1L3.

Conceptualizamos una tecnología de bloques de construcción para transferir propiedades enzimáticas de un miembro de la familia de proteínas D1 a otro. Los siguientes pasos fundamentales caracterizan la tecnología (**FIG.**) **29**):

- (1) Proporcionar la alineación proteína-proteína de la DNasa donante y receptora.
- (2) Identificar el aminoácido variable o la secuencia de aminoácidos para la transferencia (bloque de construcción)
- (3) Identificar los aminoácidos conservados en la DNasa donante y receptora que se encuentran aguas arriba y aguas abajo del bloque de construcción (anclajes), respectivamente.
- (4) Sustituir el ADNc que codifica para el bloque de construcción entre los anclajes C y N en la DNasa receptora, por el ADNc entre los anclajes en la DNasa donante.
- (5) Sintetizar ADNc de DNasa quimérica, seguido de expresión in vitro/in vivo en un organismo receptor que sea preferentemente deficiente en DNasa donante y receptora (por ejemplo, células OHC o ratones *Dnasa1*^{-/-} *Dnasa13*^{-/-}).

Ingeniería de variantes de DNasa1 por medio de la tecnología de bloques de construcción

Una alineación de múltiples especies de D1 y D1L3 de humano, ratón, rata y chimpancé (**FIG. 30**), demostraron que los anclajes N- y C-terminal se conservan entre estas especies. Estos aminoácidos de anclaje o secuencias de aminoácidos flanquean 62 bloques de construcción de aminoácidos variables y secuencias de aminoácidos, que incluyen la secuencia de aminoácidos en D1 (ATP) y D1L3 (VKKS) de los experimentos mencionados anteriormente como bloques de construcción #49 (**FIG. 31**).

La transferencia de estos bloques de construcción de D1L3 a D1 genera variantes de D1 con las siguientes mutaciones (**FIG.**) **31**): 1M_S22delinsMSRELAPLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS, I30_T32delinsVRS, E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK, Y54C, I56_Q60delinsILVLM, 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, y K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS.

Las siguientes variantes D1L3 se generan si los bloques de construcción se transfieren de D1 a D1L3 (**FIG. 31**): M1_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21_S25delinsLKIAA, V28_S30delinsIQT, E33_S34delinsET, Q36_I45delinsMSNATLVSyl, K47_K50delinsQILS, C52Y, I54_M58delinsIALVQ, I60_K61delinsVR, S63_I70delinsSHLTAVGK, M72_K74delinsLDN, R77_T84delinsQDAPDT, N86H, V88_I89delinsVV, S91_R92delinsEP, N96_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107_L110delinsRPDQ, V113_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, I35F_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, y Q282_S305delinsK.

A continuación, conceptualizamos un acercamiento secuencial a variantes D1 de ingeniería con actividad D1L3 que empieza con la transferencia de múltiples bloques de construcción adyacentes (clústeres), continúa con la transferencia de bloques de construcción individuales, y finaliza con la transferencia de aminoácidos individuales o la combinación de múltiples bloques de construcción en nuevas enzimas quiméricas (**FIG. 32**). Este enfoque reduce el número de quimeras D1-D1L3 en el cribado inicial.

Para probar nuestro procedimiento, designamos un total de 19 variantes D1 que comprenden o bloques de construcción individuales o clústeres de bloques de construcción en clúster de D1L3 (**FIG. 31**). Estas variantes D1

presentan las siguientes mutaciones aminoacídicas: 1M_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA, L23_A27delinsMRICS/I30_T32delinsVRS/E35_T36delinsES, M38_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49_S52delinsKVIK/Y54C/I56_Q60delinsILVM, 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_N128delinsYQDGDGA/T130S/N132S, A136_I137delinsFV, R139W/F141_F144delinsQSPH/E146_E149delinsAVKD/A151V/V153VA157_A158delinsTT/G160_A162delinsETS/A164K, A168E/Y170_D171delinsVE/L174T, Q177_K179delinsKHR/G181_L182delinsKA/D184_L187delinsNFI, R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A22_2delinsQE, A226_P228delinsVKKS, H230N/V238_A239delinsLR/M241_A246delinsQEIVSS/D250K/A252_P254delinsNSV, N256D/A259_A260delinsKA/G262K/S264_L267delinsTEEE/Q269_I271delinsLDV, and Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS. A continuación, clonamos el ADNc en un vector de expresión, que se transfectó en células HEK293. El análisis de los sobrenadantes celulares mostró la degradación del dsADN por todas las muestras (**FIG. 33**). Además, observamos que la transferencia de los bloques de construcción (BC) 11 (véase SEQ ID NO: 10), BC 12-14 (véase SEQ ID NO: 11), BC 26 (véase SEQ ID NO: 12), BC 41-48 (véase SEQ ID NO: 13), y BC 49 (véase SEQ ID NO: 14) de D1L3 a D1 dio lugar a enzimas con mayor actividad degradadora de la cromatina. Todas estas enzimas quiméricas mostraron la misma o mayor actividad para degradar sustratos de dsADN que la D1 de tipo salvaje. Los bloques 11 (RNSRRGI en SEQ ID NO: 2) y 49 (VKKS en SEQ ID NO: 2) de D1L3 contienen R80/R81 y K227, respectivamente, que no están presentes en D1. El grupo 41-48 de D1L3-BB (PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE de SEQ ID NO: 2) presenta 5 residuos adicionales de arginina y lisina que su homólogo en D1 (RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA de SEQ ID NO: 1). Estos aminoácidos catiónicos adicionales pueden ser responsables de la hiperactividad. Los bloques de construcción D1 12-14 y 26 contienen las secuencias de aminoácidos H86 a R95 y A136 a V138 de SEQ ID NO: 1, que incluye residuos de aminoácidos necesarios para la unión de la actina inhibidora de D1. Por lo tanto, la sustitución de estas secuencias de aminoácidos por los respectivos bloques de construcción de D1L3, que no interactúan con la actina, probablemente genera variantes de D1 resistentes a la actina. Ahora combinamos BC 11, 14, 26, 41-19 en una nueva variante D1 (SEQ ID NO: 15). Observamos que la combinación de estos BC de ganancia de función aumentaba la degradación de la cromatina de la variante D1 hasta niveles de la D1L3 de tipo salvaje (**FIG. 33**). Así, la tecnología BC proporciona un procedimiento robusto para generar variantes D1 hiperactivas.

Ingeniería de variantes DNasal-similar a 3 por medio de tecnología de bloques de construcción

El grupo BC 60 a 62 de D1L3 incluye el aminoácido de su cola C-terminal (**FIG. 33**). La cola comienza después de L281 (**FIG. 34**) y comprende la secuencia de aminoácidos QSSRAFTBSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 33), que incluye una SLN bipartita. D1L3 necesita la cola C-terminal para degradar el ADN dentro de vesículas lipídicas, incluidos los reactivos de transfección y los cuerpos apoptóticos (7, 10, 28). Además, la cola C-terminal es necesaria para la degradación de la cromatina libre de lípidos y células por D1L3 (7). Ambos hallazgos se basan en una variante de D1L3 que carece de los aminoácidos posteriores a Q282 y, por tanto, es inactiva en la degradación de estos sustratos. Wilbert et al. unieron la extensión C-terminal de D1L3 al C-terminal de D1 y transfirieron así la capacidad de degradar ADN dentro de vesículas lipídicas a D1 (10, 28). Aquí, empleamos nuestra tecnología BC para transferir el C-terminal de D1L3 a D1 y viceversa. Utilizamos el motivo conservado S272/D273/H274, que se encuentra delante de la lámina beta terminal en D1 (**FIG. 28**), como anclaje N e intercambió los bloques de construcción terminales 3 entre D1 y D1L3 (**FIG. 34**). Este enfoque generó una variante D1 que presenta la extensión C-terminal de D1L3 debido a las mutaciones Y275F/V279_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16) y una variante truncada de D1L3 debida a las mutaciones F275Y/F279_K280delinsVM/Q282_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). Expresamos ambas variantes y las enzimas de tipo salvaje en células HEK293 y caracterizamos la actividad DNasa en el sobrenadante. Inesperadamente, observamos que la variante D1 con el C-terminal de D1L3 no degradaba la cromatina, mientras que la variante D1L3 que carecía del C-terminal de la enzima de tipo salvaje aún era capaz de escindir la cromatina (**FIG. 34**). De hecho, observamos una mayor actividad degradadora de la cromatina con esta variante D1L3. Para corroborar este hallazgo probamos si la variante truncada de D1L3 in vivo y observamos que su expresión de protegía de la mortalidad mediada por TEN de ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1/3^{-/-}* (**FIG. 34**). En conclusión, la delección del C-terminal no inhibe, sino que aumenta la función de D1L3 para degradar la cromatina libre de lípidos y libre de células.

Las proteasas séricas, en particular la plasmina, degradan D1L3, pero no D1 (9). La sensibilidad de D1L3 a la actividad de las proteasas limitaría su uso en la práctica clínica. Las proteínas glicosiladas presentan una mayor protección frente a las proteasas (32). Por medio del análisis de software, no pudimos identificar una secuencia consenso conocida para la glicosilación en D1L3 humana y murina. El análisis informático de la D1 humana reveló 2 sitios de glicosilación, como se observó tanto in silico como in vitro (9). Nuestra hipótesis es que las variantes glicosiladas de D1L3 pueden aumentar la vida media en circulación debido a una mayor resistencia a las proteasas séricas. Un sitio de glicosilación requiere una secuencia consenso mínima de N-X-T/S. D1 contienen dos sitios de N-glicosilación conocidos, N40 (N18 sin péptido señal) y N128 [(N106 sin péptido señal, (9))]. Los aminoácidos de los sitios de glicosilación de D1 N40-X-T42 y N128-X-T130 corresponden a los D38-X-N40 y A127-X-V129 en D1L3. Así, una versión glicosilada de D1L3 necesita presentar las mutaciones de aminoácidos D38N, N40T, A127N y V129T (véase SEQ ID NO: 18). En lugar de utilizar mutaciones puntuales convencionales para insertar estas sustituciones de aminoácidos, utilizamos la tecnología BC para transferir los sitios de glicosilación D1 N40-X-T42, que se encuentra

dentro de BB4 (MSNATLVSY en SEQ ID NO: 1), y N128-X-T130, que se encuentra dentro del grupo BC 23-25 (GCEPCGNDFN en SEQ ID NO: 1), de D1 a D1L3 (**FIG. 35**). Así, generamos dos nuevas variantes de D1L3, que presentan las mutaciones Q36_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19) y Y122_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20), respectivamente. Expresamos estas variantes de D1L3 junto con la enzima WT en células HEK293.

5 A continuación, analizamos el sobrenadante por Western Blot mediante el uso de un anticuerpo policlonal dirigido a un epítipo en la cola C-terminal de la enzima WT para detectar la enzima WT así como las variantes D1L3. Como era de esperar las variantes D1L3 mostraron bandas de mayor peso molecular presumiblemente a la glicosilación, en comparación con la enzima WT (**FIG. 35**). La variante D1L3 con glicosilación en N40 o N128 conservó su actividad degradadora de la cromatina (**FIG. 35**). En conclusión, los datos sugieren que la tecnología BC puede utilizarse para

10 transferir los sitios de glicosilación de D1 a D1L3, lo que puede generar variantes de D1L3 con mayor resistencia a la proteasa y vida media en pacientes.

Terapia con DNasal-similar a 3 y una variante del mismo

Por último, probamos los efectos terapéuticos de D1L3 in vivo. El análisis histológico de los coágulos vasculares de TENs muestra densos agregados de cromatina (**FIG. 36A**), lo que indica que los sitios de escisión libres de histonas para D1 son raros in vivo. Así pues, nuestra hipótesis es que un tratamiento agudo con D1L3 de tipo salvaje es más eficaz para degradar las TEN intravasculares que con D1 de tipo salvaje. Para probar nuestra hipótesis, expresamos *Csf3* en ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1l3^{-/-}* deficientes para inducir coágulos vasculares de TENs. Es importante destacar que, antes del exitus, los ratones con oclusiones vasculares por TENs desarrollan hematuria e hipotermia, que pueden detectarse de forma no invasiva. Por lo tanto, el modelo animal permite identificar y, por lo tanto, seleccionar ratones, que han formado TENs, para probar fármacos candidatos para una terapia aguda contra TENs (**FIG. 36B**). Aquí, probamos la D1 humana purificada de tipo salvaje (dornasa alfa; SEQ ID NO: 1), D1L3 humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2), y una variante hiperactiva de D1L3 [D1L3^V; (SEQ ID NO: 17)] para una terapia aguda contra las TEN. Inyectamos *Csf3* en ratones *Dnasa1^{-/-}Dnasa1l3^{-/-}* deficientes. Después de 72 horas, los primeros animales individuales empezaron a desarrollar hipotermia y hematuria. Se utilizaron como criterios de inclusión un descenso de la temperatura corporal igual o superior a 4 °C y la presencia de orina roja. Los ratones que desarrollaron estos fenotipos fueron asignados aleatoriamente a los distintos grupos de tratamiento. Los animales recibieron una única dosis, inyección intravenosa a través de la vena de la cola de 1 mg/kg de D1, D1L3, o vehículo. Transcurridos 30 minutos, se practicó la eutanasia a los animales para recoger muestras biológicas (sangre y órganos). La cuantificación de los coágulos de TENs en la vasculatura de los pulmones mostró que las TENs ocluían los vasos sanguíneos en los ratones que recibían vehículo o terapia D1 (**FIG. 36D**). Es importante destacar que los ratones inyectados con D1L3 y D1L3^V no mostraron coágulos de TENs o mostraron coágulos escasos (**FIG. 36D**). En los pacientes, el ADN circulante tiene el tamaño del ADN de los mononucleosomas [180 pares de bases, (33)], lo que indica que es un producto de degradación del ADN de alto peso molecular de la cromatina. El ADN circulante se utiliza habitualmente como marcador indirecto de la formación de TEN intravasculares, pero también puede proceder de tejido dañado y necrótico (34). Cuantificamos el ADN en suero mediante el uso de una sonda de ADN fluorescente. Observamos que la inyección de D1L3 y D1L3^V, pero no de D1 ni de vehículo, provocaba un fuerte aumento de los niveles de ADN circulante (**FIG. 36E**). El aislamiento y la visualización del ADN circulante mostraron multímeros de 180 fragmentos de pares de bases, lo que indica la presencia de mononucleosomas y oligonucleosomas en el suero de los ratones que recibieron la terapia D1L3 (**FIG. 36F**). Los ratones que recibieron D1L3^V sólo mostraron mono- y di-nucleosomas. Los datos confirman la hiperactividad de D1L3^V in vivo. Los aislamientos de ADN del suero de los ratones que recibieron la terapia D1 mostraron manchas tenues de ADN de diversos tamaños, mientras que no se pudo aislar ADN del suero de los ratones inyectados con el vehículo (**FIG. 36F**). Por lo tanto, D1L3 puede ser utilizado, no sólo para la profilaxis, sino también para la terapia aguda de enfermedades que se asocian con TENs.

Exploramos además la aplicación terapéutica de D1L3^V en un modelo de lesión por isquemia-reperusión (**FIG. 37A**). En resumen, un testículo de ratas macho de tipo salvaje fue sometido a torsión testicular de acuerdo con lo descrito previamente por nosotros (35). El procedimiento provoca una lesión tisular isquémica. Tras la aleatorización y la destorsión del testículo, las ratas recibieron tres inyecciones diarias de dornasa alfa vehiculada (D1, 1mg/kg), o una variante purificada de DNasa1L3 (SEQ ID NO: 17, D1L3^V, 1mg/kg). Al cabo de 7 días se recogieron el testículo isquémico y el testículo no tratado. La terapia con el D1L3^V, pero no la solución salina ni el D1, redujo significativamente la atrofia testicular (**FIG. 37B**). Además, la terapia con el D1L3^V, pero no con solución salina o D1, redujo sustancialmente la lesión tisular y la mayoría de los animales no presentaron signos de lesión (**FIG. 37C**). En conjunto, los datos identifican a D1L3 como una potente terapia contra la lesión por isquemia-reperusión.

Desarrollo de fármacos de DNasa1, DNasal-similar a 3 y variantes

Casi el 70% de todas las proteínas terapéuticas se producen mediante el uso de ovario de hámster chino (OHC) (36). De hecho, la DNasa1 de tipo salvaje (dornasa alfa) se produce en células OHC. A pesar de las importantes ventajas, el desarrollo de líneas celulares y la producción a gran escala en OHC sigue siendo un enorme desafío debido a un considerable grado de variabilidad y a la ausencia de procedimientos fiables para predecir o modelizar las características de crecimiento celular (36). Es importante destacar que las células OHC no fueron capaces de producir de forma estable variantes hiperactivas de D1, lo que impidió su fabricación clínica (12). Se desconocen las propiedades de fabricación de D1L3. Así, desarrollamos líneas celulares OHC estables que producen D1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), una variante hiperactiva D1 (SEQ ID NO: 7), D1L3 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) y una variante hiperactiva de D1L3 (SEQ ID NO: 17). Cultivamos las líneas celulares en biorreactores y observamos una

expresión proteica estable con D1 de tipo salvaje y la variante D1, teniendo esta última unos niveles de expresión fuertemente aumentados (**FIG. 38**), ilustrando la viabilidad de producir una variante D1 hiperactiva en OHC. Inesperadamente, observamos sólo niveles proteicos menores de D1L3 de tipo salvaje y de la variante D1L3 (**FIG. 38**), apuntando hacia un reto importante para la fabricación clínica de D1L3 y sus variantes.

Debido a las altas densidades celulares en biorreactores a gran escala, las células compiten por los recursos y sufren estrés celular que conduce a un aumento de la muerte celular denominada apoptosis, un programa de muerte celular utilizado por organismos multicelulares, incluidos los mamíferos (37). D1L3 se dirige al ADN en cuerpos apoptóticos (7). Especulamos que los bajos niveles de D1L3 se deben a la eliminación de la enzima por estas vesículas apoptóticas. Para superar estas limitaciones, probamos la producción de D1, D1L3 y sus variantes mediante el uso del sistema de expresión microbiana, *Pichia pastoris*, un organismo establecido, aprobado por la FDA y generalmente reconocido como seguro (GRCS) con capacidad secretora de proteínas (38, 39). Una limitación clave de este enfoque es que las proteínas producidas por *P. pastoris* suelen estar hiperglicosiladas y pueden dar lugar a una mayor inmunogenicidad (40). La composición de D1L3 y su variante son no glicosiladas y óptimas para la expresión en *P. pastoris*. Mutamos los sitios de glicosilación en D1 y su variante en N40S y N128S respectivamente para generar proteínas deglicosiladas (SEQ ID NO: 21, 23). La expresión de proteínas en *P. pastoris* se consigue generalmente acoplado proteínas de interés a péptidos señal secretorios de varios orígenes. Omitimos esta etapa para evitar la generación de proteínas quiméricas inmunogénicas. Especulamos que el péptido señal nativo de D1 y/o D1L3 es reconocido por *P. pastoris*. Tras optimizar el codón, expresamos el ADNc en *P. pastoris* (SEQ ID NO: 22, 24-26). Conseguimos la expresión de D1 y de la variante D1 (no se muestra). Es importante destacar que este enfoque permitió además la expresión de D1L3 y de la variante D1L3, mostrando esta última mayores niveles de expresión (**FIG. 38**). Purificamos las proteínas y confirmamos que la D1L3 tiene mayor actividad (**FIG. 38**). En conclusión, los datos sugieren que el uso de sistemas de expresión no mamíferos, como *P. pastoris*, permite la fabricación clínica de D1L3 y sus variantes.

Debate

Dos enzimas que degradan el ADN se han utilizado ampliamente de forma terapéutica en modelos experimentales y en pacientes. La estreptodornasa, una DNasa secretada de *Streptococcus spp.*, se ha probado en modelos de enfermedades de homoinjerto de piel, coágulos de vejiga, desbridamiento de heridas y meningitis. La DNasa1 (incluida la DNasa1 pancreática) se ha utilizado terapéuticamente en modelos experimentales de cáncer, fibrosis quística, lupus, trombosis, accidente cerebrovascular, sepsis, lesión pulmonar, aterosclerosis, infección vírica, anemia falciforme, infarto de miocardio, infección de oído, cicatrización de heridas, lesión hepática, endocarditis, infección hepática, pancreatitis, disfunción primaria de injertos, isquemia reperusión de extremidades, lesión renal, coagulación sanguínea, asma, inflamación inducida por alumbre, lesión hepatorenal. La estreptodornasa también se ha utilizado para tratar a pacientes con exudaciones pleurales, hemotórax, coágulos sanguíneos intrabiliares, anemia postneumática, úlceras, afecciones otorrinolaringológicas, infecciones orales, heridas leves, sinusitis, rinoplastias postoperatorias, infertilidad, sonda vesical, limpieza de heridas, prueba de reacción cutánea. Cabe destacar que la DNasa1 se ha probado terapéuticamente en pacientes con meningitis neumocócica, gota, úlceras en las piernas, fibrosis quística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquitis crónica, bronquiectasias, lupus, disquinesia ciliar primaria, bronquiolitis, empiema, infecciones pleurales, cáncer, enfermedad de los ojos secos, infecciones de las vías respiratorias inferiores, hematomas crónicos, enfermedad de Alzheimer y enfermedad pulmonar obstructiva. En este ejemplo, identificamos D1L3, variantes del mismo, así como variantes de D1 como candidatos novedosos para una terapia de DNasa (**FIG. 39**).

Procedimientos

Detección de la actividad degradadora de la cromatina

Para medir la actividad degradadora de la cromatina, mezclamos muestras con núcleos aislados de HEK293 (1.500.000 - 3.000.000 por reacción), 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 50 mM NaCl e inhibidores de proteasas. Tras incubar las muestras durante 1 hora a 37°C, se calentaron a 65°C durante 10 minutos. Se procedió al aislamiento del ADN mediante el uso del QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, el eluyente se cargó en un gel de agarosa y los fragmentos de ADN se separaron por medio de electroforesis en gel. La fluorescencia del ADN de los geles se registró con un escáner de fluorescencia.

Otros procedimientos se describen en el Ejemplo 1.

Referencias

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, en Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), cap. II. 2.
2. V. Brinkmann y otros, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Ciencia (Nueva York, N.Y.) 303, 1532-1535 (2004).
3. T. A. Fuchs, A. Hakkim, C. F. Urban, en Inflammation: Mecanismos fundamentales, K. Ley, Ed. (World Scientific, 2018), cap. 6.

4. D. Shiokawa, S. Tanuma, Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Bioquímica* 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).
- 5 6. W. F. Baron y otros, Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. *Gene* 215, 291-301 (1998).
7. V. Sisirak et al., La digestión de la cromatina en micropartículas de células apoptóticas previene la autoinmunidad. *Cell* 166, 88-101 (2016).
- 10 8. M. Jimenez-Alcazar et al., Impaired DNaseI-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *Revista de trombosis y hemostasia : JTH* 13, 732-742 (2015).
9. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezhhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1I3). *FEBS J* 276, 1059-1073 (2009).
- 15 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, Estructura atómica del complejo actina:DNasa I. *Nature* 347, 37-44 (1990).
- 20 12. C. Lam y otros, Taming hyperactive hDNase I: Expresión inducible estable de una variante hiperactiva resistente a la sal y a la actina de la desoxirribonucleasa I humana en células CHO. *Biotechnol Prog* 33, 523-533 (2017).
13. C. Q. Pan et al., Mejora de la potencia de las variantes de DNasa I humana hiperactiva y resistente a la actina para el tratamiento de la fibrosis quística y el lupus eritematoso sistémico. *J Biol Chem* 273, 18374-18381 (1998).
- 25 14. D. Shiokawa, Y. Shika, S. Tanuma, Identificación de dos señales funcionales de localización nuclear en la DNasa gamma y su papel en su actividad DNasa apoptótica. *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).
- 30 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. Grupo de estudio Pulmozyme. *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).
- 35 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), Estados Unidos, 2017), vol. US 9,642,822 B2.
- 40 21. R. A. Lazarus, C. Q. Pan. (Genentech Inc., Estados Unidos, 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.
- 45 24. C. Q. Pan, R. A. Lazarus, Hiperactividad de las variantes de DNasa I humana. Dependencia del número de residuos cargados positivamente y de la concentración, longitud y entorno del ADN. *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).
- 5 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. *Bioquímica* 51, 10250-10258 (2012).
28. M. C. Schneider, A. Wilber. (Estados Unidos, 2004), vol. US 2004/0138156.
29. J. S. Ulmer et al., Ingeniería de la DNasa I humana resistente a la actina para el tratamiento de la fibrosis quística. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8225-8229 (1996).
- 10 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).
- 15 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. *Sangre* 120, 1157-1164 (2012).
- 20 34. M. Jiménez-Alcázar, N. Kim, T. A. Fuchs, ADN extracelular circulante: ¿Causa o consecuencia de la trombosis? *Semin Thromb Hemost* 43, 553-561 (2017).
35. M. Boettcher et al., Degradation of Extracellular DNA by DNaseI Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urología* 109, 223 e221-223 e227 (2017).
- 25 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. *Biotechnología y bioingeniería* 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).
- 30 39. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Microbiología y biotecnología aplicadas* 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. *Revista de reconocimiento molecular : JMR* 18, 119-138 (2005).

35 **Secuencias de DNAsas de tipo salvaje**

SEQ ID NO: 1 DNasa1 humana (P24855), secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRVDIALVQEV
RDS
 HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
 FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
 SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
 YGLSDQLAQATSDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 2 DNasa1L3 humana (Q13609), secuencia de aminoácidos (péptido señal; proteína madura):

MSRELAPLILLILLISIHSAAMRICSFNVRSEFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
RICPILMEKLNRRNSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADV

SREP FVWFQSPHTAVKDFVIIP LHTTPETS VKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIEMGDFNAGCS
YVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNVDFDQKA
YKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 3 DNasa1 murina (P49183): Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRYTGLMGTLTLLTLVNLLQLAGTLRIAAFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRDYDIAV IQEVRDS
HLVAVGKLLDELNRDKPD TYRYV VSEPLGRKSYKEQYLFVYRDPQVS ILDSYQYDDGCEPCGNDT
FSREPAIVKFFSPYTEVQEFAIVPLHAAPTEAVSEIDALYDVYLDVWQKWGLEDIMFGDFNAGC
SYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTVTSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDFQAE
YGLSNQLAE AISDHYPVEVTLRKI

SEQ ID NO: 4 DNasa1 de rata (P21704), Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRDYDIAVVQEV RDT
HLVAVGKLLDELNRDIPDNYRYI ISEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSVLDSYHYDDGCEPCGNDT
FSREPAIVKFFSPYTEVREFAI VPLHSAPTEAVSEIDALYDVYLDVRQKWGLEDIMFGDFNAGC
SYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTTATSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDFQAE
YRLTNQMAE AISDHYPVEVTLRKT

5

SEQ ID NO: 34 DNasa1L3 murina (O55070): Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSLHPASPRLASLLLFI LALHDTLALRLCSFNVR SFGASKKENHEAMDIIVKI IKRCDLIL LMEI
KDSNNNICPMLMEKLNCSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKEKLVSVKTKYHYHDYQDG
DTDVFSREP FVWFHSPFTAVKDFVIVPLHTTPETS VKEIDELVDVYTDVRSQWK TENFIEMGDF
NAGCSYVPPKAWQNIRLRTDPKFVWLIGDQEDTTVKKSTSCAYDRIVLCGQEI VNSVVPRSSGVF
DFQKAYDLSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNNRKS VSLKKRKKGNRS

SEQ ID NO: 35 DNasa1L3 de rata (O89107): Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSLYPASPYLASLLLFI LALHGALSRLCSFNVR SFGESKRKENHNAMDIIVKI IKRCDLIL LMEI
KDSNNNICPMLMEKLNCSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKAKYLYHDYQDG
DTDVFSREP FVWFQAPFTA AKDFVIVPLHTTPETS VKEIDELADVYTDVRRRWKAENFIEMGDF
NAGCSYVPPKAWKNIRLRTDENFVWLIGDQEDTTVKKSTSCAYDRIVLRGQEI VNSVVPRSSGVF
DFQKAYELSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSRKS VSLKKKKKGSRS

10

SEQ ID NO: 36 DNasa1 de chimpancé (H2QAH1): Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRSMKLLGALLALAA LLQGAVSLKIAAFNIQT FGETKMSNATLVSYIVQILSRDYDIALVQEV RDS
HLTAVGKLLDNLNQDAPD TYHYV VSEPLGRNSYKERYLFVYRDPQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPAIVRFFSRFTEVREFAI VPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLRTSPA FQWLIPDSADTTATPTHCA YDRIVVAGMLLQGA VVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 37 DNasa1L3 de chimpancé (H2QMU7): Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSRELTPLLLLLLSIHSTLALRICSFNVRSFGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
RICPILMEKLNRRNSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADV
SREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFIIMGDFNAGCS
YVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNVDFDQKA
YKLTEEEALDVSDFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTCKRS

SEQ ID NO: 38 DNasa1-similar a 1 humana (NM_006730); Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEVVDSSGSA
IFLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETVYFYRSHKTQVLSSYVYNDEDDVFAREFVA
QFSLPSNVLPVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLEVSQHWQSKDVILLGDFNADCASLTKKRL
DKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLHGRCRSLHTAAAFDFPPTSFQLTEEEAL
NISDHYFVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLLLSLLSPQLCPAA

5 **SEQ ID NO: 39** DNasa1 similar 2 humana (NM_001374); Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFQDSKVSDFACGSIIAKILAGYDLALVQEVDRPD
LSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLEFVYRKDAVSVDITYLYPDPEVDFSRPF
VVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTTPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWG
TDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRS
LKPQSATVHDFQEEFGLDQTQALATSDHFPVEVTLKFHR

Cola C-terminal de DNasa1L3 humano

SEQ ID NO: 33

10 **Secuencia de aminoácidos: SSRAFTNSKKSVTLRKKTCKRS**

Secuencias de las variantes de DNasa1

SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRCMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRCMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YKLSQDLAQAI SDHYPVEVMLK

15

SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVKEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

5

SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNRNSRRGITTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGN
DTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNA
GCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQ
AAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 11 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

10 **SEQ ID NO: 12** Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
FNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 13 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
 HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
 FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
 SYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
 YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 14 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
 HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
 FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
 SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTVKKSTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQA
 AYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 15 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
 HLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYNVVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGN
 DTFNREPFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNA
 GCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNF
 QAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

5

SEQ ID NO: 16 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRS
 HLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDT
 FNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGC
 SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDRIIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
 YGLSDQLAQAI SDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT SKRS

Secuencias de las variantes de DNasall3

SEQ ID NO: 17 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
 RICPILMEKLNRSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADV
 SREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCS
 YVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFEQKA
 YKLTEEEALDVSDHYPVEVMLK

10

SEQ ID NO: 18 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSGESKQENKTAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
 RICPILMEKLNRSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDNDTF
 SREPFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCS
 YVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFEQKA
 YKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKT SKRS

SEQ ID NO: 19 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
 RICPILMEKLNRRNSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDYQDGDADV
 SREFVVFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGCS
 YVPKKAWKNI RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFDQKA
 YKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVT LRKKTKSKRS

SEQ ID NO: 20 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIKDSNN
 RICPILMEKLNRRNSRRGITYNVVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYHDGCEPCGNDT
 FNREFVVFVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRWKAENFI FMGDFNAGC
 SYVPKKAWKNI RLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVVPKSNSVDFDQK
 AYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVT LRKKTKSKRS

Secuencias utilizadas en *Pichia pastoris*.

5 **SEQ ID NO: 21** Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

M R G M K L L G A L L A L A A L L Q G A V S L K I A A F N I Q T F G E T K M S S A T L V S Y I V Q I L S R Y D I A L V Q E V R D S
 H L T A V G K L L D N L N Q D A P D T Y H Y V V S E P L G R N S Y K E R Y L F V Y R P D Q V S A V D S Y Y Y D D G C E P C G S D T
 F N R E P A I V R F F S R F T E V R E F A I V P L H A A P G D A V A E I D A L Y D V Y L D V Q E K W G L E D V M L M G D F N A G C
 S Y V R P S Q W S S I R L W T S P T F Q W L I P D S A D T T A T P T H C A Y D R I V V A G M L L R G A V V P D S A L P F N F Q A A
 Y G L S D Q L A Q A I S D H Y P V E V M L K

SEQ ID NO: 22 ADNc optimizado para el codón de SEQ ID NO: 21 (Codón de inicio, Péptido señal):

A T G A G A G G T A T G A A G C T C C T T G G T G C C C T C C T G G C T C T C G C T G C T C T C C T C C A A G G A G C A G T T T C
T C T A A G A T T G C T G C T T T C A A T A T T C A A C C T T T G G C G A G A C T A A A A T G T C C T C G G C A A C A T T A G
 T A T C T T A C A T T G T T C A G A T C C T T T C T C G T T A C G A C A T A G C T T T G G T C C A G G A G G T A G A G A C T C C
 C A C T T G A C T G C C G T C G G T A A G C T G C T A G A C A A T C T T A A C C A A G A C G C A C C T G A C A C C T A C C A C T A
 C G T T G T T A G T G A G C C T C T C G G T A G A A A C T C C T A C A A G G A G A G A T A C C T A T T T G T C T A C C G T C C A G
 A T C A G G T G T C T G C T G T G G A C T C T T A C T A C T A T G A C G A C G G T T G T G A A C C T T G T G G T T C A G A C A C C
 T T C A A C A G A G A A C C A G C T A T C G T T A G A T T T T T C T C C A G A T T C A C C G A G G T C A G A G A G T T C G C C A T
 C G T T C C A T T G C A C G C T G C G C C T G G A G A T G C A G T G G C C G A A A T T G A C G C T C T C T A T G A T G T C T A C C
 T G G A C G T T C A G G A A A A T G G G G T C T A G A A G A T G T T A T G C T G A T G G G A G A C T T C A A C G C T G G T T G C
 T C T T A C G T T A G G C C A T C T C A A T G G T C A A G C A T C A G A C T A T G G A C T T C C C C A A C G T T C C A A T G G C T
 T A T T C C T G A C T C C G C T G A T A C T A C C G C C A C T C C C A C T C A T T G T G C A T A T G A C A G A A T T G T T G T C G
 C T G G T A T G C T A C T G C G T G G A G C T G T C G T A C C A G A T T C T G C T C T G C C A T T T A A C T T C C A A G C C G C A
 T A T G G T C T T T C T G A C C A A C T G G C T C A A G C C A T C T C T G A T C A C T A C C C T G T G G A A G T T A T G C T T A A
 G

SEQ ID NO: 23 Secuencia de aminoácidos (Péptido señal; Proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRFFGETKMSSATLVSYIVQILSRDIALVQEVDRDS
HLTAVGKLLDNLNQDAPDTHYVYVSEPLGRNSYKERYLFVYRFDQVSAVDSYYYDDGCEPCGSDT
FNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEVDMLMGDFNAGC
SYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAA
YGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK

SEQ ID NO: 24 ADNc optimizado para el codón de SEQ ID NO: 23 (Codón de inicio, Péptido señal):

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAAGGAGCAGTTTC
TCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCTTTGGCGAGACTAAAATGTCTCGGCAACATTAG
TATCTTACATTGTTTCAGATCCTTTCTCGTTACGACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTAGAGACTCC
CACTTGACTGCCGTCGGTAAGCTGCTAGACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTA
CGTTGTTAGTGAGCCTCTCGGTAGAACTCCTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGTCCAG
ATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCTTGTGGTTCAGACACC
TTCAACAGAGAACCATTTCATCGTTAGATTTTTCTCCAGATTACCGAGGTCAGAGAGTTCCGCCAT
CGTTCCATTGCACGCTGCCCTGGAGATGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACC
TGGACGTTTCAGGAAAAATGGGCTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGC
TCTTACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTCCAATGGCT
TATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAAAGCCCACTCATTGTGCATATGACAGAATTGTTGTCTG
CTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCTGTTACCAGATTCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCA
TATGGTCTTTCTGACCAACTGGCTCAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAA
G

SEQ ID NO: 25 ADNc optimizado para el codón de SEQ ID NO: 2 (Codón de inicio, Péptido señal):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAG
AATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACG
TTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAAC
AGAATTTGCCCCATCCTTATGGAAAAGCTGAATAGAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAATA
CGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAA
AGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACATTCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTC
TCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTAT
CCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTGGAAGTTTACACCG
ACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAAATTTCAATTTTCATGGGTGATTTCACCGCCGGATGCTCA
TATGTCCCTAAAAAGGCTTGAAAAACATCGTTTGAAGACGATCCTAGATTTGTCTGGCTCAT
CGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGC
GTGGTCAGGAGATTGTTTCTATCTGTTGTCCCAAAGTCCAACCTCCGCTTTGATTTCCAAAAGGCT
TACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCCTTCCCTGTAGAGTTTAAGCTGCA
ATCCTCCAGAGCATTCACTAACTCTAAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCTAAGA
GATCG

SEQ ID NO: 26 ADNc optimizado para el codón de SEQ ID NO: 17 (Codón de inicio, Péptido señal):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCACTCGCCATGAG
AATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAGGAGGACAAAAACGCTATGGACG
TTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATATCATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAAC
AGAATTTGCCCCATCCTTATCGAAAAGCTGAATAGAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACCTA
CGTTATCTCTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAGGAAA
AGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCCTATCATGACTACCAAGACGGCGATGCTGACGTTTTTC
TCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCACACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTAT
CCCACTACACACTACGCCAGAAACCTCTGTCAAGGAAATAGATGAACCTTGTGAACTTTACACCG
ACGTGAAGCACAGATGGAAGGCCGAGAATTTTCATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGATGCTCA
TATGTCCCTAAAAAGGCTTGGAAAAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGTCTGGCTCAT
CGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTGCTTACGACAGAATTGTTCTGC
GTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAAAGTCCAACCTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCT
TACAACTGACTGAGGAGGAAGCTTTAGACGTGTCCGACCACTACCCTGTAGAGGTCATGTTGAA
G

REIVINDICACIONES

1. Una variante de DNasa 1 similar a 3 (D1L3) para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones **caracterizadas por** la presencia o acumulación de trampas extracelulares de neutrófilos (TENs), en la que la variante D1L3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la enzima madura definida por SEQ ID NO: 2 que carece del péptido señal, con la salvedad de que la variante D1L3 tiene una delección de toda o parte de la cola C-terminal definida por SEQ ID NO: 33.
2. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 1, en la que la variante D1L3 está fusionada a una fracción de extensión de la semivida, en la que la fracción de extensión de la semivida se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, un Fc o una proteína similar a la elastina.
3. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 1, en la que la variante D1L3 está fusionada a albúmina.
4. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 1, en la que la variante comprende una señal de localización nuclear (SLN) inactivada.
5. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 4, en la que una SLN se inactiva por delección de todo o parte de SLN1 y/o SLN2 de SEQ ID NO: 2, en el que SLN1 comprende los aminoácidos 35-51 de SEQ ID NO: 2 y SLN2 comprende los aminoácidos 296-305 de SEQ ID NO: 2.
6. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 5, en la que SLN2 de SEQ ID NO: 2 se suprime.
7. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 1, que comprende la delección de toda la cola terminal C definida por SEQ ID NO: 33.
8. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la enfermedad o afección a tratar es un trastorno inflamatorio crónico o agudo.
9. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 8, en la que la enfermedad o afección a tratar es una infección aguda o crónica.
10. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la enfermedad o afección a tratar es una oclusión vascular que comprende TENs.
11. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la enfermedad o afección a tratar es neutrofilia crónica, agregación de neutrófilos y leucostasis, trombosis y oclusión vascular, lesión por isquemia-reperusión, lesión tisular quirúrgica y traumática, una reacción o enfermedad inflamatoria aguda o crónica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad metabólica, una inflamación sistémica, una enfermedad inflamatoria del tracto respiratorio, enfermedades inflamatorias renales, enfermedades inflamatorias relacionadas con tejido trasplantado y cáncer.
12. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la variante D1L3 se administra por vía intravenosa, intraarterial, intraarticular, intramuscular, subcutánea, tópica o por administración pulmonar.
13. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el individuo tiene o está en riesgo de tener una oclusión ductal en un sistema ductal.
14. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 13, en la que el sistema ductal es el conducto biliar, el conducto lagrimal, el conducto galactóforo, el conducto cístico, el conducto hepático, el conducto eyaculador, el conducto parotídeo, el conducto submandibular, el conducto sublingual mayor, el conducto de Bartolino, el acueducto cerebral, el páncreas, la glándula mamaria, los conductos deferentes, el uréter, la vejiga urinaria, la vesícula biliar y el hígado.
15. La variante D1L3 para el uso de la reivindicación 14, en la que la enfermedad o afección a tratar es pancreatitis, colangitis, conjuntivitis, mastitis, enfermedad del ojo seco, una obstrucción de los conductos deferentes o una enfermedad renal.
16. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la enfermedad o afección a tratar es lupus eritematoso sistémico (LES).
17. La variante D1L3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el tratamiento comprende la administración adicional de una DNasa1 o variante de la misma.

Fig. 1A

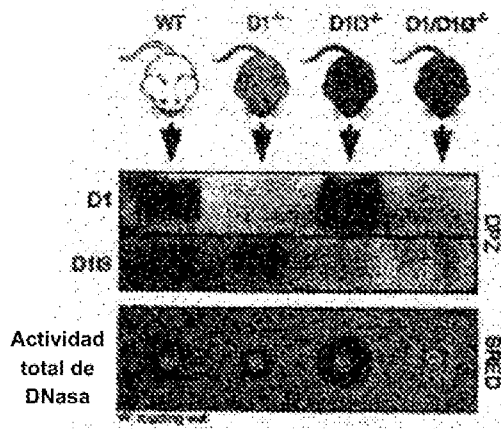


Fig. 1B

Degradación TEN *in vitro*

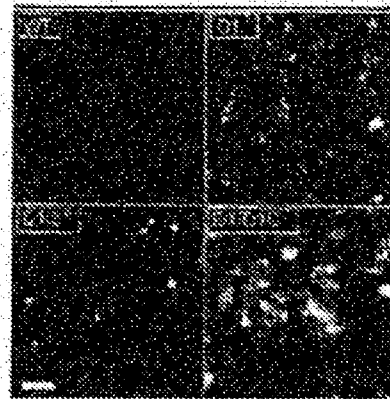
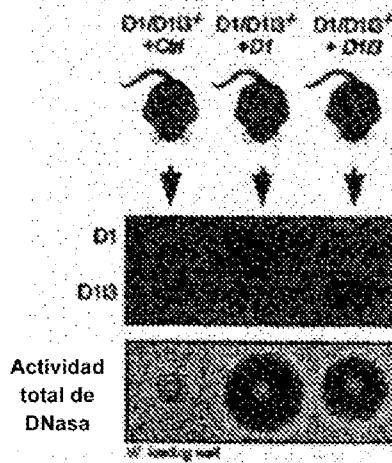
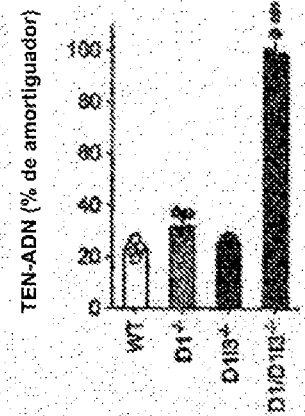


Fig. 1C



Degradación TEN *in vitro*

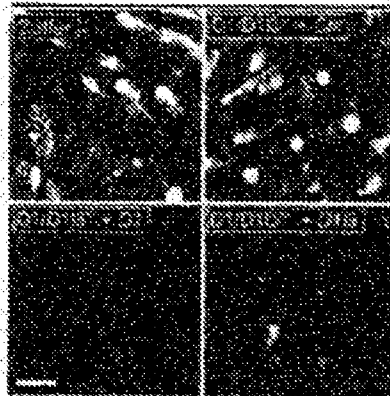


Fig. 1D

Fig. 1E

Fig. 1F

Fig. 2A

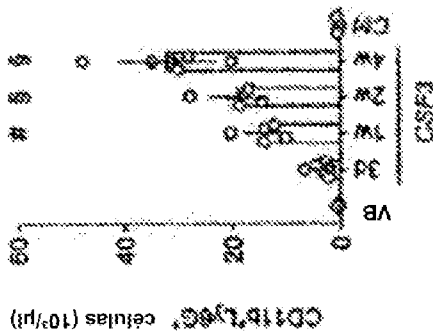


Fig. 2B

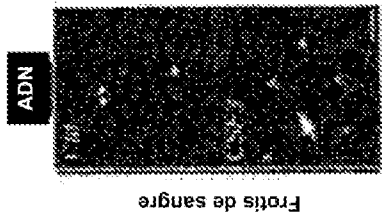


Fig. 2C

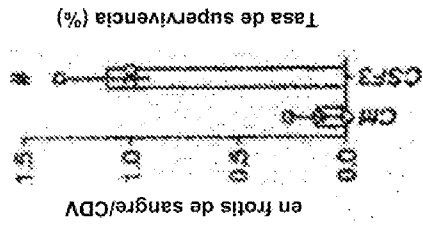


Fig. 2D

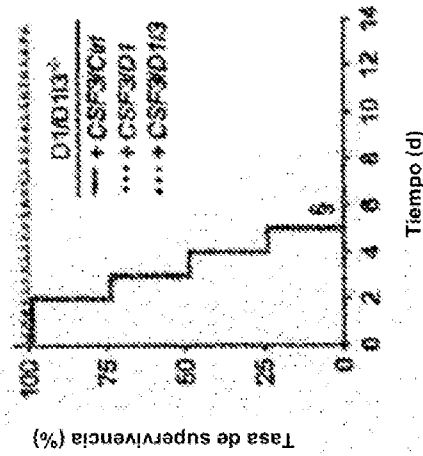


Fig. 2E

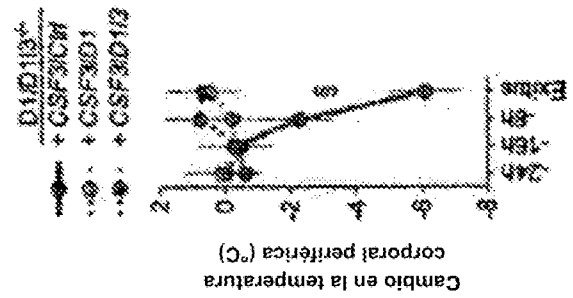


Fig. 2F

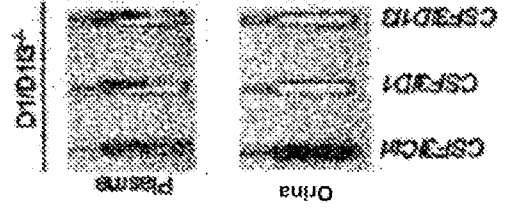


Fig. 2G

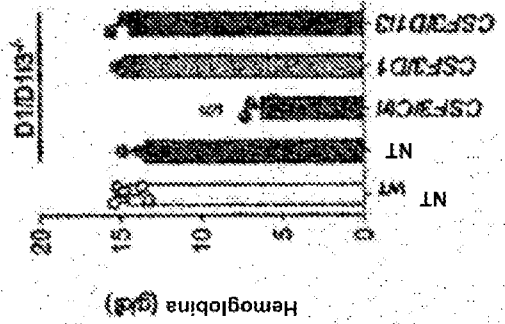


Fig. 2H

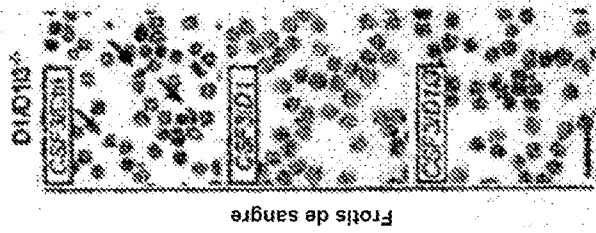


Fig. 2I

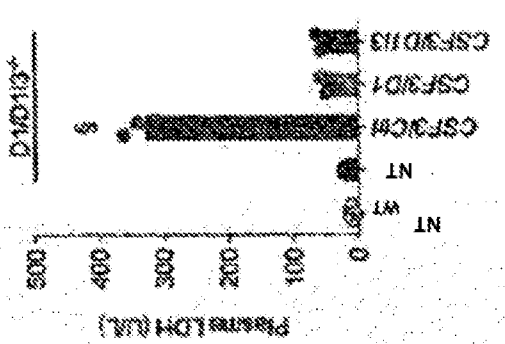


Fig. 3A

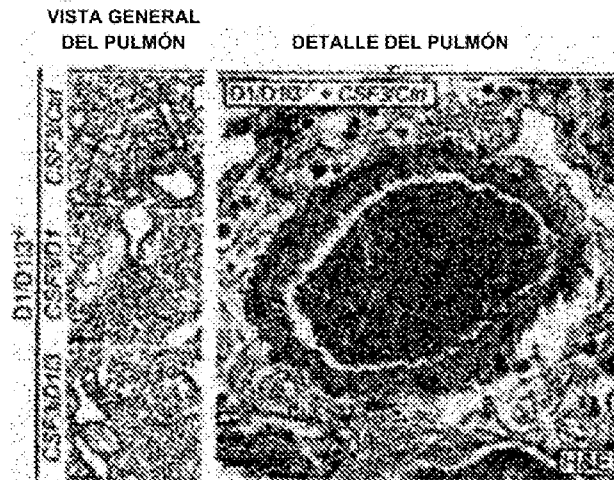


Fig. 3B

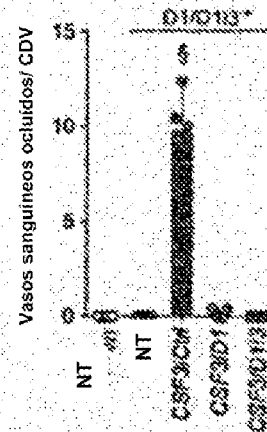


Fig. 3C

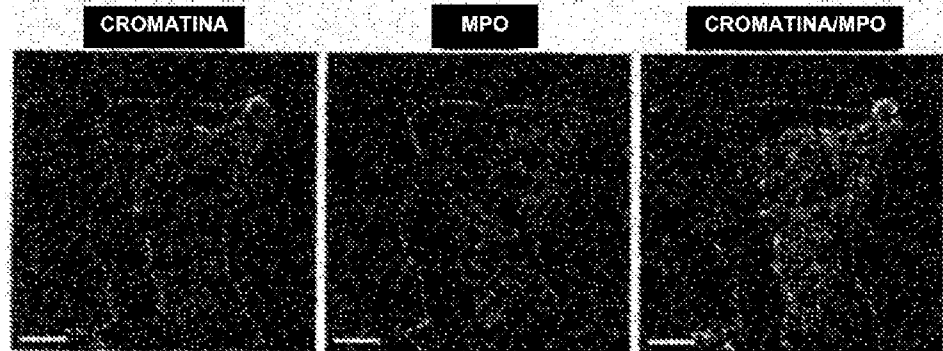


Fig. 3D

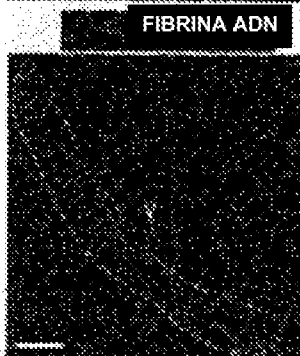
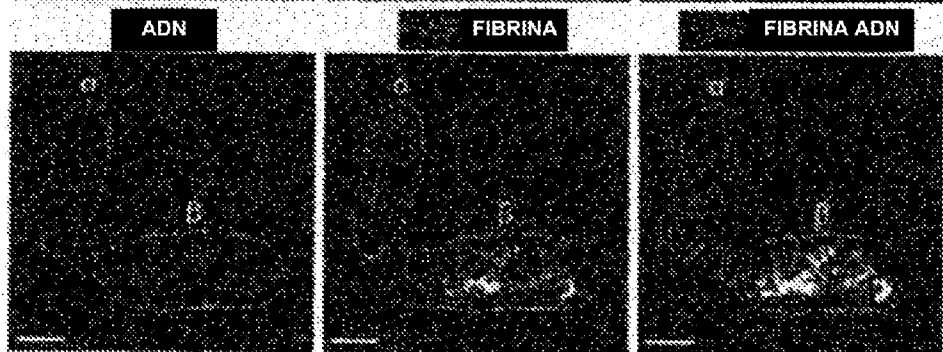


Fig. 3E

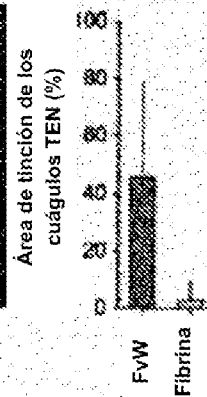


Fig. 3F

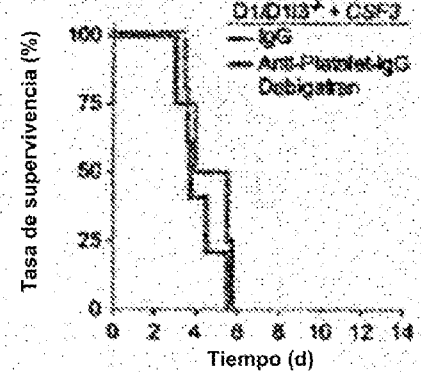


Fig. 3G

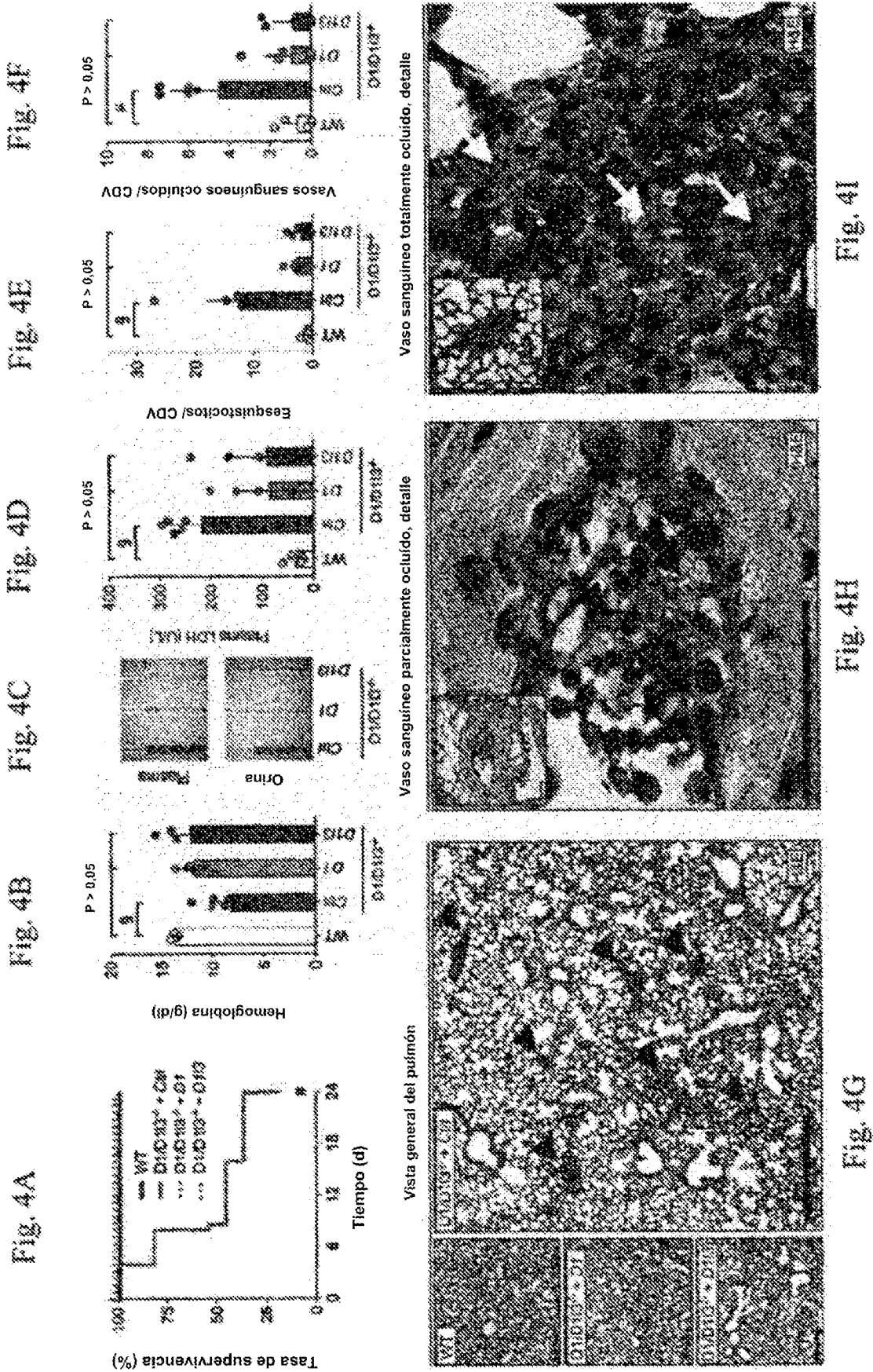


Fig. 5A

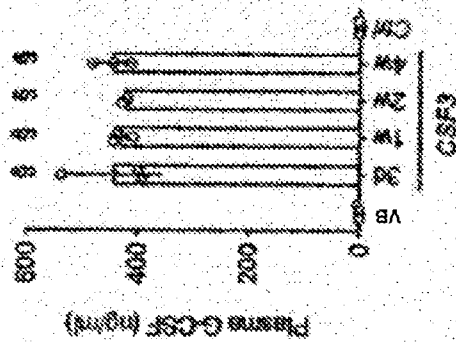


Fig. 5B

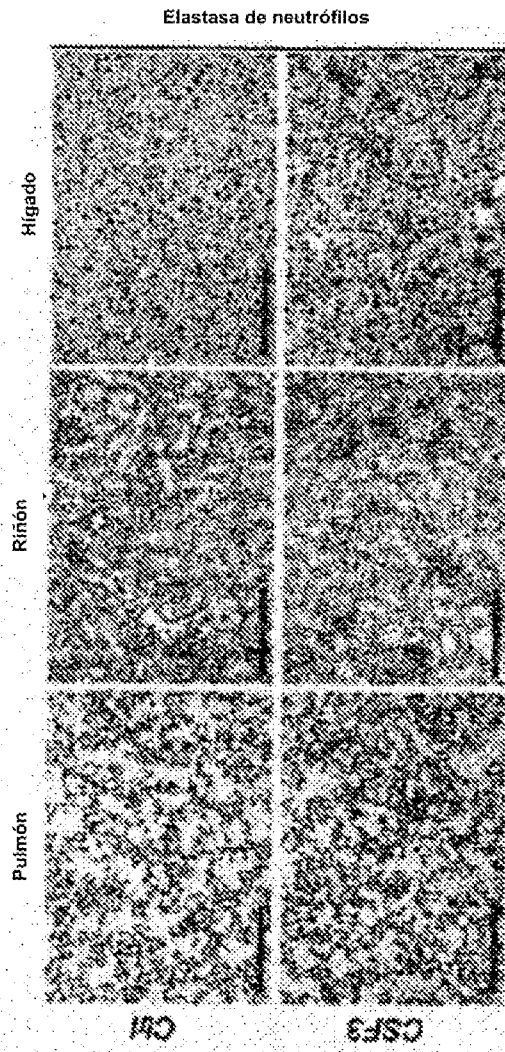


Fig. 5C

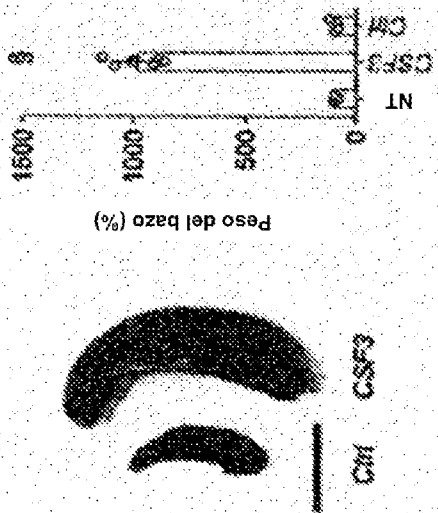


Fig. 5D

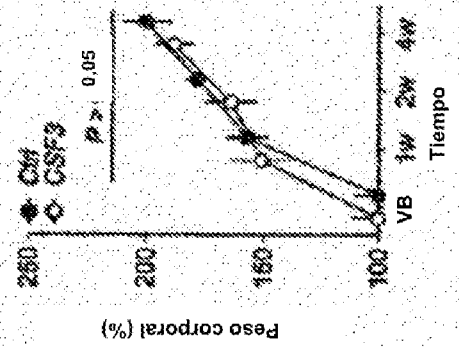


Fig. 5E

Parámetro	(Unidad)	CMI	CSF3	Valor P
N		3	4	
Neutrófilos	(x10 ⁶ /μl)	0.5 ± 0.1	19.2 ± 5.2	< 0.001
ALT (U/l)		50 ± 22	37 ± 13	> 0.05
AST (U/l)		50 ± 25	58 ± 8	> 0.05
NUC (mg/ml)		21 ± 2	21 ± 2	> 0.05
Creatinina (mg/ml)		0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	> 0.05

Fig. 6A

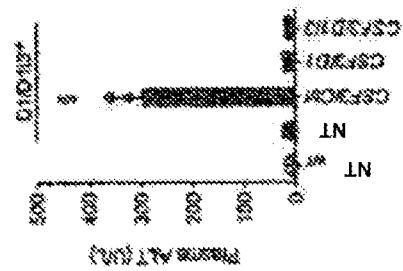


Fig. 6B

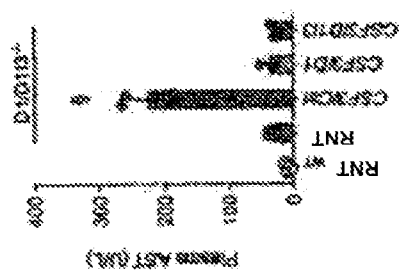


Fig. 6C

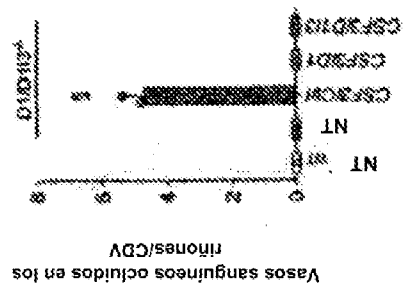
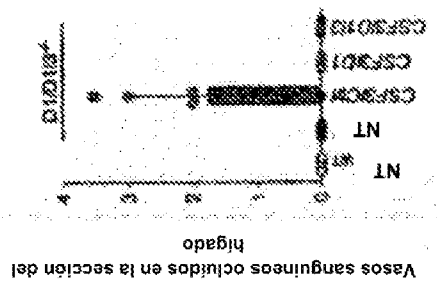
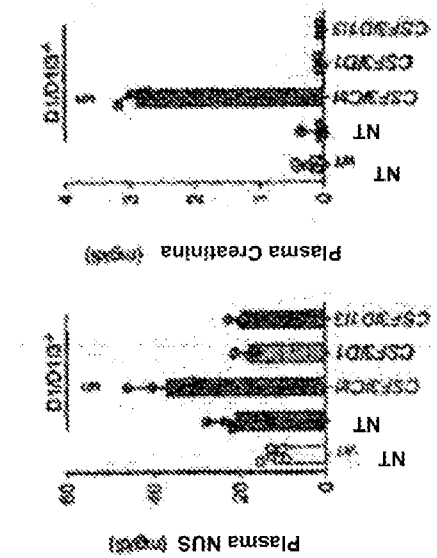


Fig. 6D

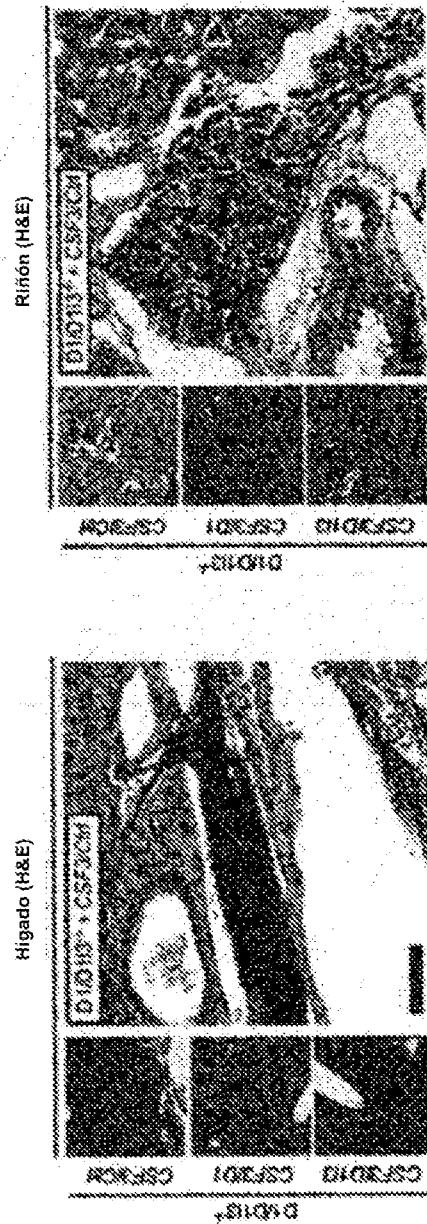
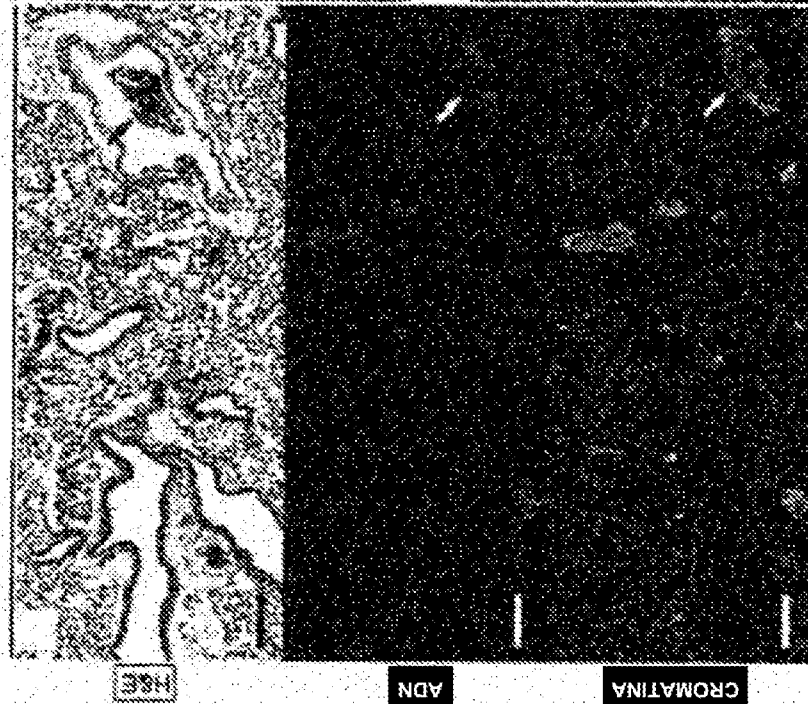


Fig. 7A

01D113⁺ + CSF3CM
Vista general del pulmón



01D113⁺ + CSF3CM
Vasos sanguíneos ocluidos, detalle

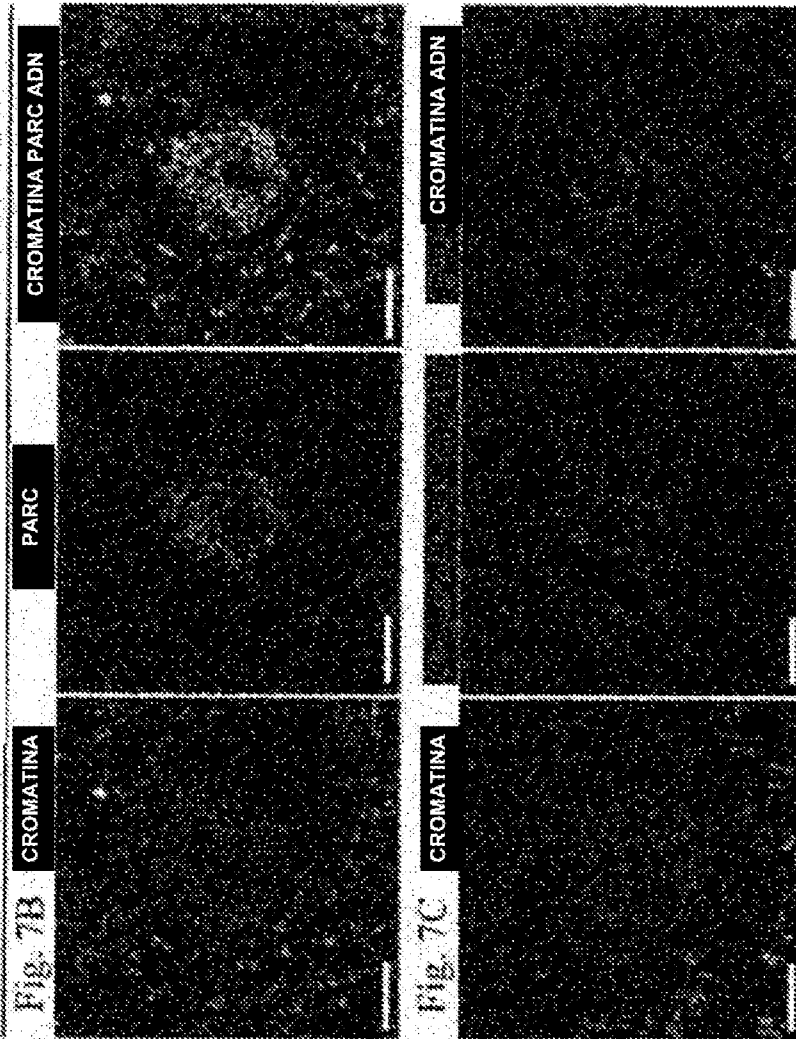


Fig. 8A

Cuáguilo TEN, *in vitro*

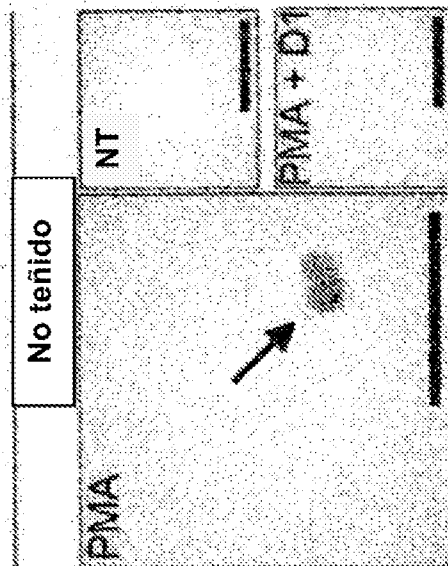


Fig. 8B

Cuáguilo TEN, *in vitro*

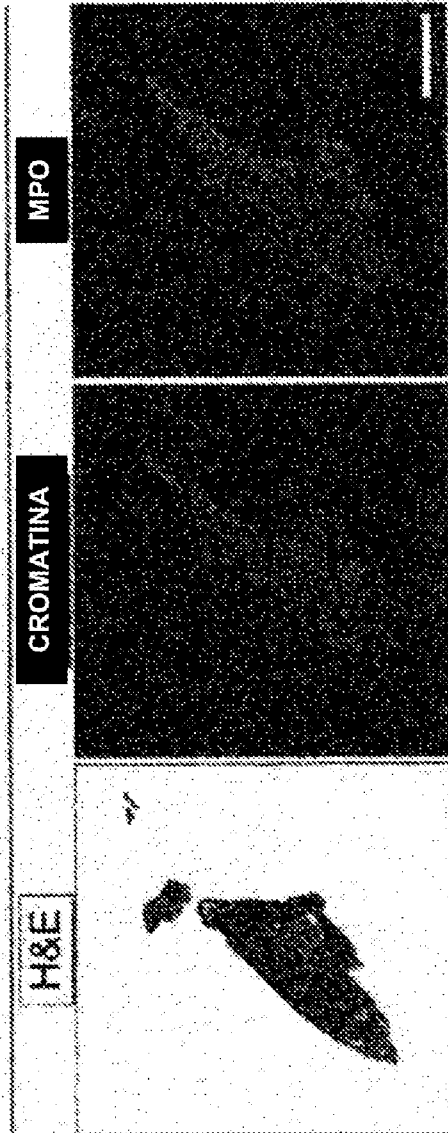


Fig. 9A

Degradación TEN, *in vitro*

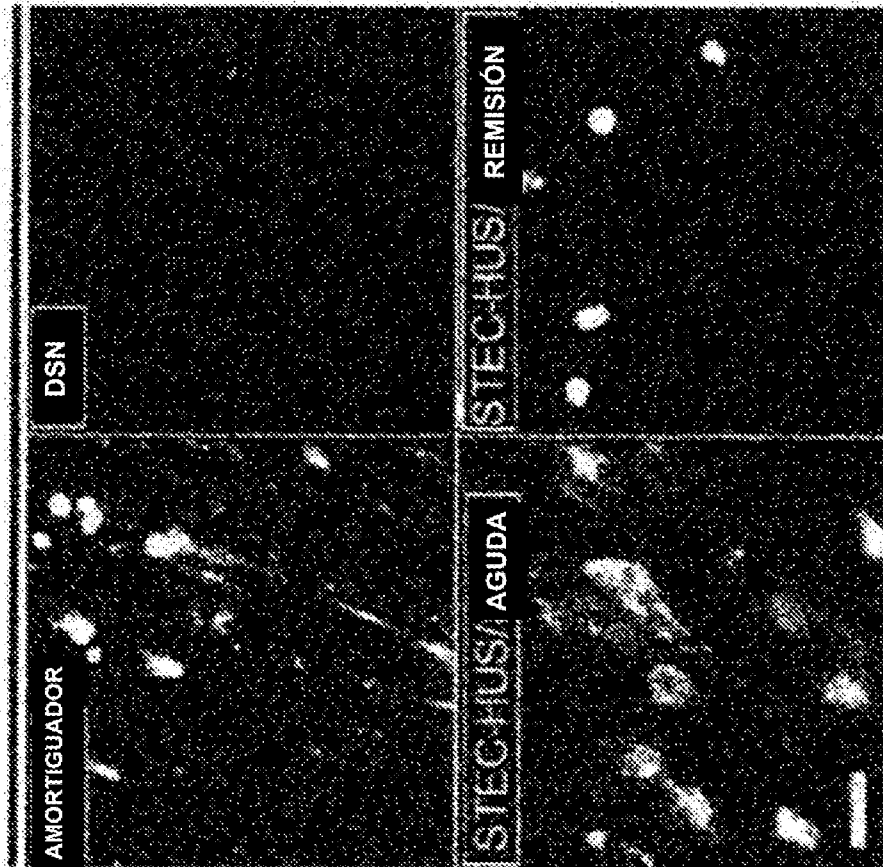


Fig. 9B

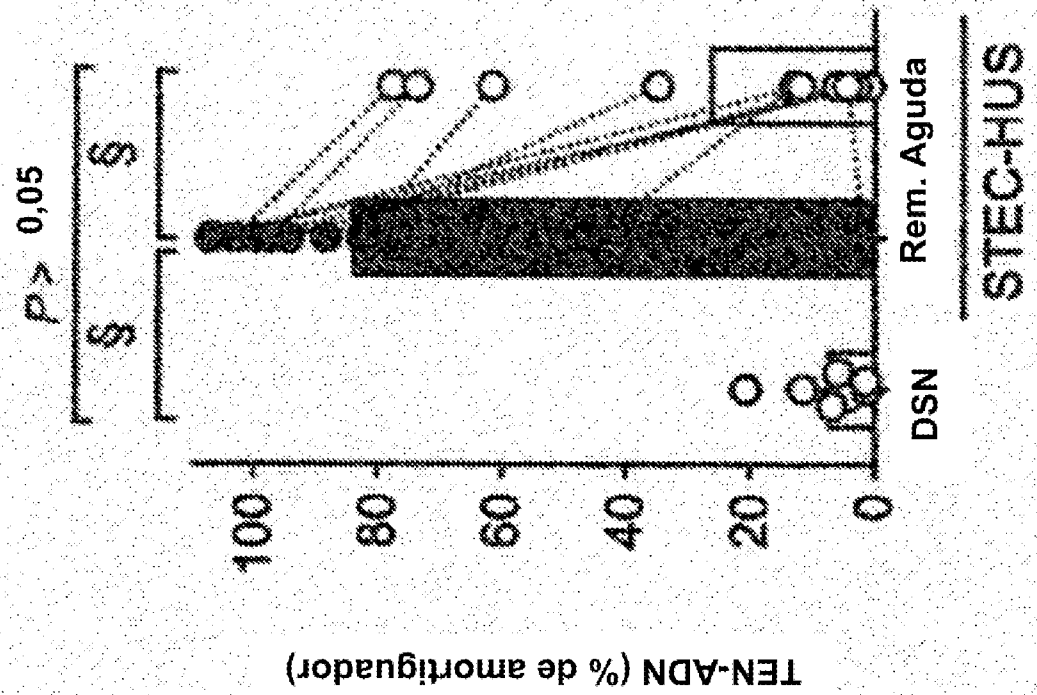


FIG. 10

#	Causa de muerte	Sexo	Edad	Tejido	Cuagulos ricos en hematoxina	Cromatina & MPO - positivo	Localización
1	SDRA	M	84	Pulmón	Sí	Sí	Bronquios
2	Falla cardiovascular séptica + SDRA	F	63	Pulmón	No	No aplicable	No aplicable
3	SDRA	F	67	Pulmón	No	No aplicable	No aplicable
4	Falla multiorgánica séptica + SDRA	M	72	Pulmón	Sí	Sí	Bronquios
5	Falla séptica cardiovascular + SDRA	F	75	Pulmón	No	No aplicable	No aplicable
6	Falla multiorgánica séptica + SDRA	M	60	Pulmón	Sí	Sí	Vaso sanguíneo
7	Falla cardiovascular séptica	F	76	Pulmón	Sí	Sí	Vaso sanguíneo
8	SDRA	F	68	Pulmón	No	No aplicable	No aplicable

Fig. 11A

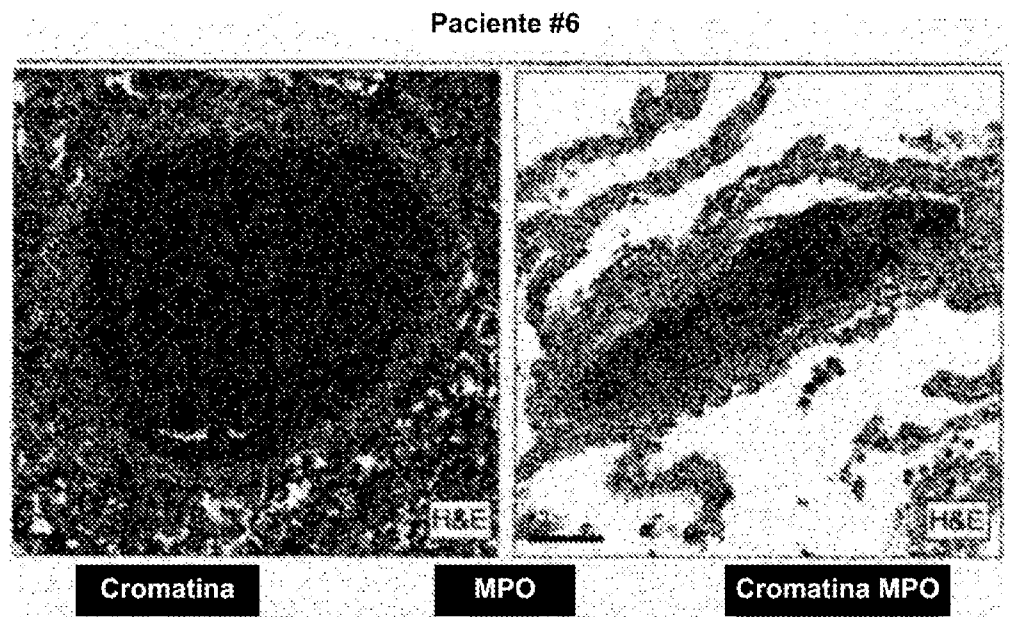


Fig. 11B

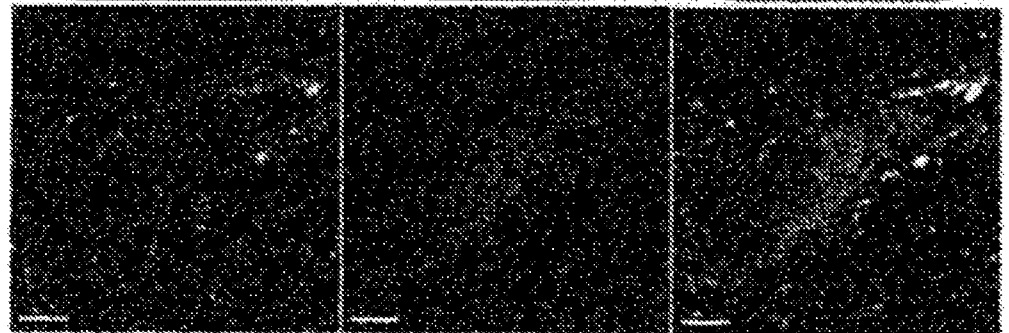


Fig. 11C

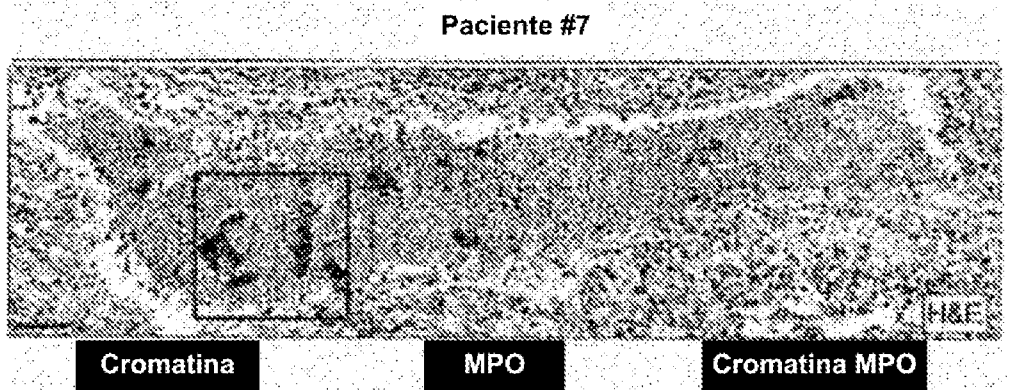


Fig. 11D

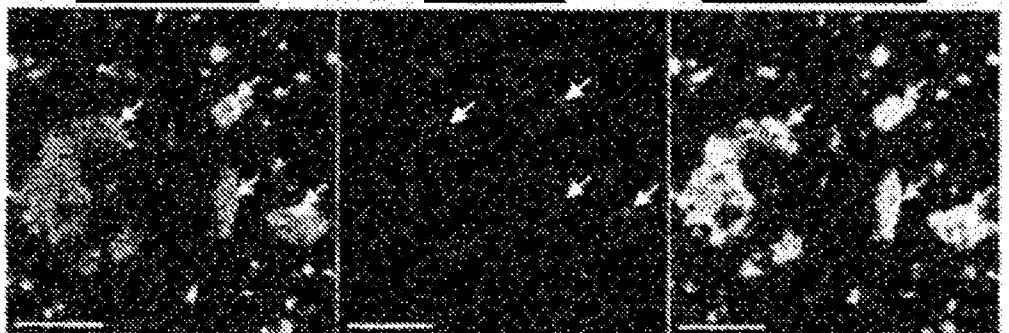


FIG. 12

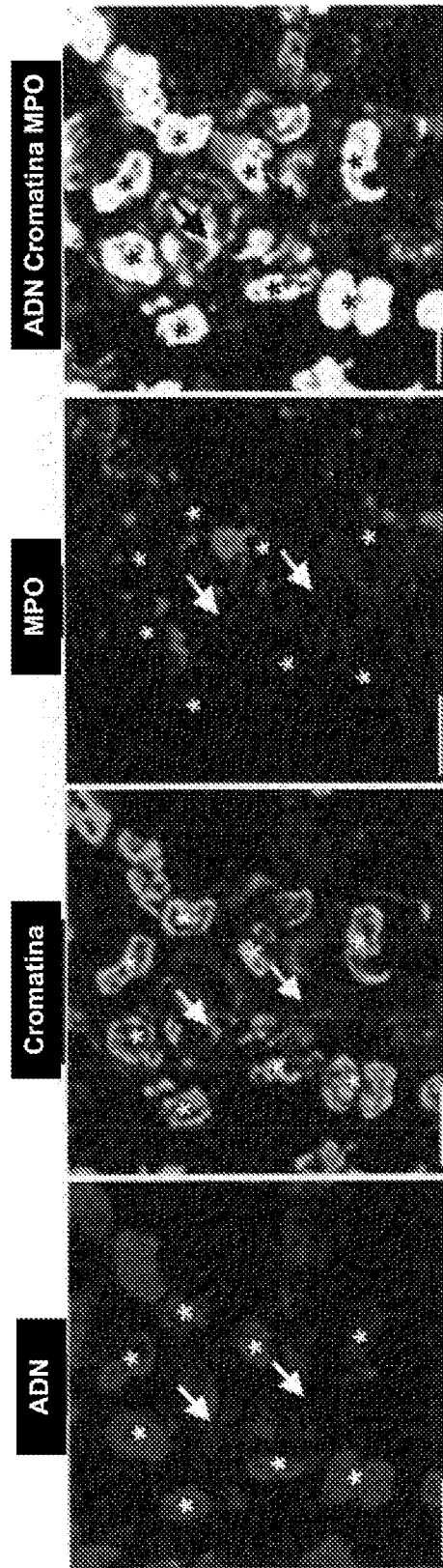


Fig. 13A

TENS fijados con PFA

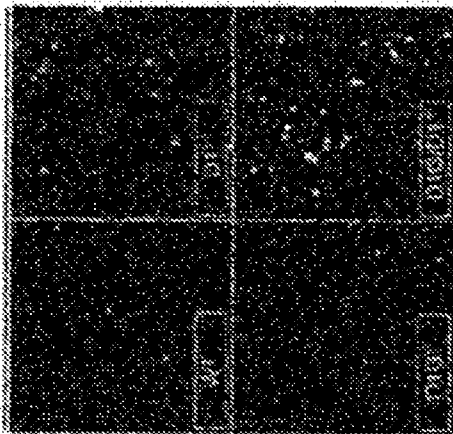


Fig. 13B

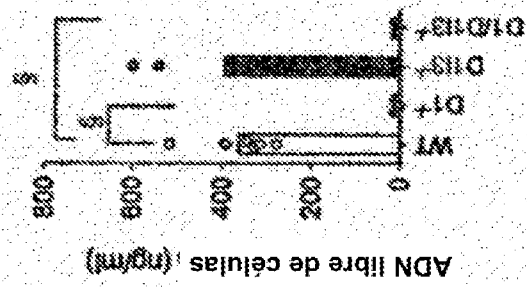


Fig. 13C
TENS

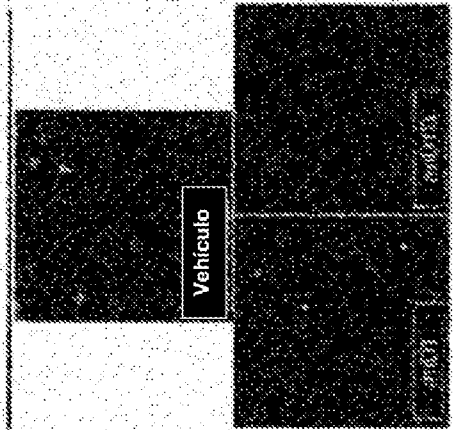


Fig. 13D

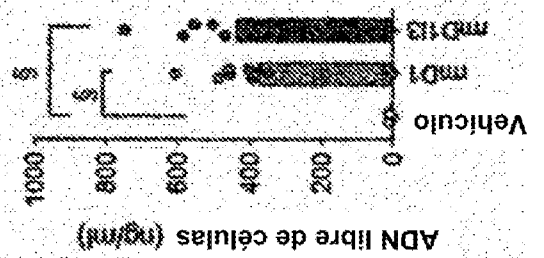


Fig. 13E
TENS fijados con PFA

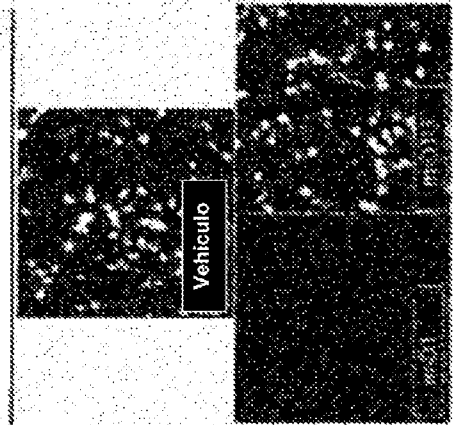


Fig. 13F

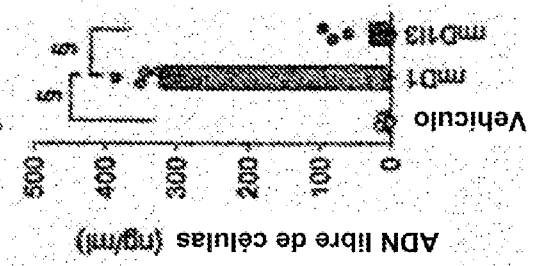


Fig. 14A

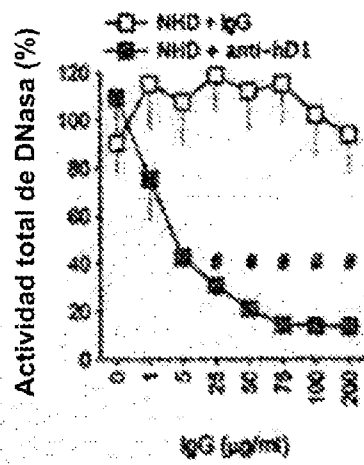


Fig. 14B

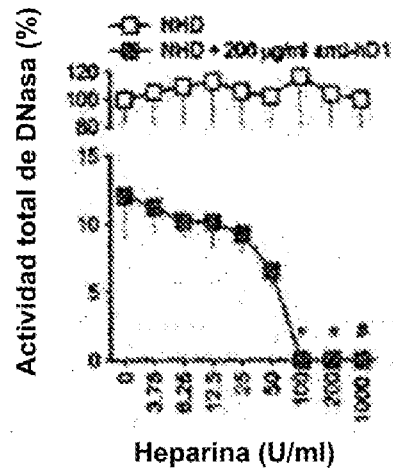


Fig. 14C



Fig. 14D

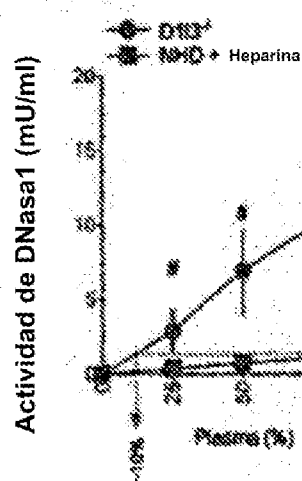


Fig. 14E

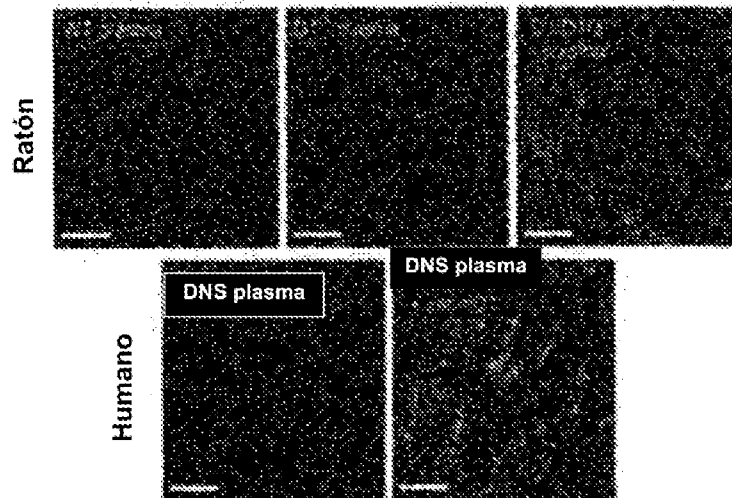
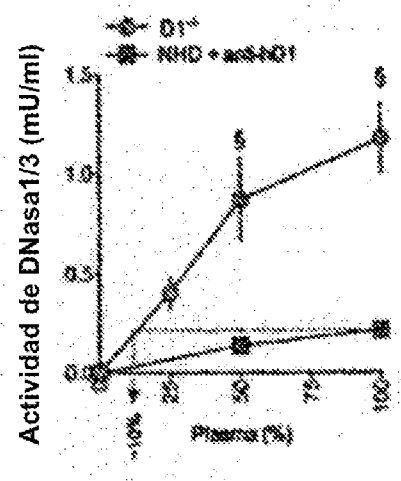


Fig. 14F

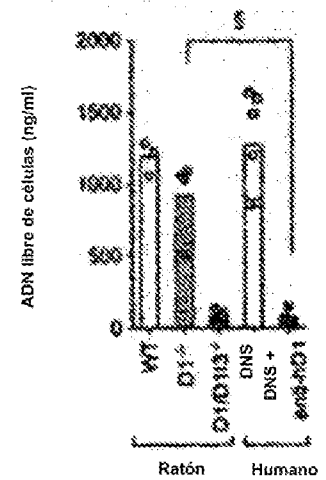


Fig. 14G

Fig. 15A

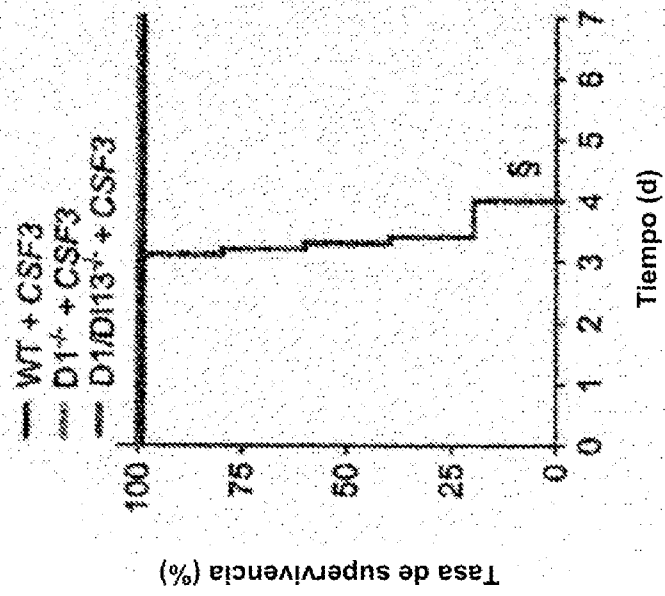


Fig. 15B

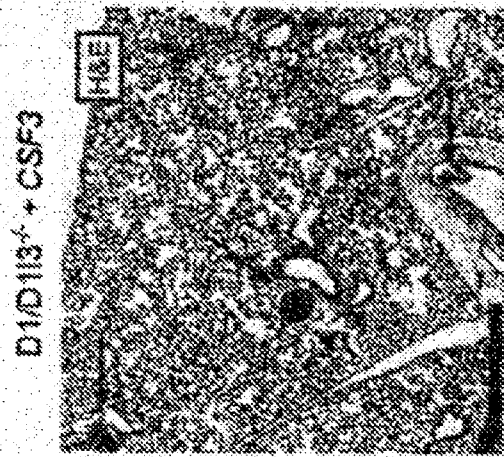


Fig. 15C

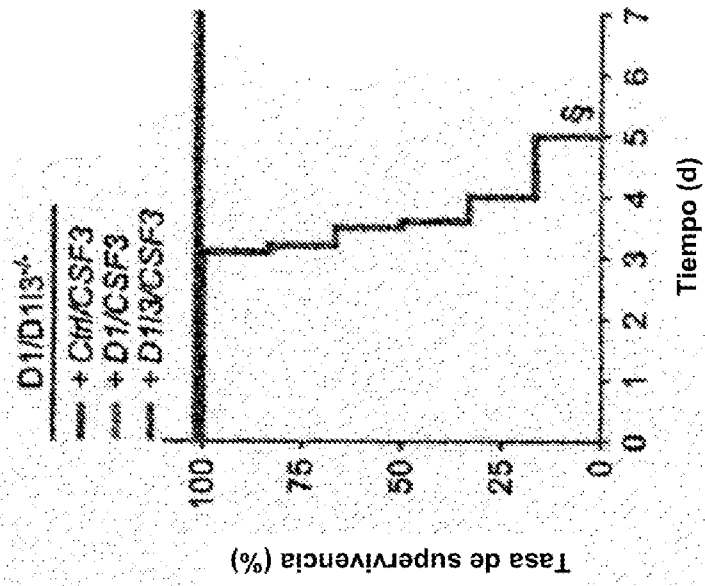


Fig. 16A

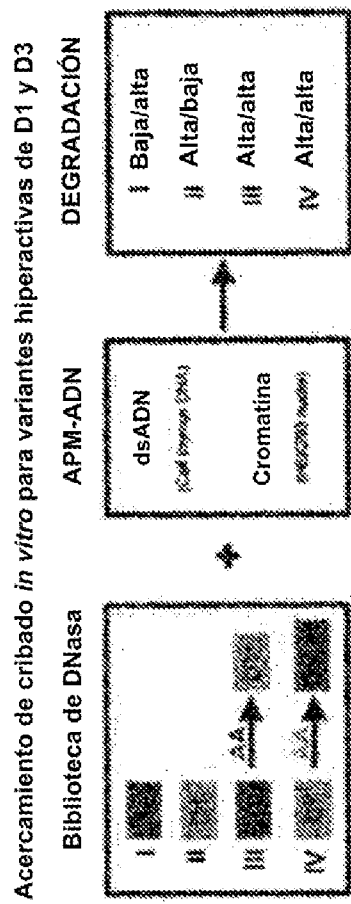


Fig. 16B Sistema de lectura: degradación de dsADN & cromatina

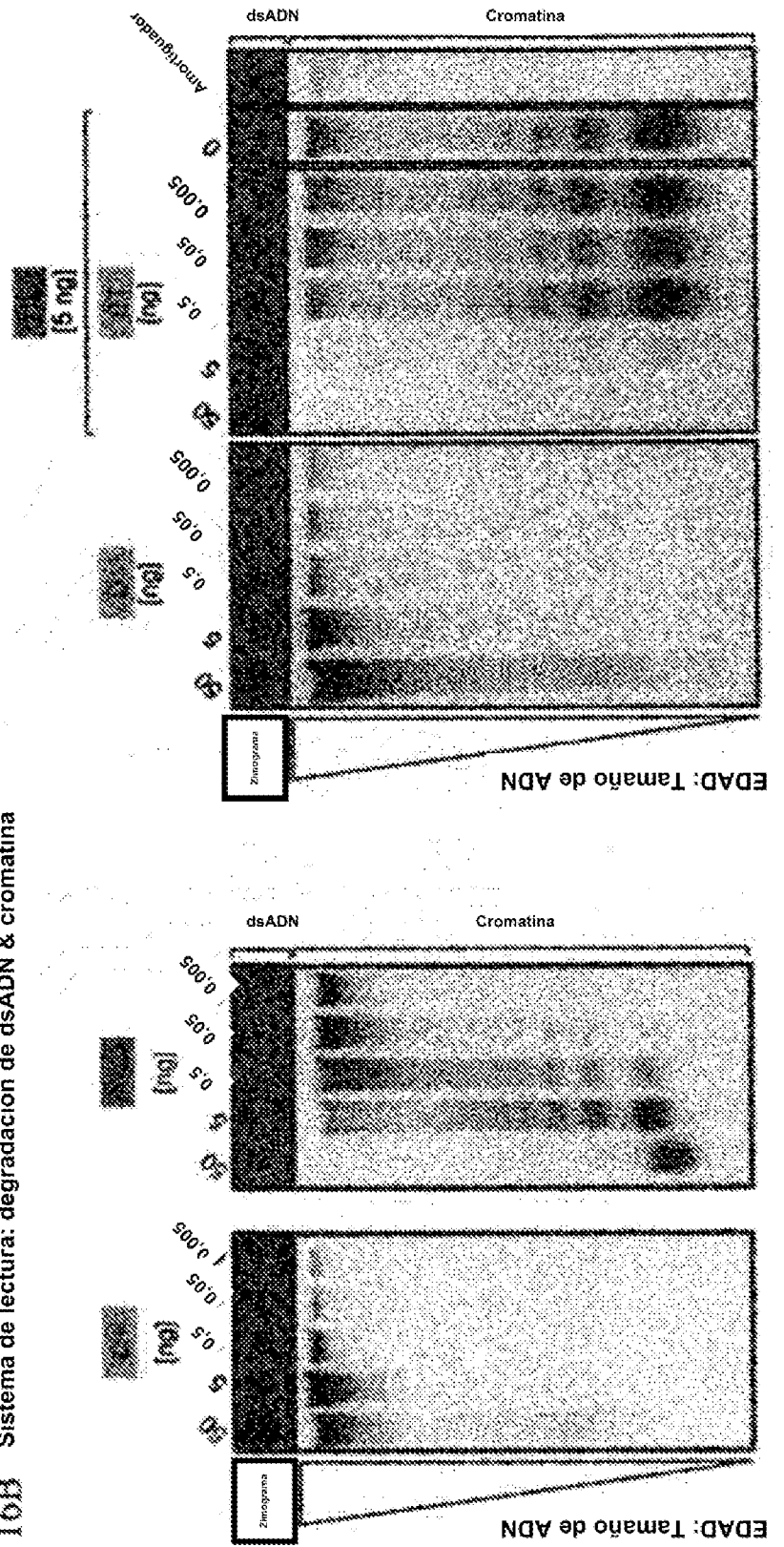


FIG. 17

Dnasat1 humana Regla de secuencia	M P G M K L I G A I L A A I L Q G A V S L K I A A E M I O T G E T E M N A T L V S Y I V O I L S M Y D I A K V O E V R D S M I T A V G K L I D N I M Q D 1 10 20 30 40 50 60 70
Dnasat1L3 humana Regla de secuencia	M S R E L A P L I L L I S I N S A L A M R I C S E M V S F G S K Q E D N A M D V I V V I R C D I I E V M E I K D E N N I C P I M E I K M M 1 10 20 30 40 50 60 70
Dnasat1 humana Regla de secuencia	A P D T Y H Y V V E E P I G R N S Y K E R Y L E V E R P D Q V S A V D S Y Y K D G C E P C O N D T F N R R E A I V R F F R F T E V R E F A I V P I N H A A 80 90 100 110 120 130 140 150
Dnasat1L3 humana Regla de secuencia	S G I T Y H Y V I S S L O R N T Y K E O V A F L Y K E L V S V S Y H Y H D Y Q D G D A D V F S R E F V V M F Q S P H T A V K D F V I P L P T T 80 90 100 110 120 130 140 150
Dnasat1 humana Regla de secuencia	P G D A V A E I D A L Y D V L D V O E K R G L E D V M L M G D F N A G C S Y V R P S Q W S S I R L W T S P T F Q W L I P S A D T T A T P T H C A Y O R I Y 160 170 180 190 200 210 220 230
Dnasat1L3 humana Regla de secuencia	P E T S V E I D E L V E Y T D V H R R A E N F I F M G D F N A G C S Y V P A A N I R L T O P F V P L I G D Q E D T T V S T N C A Y O R I Y 160 170 180 190 200 210 220 230
Dnasat1 humana Regla de secuencia	V A D M L I R C A V V P S A L P E N F Q A A Y G L S D Q I A Q A I S D H Y P F V E V M E K 240 250 260 270 280
Dnasat1L3 humana Regla de secuencia	L Q G E I V S S V P S M S V E D Q A Y I T E E C A L O V S D R F P V E F I L O S S A F T N G S V T I S S S S S 240 250 260 270 280 290 300
Péptido señal Aminoácidos conservados Cola C-terminal en D1L3	

FIG. 18

#	DNasa1L3	DNasa1	Mutación en DNasa1	Analizado en esta aplicación
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	K189 (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)	-	-	-

62

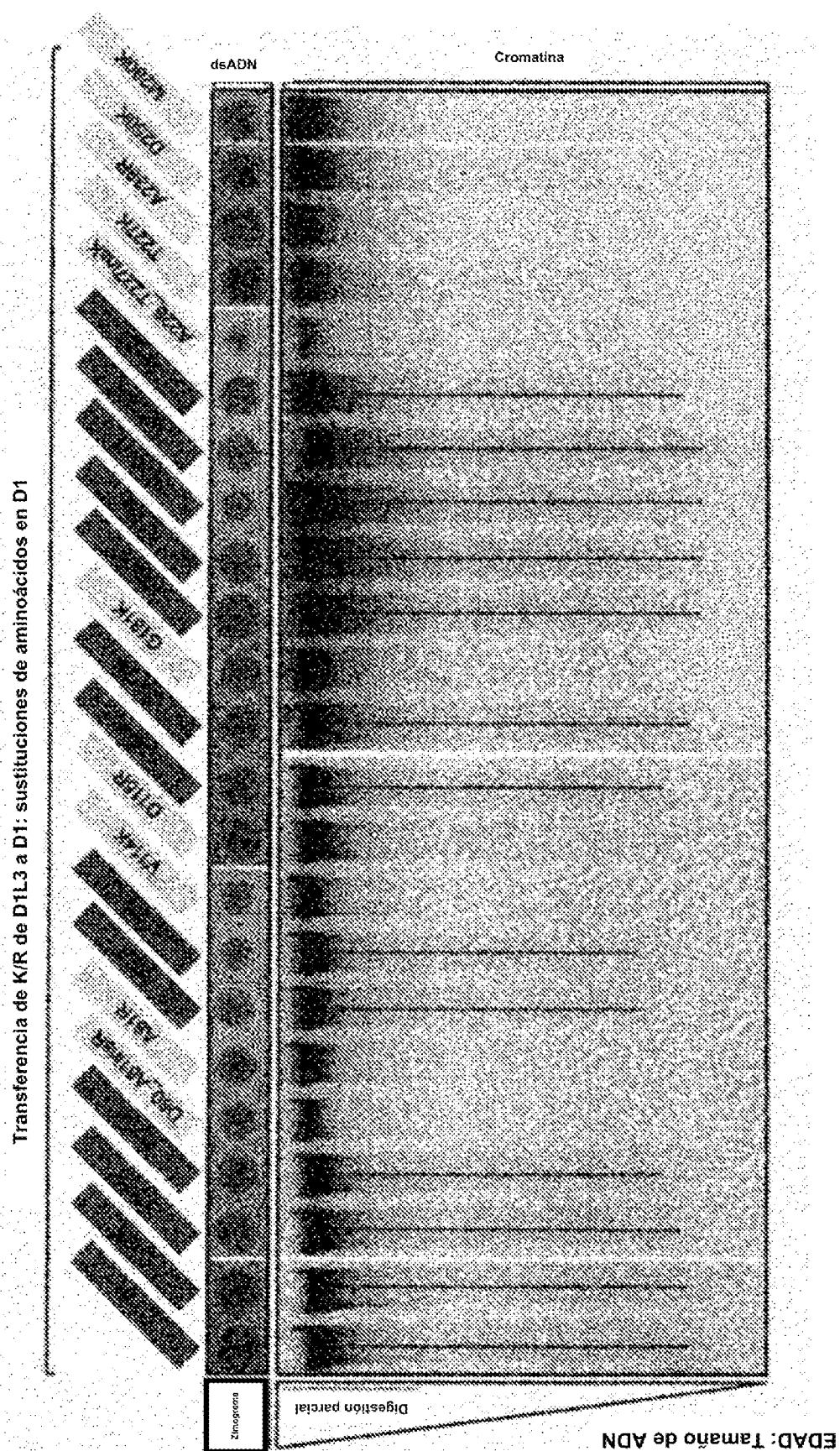


FIG. 2B



Fig. 21A

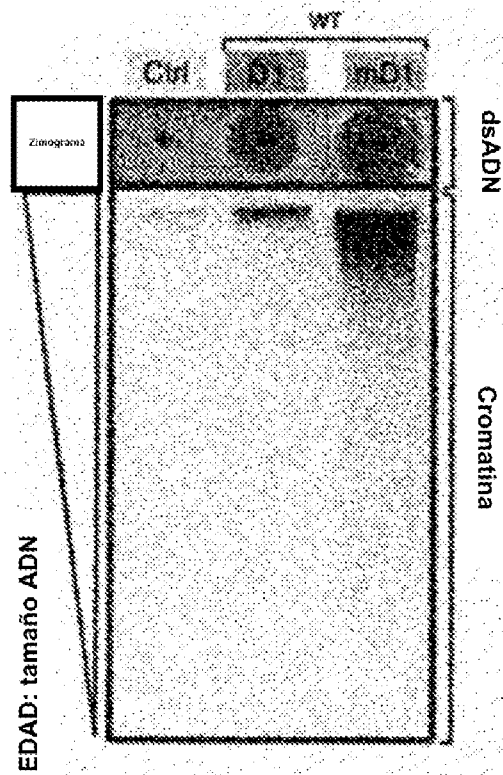
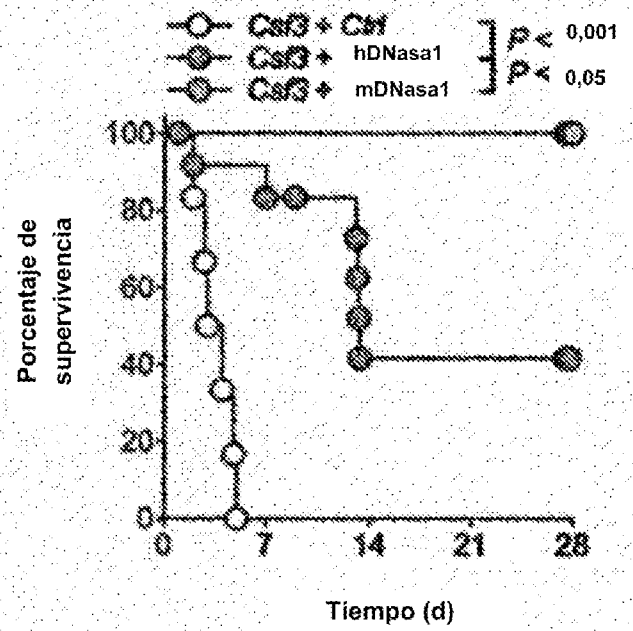


Fig. 21B



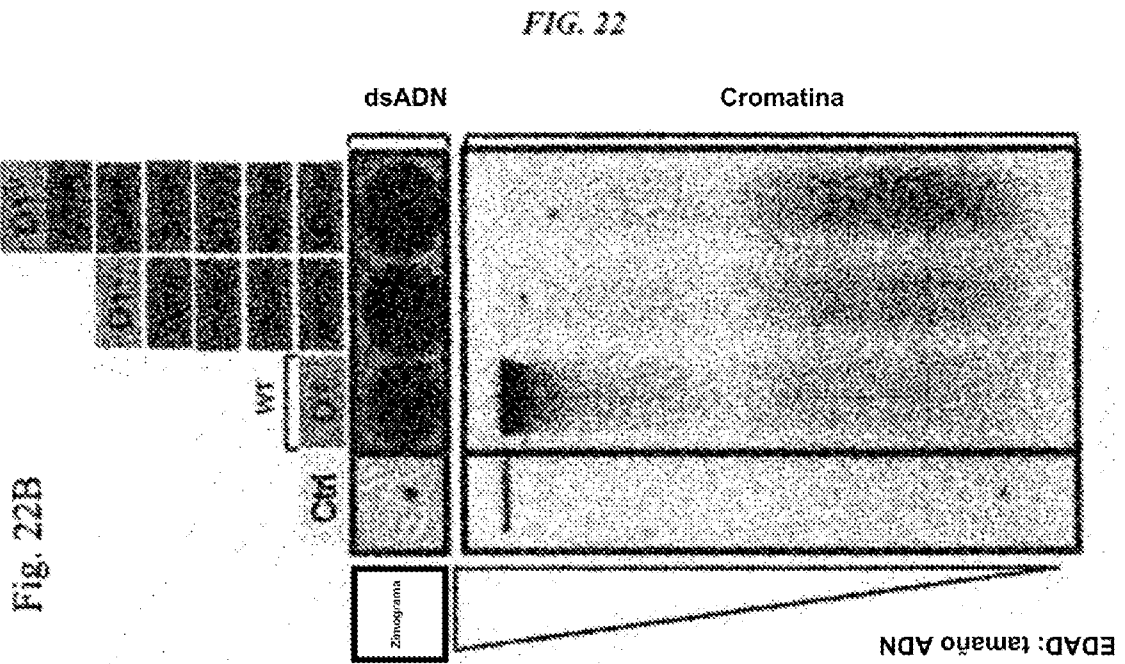
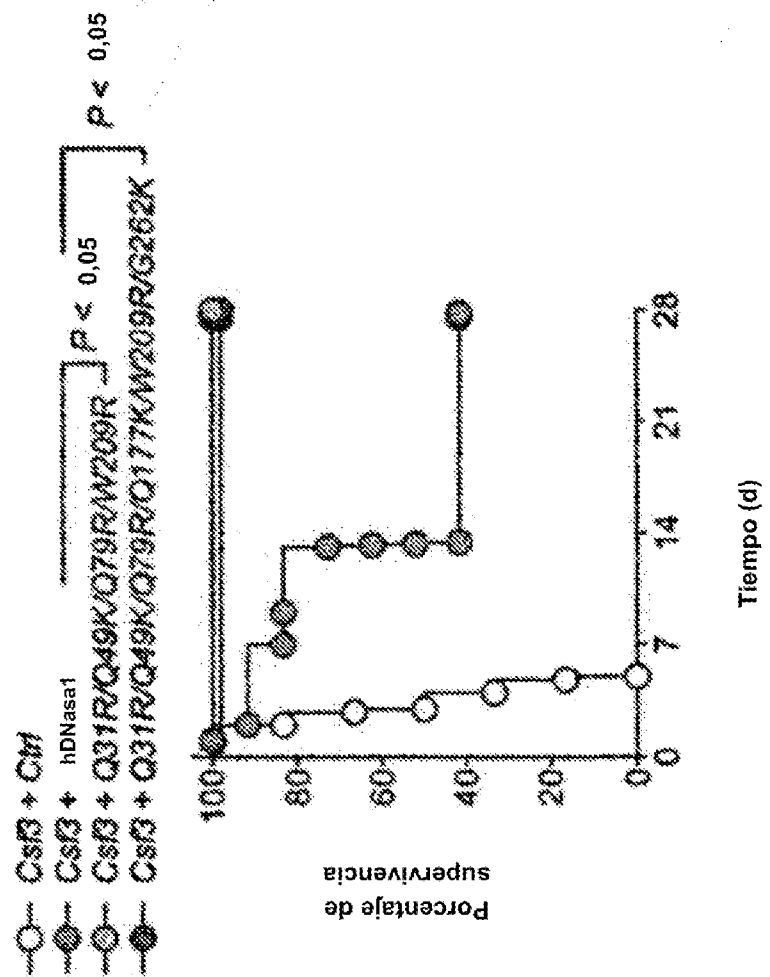


Fig. 22A



Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1 humana	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1L3 humaa	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1 humana	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1L3 humaa	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1 humana	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1L3 humaa	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1 humana	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70
DNasa1L3 humaa	10	20	30	40	50	60	70
Regla de secuencia	10	20	30	40	50	60	70

Péptido señal

AA de ingeniería en D1 [82 AA, 184 Mutaciones]

AA de ingeniería en D1, presente en D1L3, sin ganancia de función [4 Mutaciones]

AA de ingeniería en D1, presente en D1L3, con ganancia de función [3 Mutaciones]

Fig. 24B

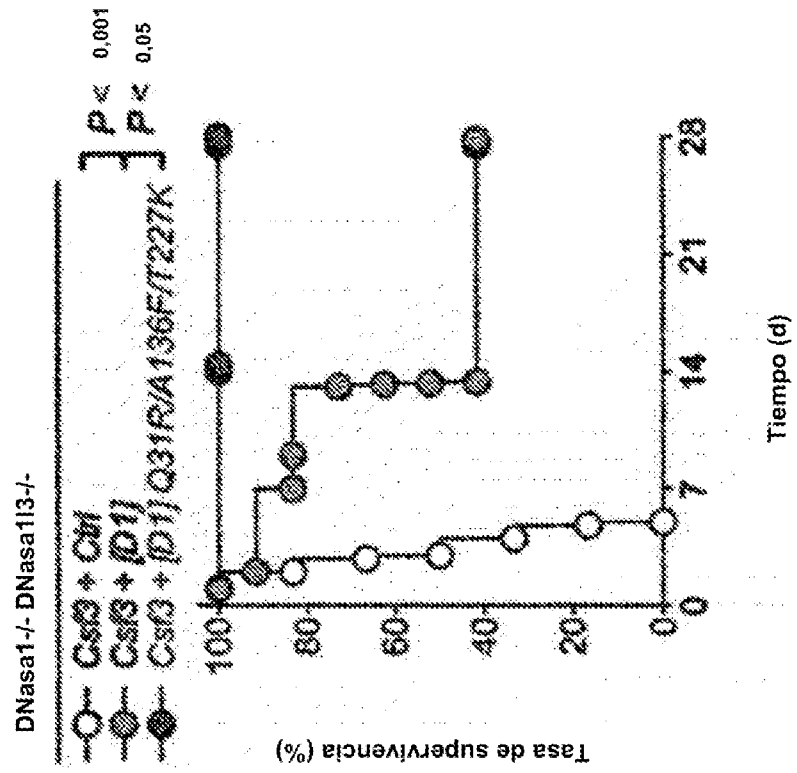


Fig. 24A

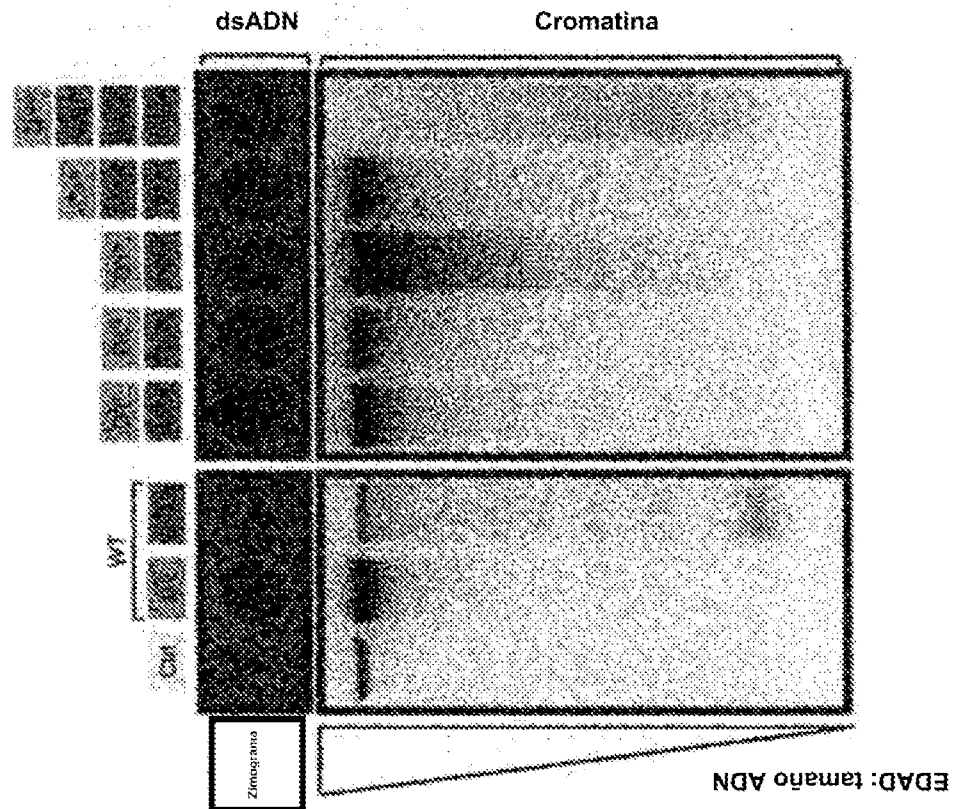


FIG. 25

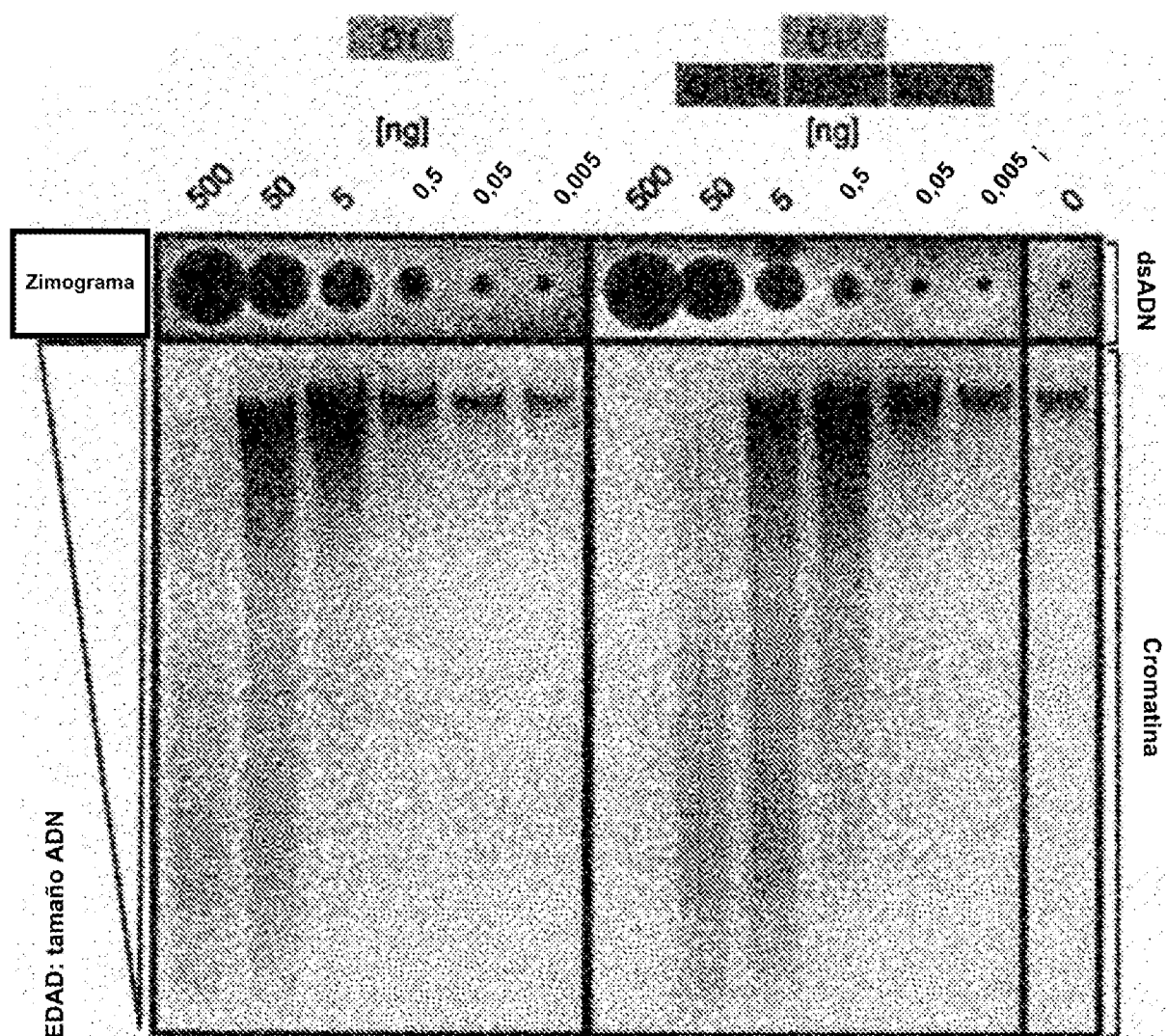


FIG. 26

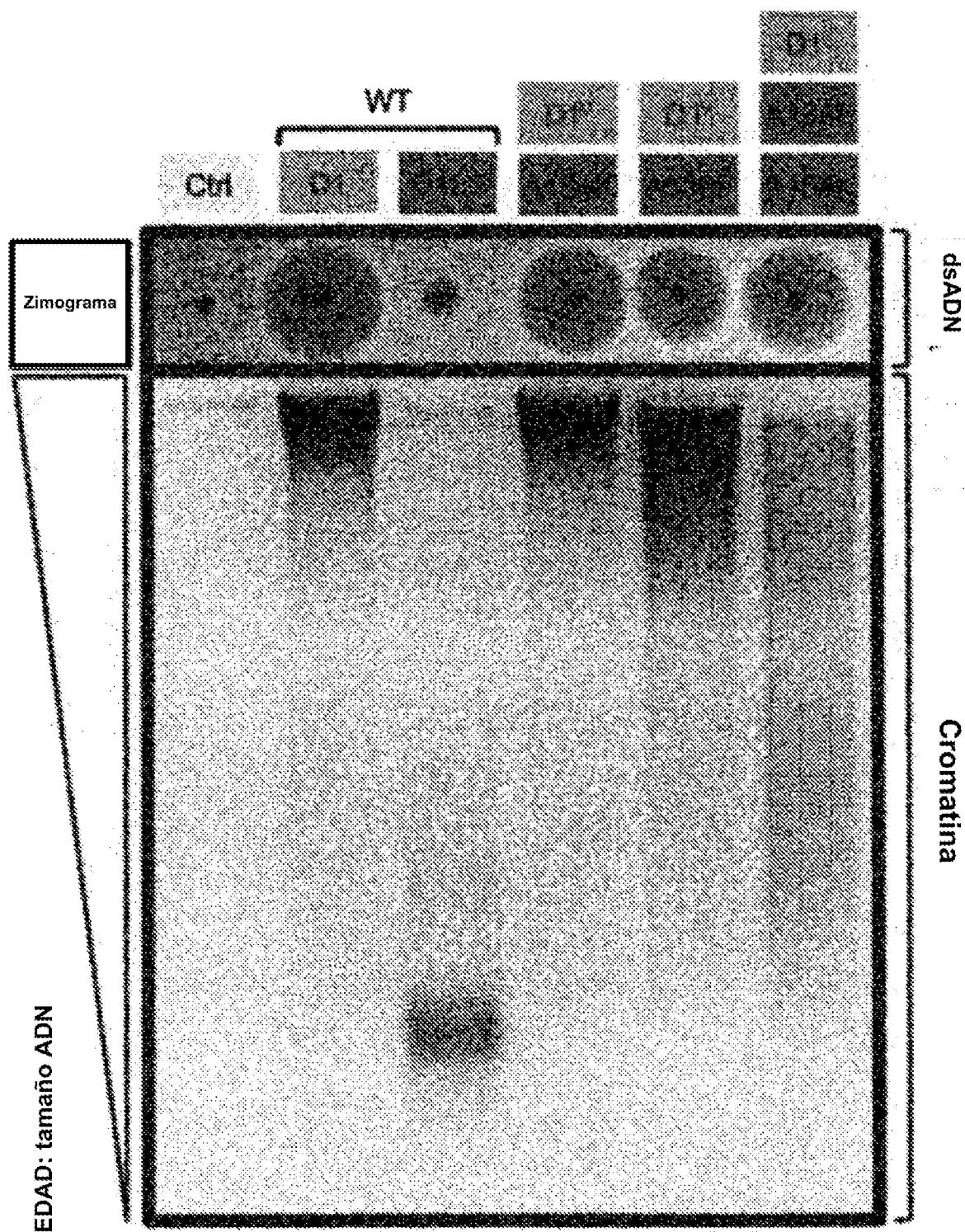


Fig. 27A

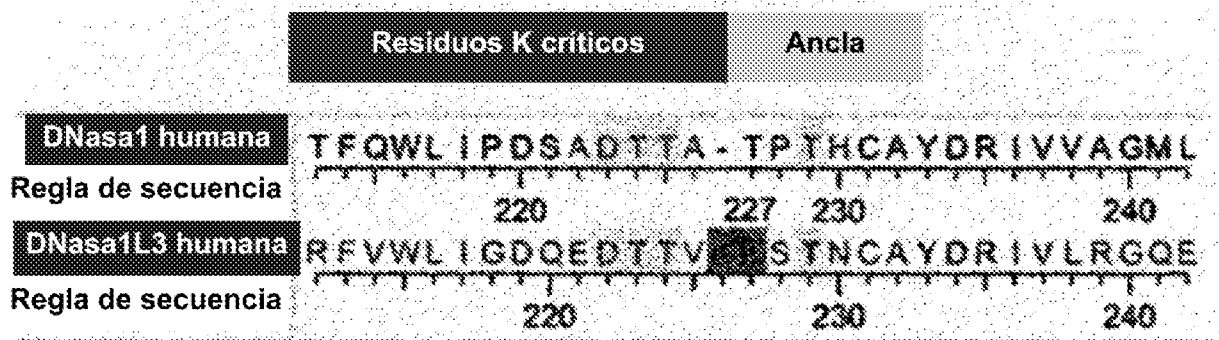


Fig. 27B

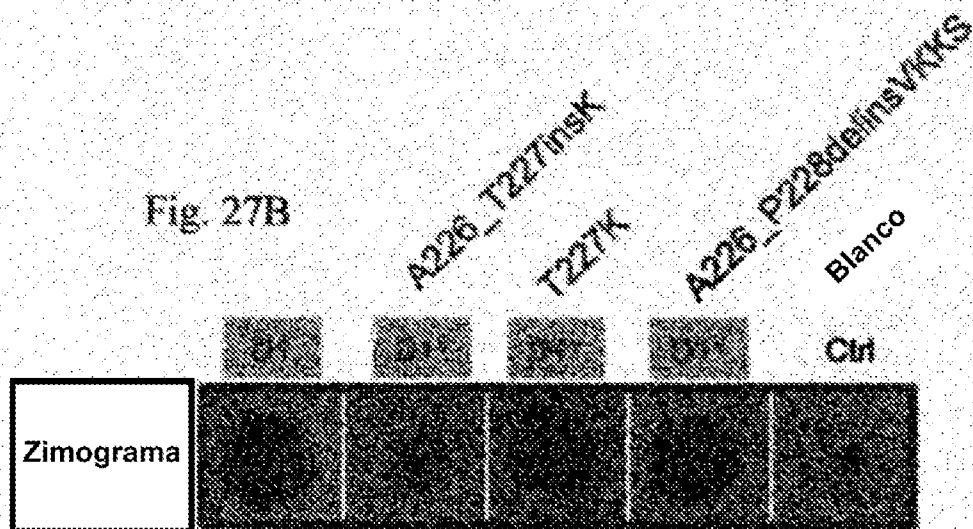


FIG. 28

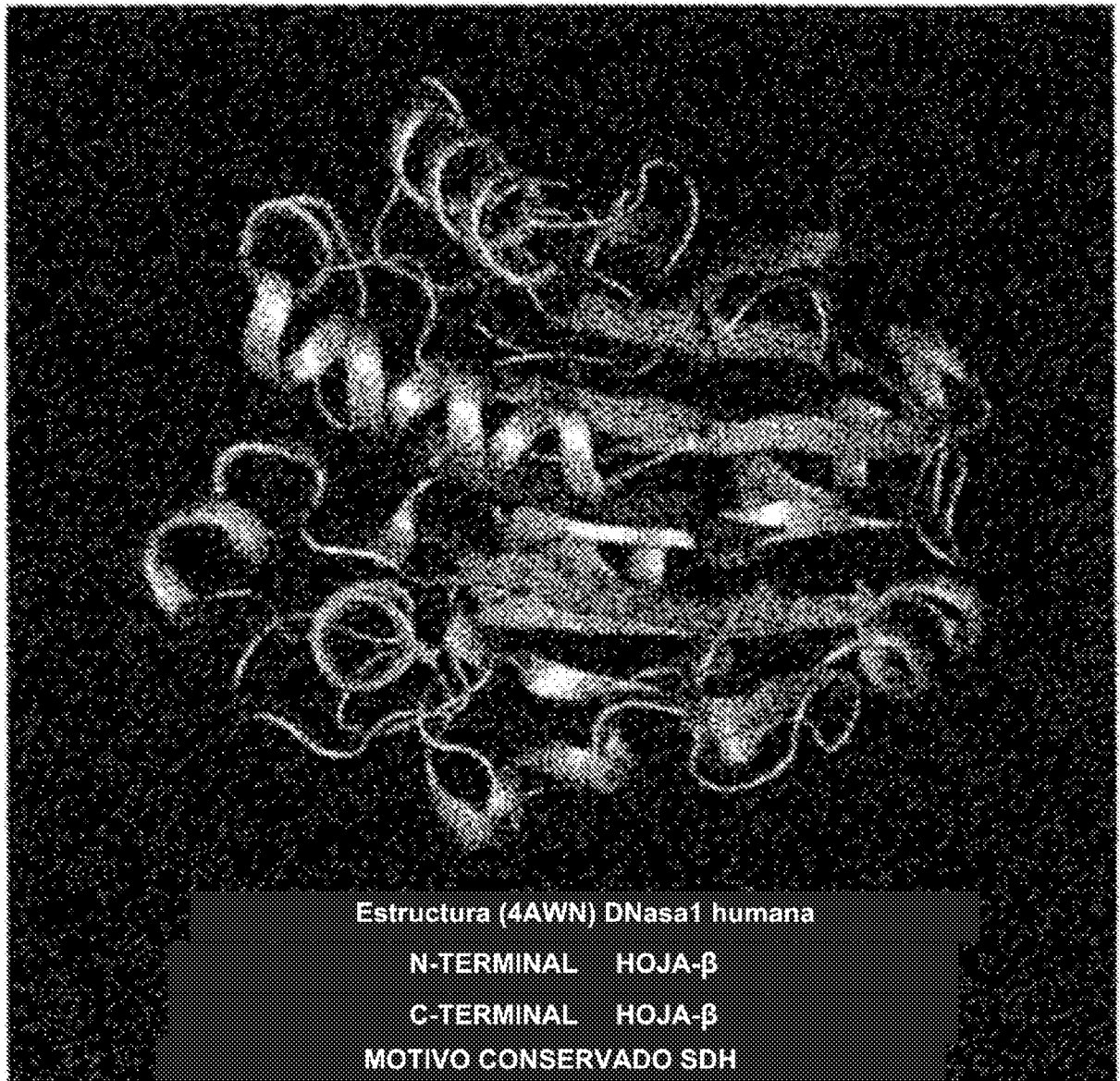
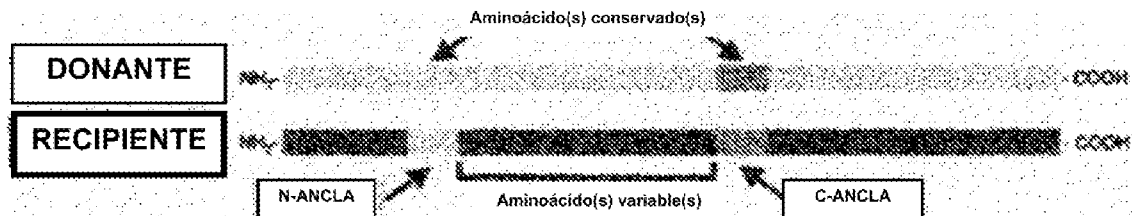


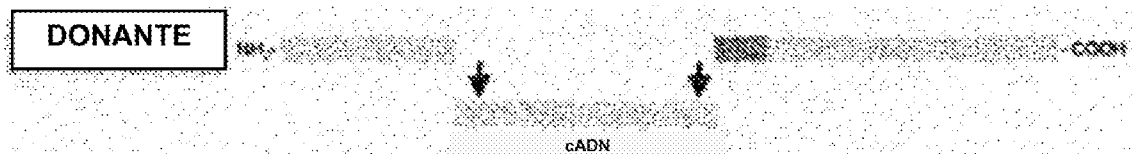
FIG. 29

INGENIERÍA DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

I. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS HOMÓLOGAS



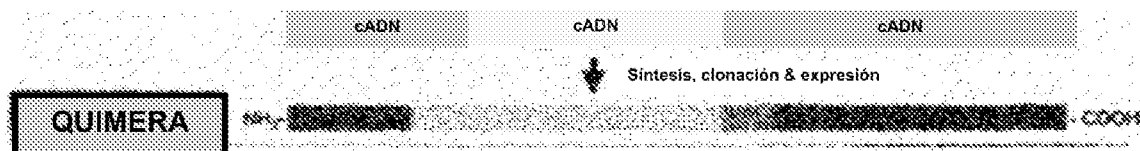
II. EXCISIÓN DE CODIFICACIÓN DE CADN PARA AMINOÁCIDOS VARIABLES EN ENZIMA DONANTE



III. DELECIÓN DE CODIFICACIÓN DE CADN PARA AMINOÁCIDOS VARIABLES EN ENZIMA RECIPIENTE



IV. TRANSFERENCIA DE CADN DESDE ENZIMA DONANTE A ENZIMA RECIPIENTE



REPETIDO SEÑAL	AA CONSERVADA = ANCLAS	VARIABLE AA = BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN
RATON (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCE (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
RATON (O55070) RATA (O89107) CHIMPANCE (H2QMU7) HUMANO (Q13609) REGLA DE SECUENCIA	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
RATON (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCE (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
RATON (O55070) RATA (O89107) CHIMPANCE (H2QMU7) HUMANO (Q13609) REGLA DE SECUENCIA	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000	80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

FIG.30 (CONTINUADA)

DnaS1	RATÓN (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCÉ (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
DnaS1L3	RATÓN (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCÉ (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
DnaS1	RATÓN (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCÉ (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
DnaS1L3	RATÓN (P49183) RATA (P21704) CHIMPANCÉ (H2QAH1) HUMANO (P24855) REGLA DE SECUENCIA	160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230
		160 170 180 190 200 210 220 230	160 170 180 190 200 210 220 230

VARIABLE AA = BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN

AA CONSERVADA =
ANCLAS

PEPTIDO SEÑAL

Fig. 31A

Ejemplo de ingeniería de bloques de construcción: variantes DNasa1 (D1) humana con bloques de construcción de DNasa1L3 (D1L3) humana

# BC	N-ÁNCRA D1: AA CONSERVADA EN D1	C-ÁNCRA D1: AA CONSERVADA EN D1	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1: VARIABLE AA EN D1	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1L3: VARIABLE AA EN D1L3	MUTACIONES DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES D1	CLUSTER BC
0	N/A	N/A	1-22 (MRGMKLL GALLAALALQGAVS)	1-20 (MSRELAPILLLLLSHSALA)	M1_S22delmsMSRELAPILL LLLSHSALA	BB ₀
1	Péptido señal					
2	F28/N29	F28/N29	23-27 (LKIAA)	21-25 (MRICS)	L23_A27delmsMRICS	BB ₁₋₃
3	F33/G34	F33/G34	30-32 (IQT)	28-30 (VRS)	I30_T33delmsVRS	
4	F33/G34	K37	35-36 (ET)	33-34 (ES)	E35_T36delmsES	
5	K37	V48	38-47 (MSNATLVSYI)	38-45 (QEDKNAMDI)	M38_A74delmsQEDKNAMDI	BB ₄
6	R53	R53	49-52 (QILS)	47-50 (KVIK)	Q49_S52delmsKVIK	BB ₅₋₇
7	D55	D55	54 (Y)	52 (C)	Y54C	
8	D55	E61	56-60 (IALVO)	54-58 (RLVM)	I56_Q60delmsRLVM	
9	E61	D64	62-63 (VR)	60-61 (IK)	V62_R63delmsIK	
10	D64	L73	65-72 (SHLTAVGK)	63-70 (SNNRICPI)	S65_K72delmsSNNRICPI	BB ₈₋₁₀
11	L73	L77/N78	74-78 (LDN)	72-74 (MEK)	L74_N76delmsMEK	
12	L77/N78	Y65	79-81 (QAGSDI)	77-79 (GNSRRSD)	G79_V81delmsGNSRRSD	BB ₁₁
13	Y65	Y67	84 (H)	84 (H)		
14	Y67	S90	85-90 (LVQ)	89-90 (VQ)	V86_V90delmsVQ	BB ₁₂₋₁₄
15	S90	L93/G94/E100	91-93 (EP)	91-93 (EP)	E91_P92delmsEP	
16	L93/G94/R95	Y98/R99/E100	96-97 (NS)	95-97 (NT)	N95_S97delmsNT	BB ₁₅₋₁₈
17	Y98/R99/E100	Y102	101 (R)	101 (Q)	R101Q	
18	Y102	F104	103 (L)	103 (A)	L103A	
19	F104	Y106	105 (V)	103 (L)	V105L	
20	Y106	V111/S112	107-110 (RPDO)	107-110 (KERL)	R107_Q110delmsKERL	BB ₁₉₋₂₂
21	Y111/S112	Y117	113-116 (AVDS)	113-116 (VRRS)	A113_S116delmsVRRS	
22	Y117	Y119	118 (Y)	118 (H)	Y118H	
23	Y119	D121	120 (D)	120 (H)	D120H	
24	D121	D128	122-128 (GCEPCGN)	122-127 (YQDGA)	G122_N126delmsYQDGA	BB ₂₃₋₂₅
25	D128	F131	130 (T)	129 (V)	T130S	
26	F131	R133/E134/P135	132 (N)	131 (S)	N132S	
27	R133/E134/P135	V153	131-137 (Q)	129-135 (E)	E129_P136delmsE	BB ₂₆₋₂₇
28	V138	F140	139 (R)	138 (W)	R139W	
29	F140	T145	141-144 (FSRF)	140-143 (QSPH)	F141_F144delmsQSPH	BB ₂₇₋₃₄
30	T145	F150	146-149 (EVRE)	145-148 (IAVKD)	E146_E149delmsIAVKD	
31	F150	I152	151 (A)	150 (V)	A151V	
32	I152	P154/L155/H156	153 (V)	152 (I)	V153I	
33	P154/L155/H156	P158	157-158 (AA)	156-157 (TT)	A157_A158delmsTT	
34	P158	V163	160-162 (GDA)	159-161 (ETS)	G160_A162delmsETS	
35	V163	E165/I166/D167	164 (A)	163 (K)	A164K	

FIG.31A (CONTINUADA)

# BC	N-ANCLA D1: AA CONSERVADA EN D1	C-ANCLA D1: AA CONSERVADA EN D1	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1: VARIABLE AA EN D1	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1.3: VARIABLE AA EN D1.3	MUTACIONES DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES D1	CLUSTER BC
35	E183I183D187	L183	183(A)	187(E)	A188E	88 ₁₂₋₉₇
36	L189	V172V173	170-171(YO)	188-171(VS)	Y170_D171delnsVE	
37	V172V173	D175V178	174(L)	173(T)	L174T	
38	Q175V178	W180	177-179(OEK)	178-178(KHR)	Q177_K179delnsKHR	88 ₁₀₋₄₀
39	W180	E183	181-182(GL)	180-181(KA)	G181_L182delnsKA	
40	E183	M187-GDFNAGCSY- V198	184-187(DVML)	183-187(NFIF)	D184_L187delnsNFIF	
41	M187-GDFNAGCSY-V198	V198	188-202(RPSC)	195-201(TPKA)	R197_G198delnsTPKA	88 ₁₀₋₄₀
42	Q203	Q206N207G208	204-208(LSG)	207-204(KN)	S205_S207delnsKN	
43	Q206N207G208	T210	209(O)	208(O)	W208O	
44	T210	K212	211(S)	210(O)	S211O	88 ₁₀₋₄₀
45	K212	F214	213(L)	212(O)	F214O	
46	L214	Q216G217G218	215(C)	214(O)	Q216O	
47	Q216G217G218	G220	219(P)	218(O)	G219O	88 ₁₀₋₄₀
48	G220	D223V224V225	221-222(SA)	220-223(OE)	S221_A223delnsOE	
49	D223V224V225	T225	226-28(A1P)	225-28(LKS)	A226_P228delnsLKS	
50	T228	C231-AYDR-V237	230(H)	230(N)	H230N	88 ₁₀₋₄₀
51	C231-AYDR-V237	G240	238-239(VA)	238-238(LR)	V238_A238delnsLR	
52	G240	V247V248P248	241-246(MLLRGA)	241-246(OEIVSS)	M241_A246delnsOEIVSS	
53	V247V248P249	S251	250(O)	250(K)	D250K	88 ₁₀₋₄₀
54	S251	F255	252-254(ALP)	253-254(NSV)	A252_P254delnsNSV	
55	F255	F257Q258	256(N)	256(O)	N256O	
56	F257Q258	Y261	259-260(AA)	259-260(KA)	A259_A260delnsKA	88 ₁₀₋₄₀
57	Y261	L263	262(G)	262(K)	G262K	
58	L263	A268	264-267(SDQL)	264-267(TEEE)	S264_L267delnsTEEE	
59	A268	S272D273M274	269-271(OAI)	269-271(LDV)	Q269_L271delnsLDV	88 ₁₀₋₄₀
60	S272D273M274	P276V277E278	275(Y)	275(F)	Y275F	
61	P276V277E278	L281	279-280(NM)	279-280(PK)	V279_M280delnsPK	
62	L281	-	282(K)	282-305 (QSSRAFTNSKK SVTLRKKTKSKRS)	K282delnsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS	88 ₁₀₋₄₀

Fig. 31B

Ejemplo de ingeniería de bloques de construcción: variantes DNasa1L3 (D1L3) humana con bloques de construcción de DNasa1 (D1) humana

# BC	N-ANCLA D1L3: AA CONSERVADA EN D1	C-ANCLA D1L3: AA CONSERVADA EN D1	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1L3: VARIABLE AA EN D1L3	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1 VARIABLE AA EN D1	MUTACIONES DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES D1L3	CLUSTER BC
0	N/A	N/A	1-20 (MSRELAPLLLLLSHSALA)	1-22 (MRGMKLL GALLAALLOGAVS)	M1_A20096tmsrgmklllgallala ALLOGAVS	88%
1	Peptide serial	F26/N27	21-25 (MRICS)	23-27 (LKIAA)	M21_S25delmslkiaa	
2	F26/N27	F31/G32	26-30 (VRS)	30-32 (QIT)	V26_S30delmsiot	88-14
3	F33/G34	K35	33-34 (ES)	35-36 (ET)	E33_S34delmsiet	
4	F36	L46	36-38 (QAKV)	38-42 (LSSAL)	L38_A42delmslssal	88%
5	V46	R51	47-50 (KVIK)	49-52 (QILS)	K47_K50delmsqils	
6	R51	D53	52 (C)	54 (Y)	C52Y	88-17
7	D53	E59	54-58 (ILVM)	56-60 (IALVQ)	I54_M58delmsialvq	
8	E59	D62	60-61 (IK)	62-63 (VR)	I60_K61delmsvr	
9	D62	L71	63-70 (SNRRICPI)	65-72 (SHLTAVGK)	S63_I70delmsshltavgk	88-18
10	L71	L75/N76	72-74 (MEK)	74-76 (LDN)	M72_K74delmsldn	
11	L75/N76	Y85	77-84 (RNSRRGIT)	79-84 (QDAPDT)	R77_T84delmsqdapdt	88-11
12	Y85	Y87	85 (N)	86 (H)	N86H	
13	Y87	S90	88-89 (VI)	88-89 (VV)	V88_I89delmsvv	88-12-14
14	S90	L93/G94/R95	91-92 (SR)	91-92 (EP)	S91_R92delmssep	
15	L93/G94/R95	Y96/K99/E100	96-97 (NT)	96-97 (NS)	N96_I97delmsns	
16	Y96/K99/E100	Y102	101 (Q)	101 (R)	Q101R	
17	Y102	F104	103 (A)	103 (L)	A103L	88-15-16
18	F104	Y106	105 (L)	105 (V)	L105V	
19	Y106	V111/S112	107-110 (REKL)	107-110 (RPDQ)	K107_L110delmsrpdq	
20	Y111/S112	Y117	113-116 (NKR S)	113-116 (AVDS)	V113_S116delmsavds	88-16-22
21	Y117	Y119	118 (H)	118 (Y)	H118Y	
22	Y119	Q121	120 (H)	120 (D)	H120D	
23	Q121	D126	123-127 (VQSPSSA)	123-126 (QSPSSA)	V123_A126delmsqspss	88-19
24	D126	R130	128 (Y)	128 (I)	I128Y	
25	F136	R136/S137/P138	131 (S)	132 (N)	S132N	
26	R132/E133/P134	V137	135-136 (FV)	136-137 (AI)	I36F_136Vdelmsai	88-20
27	V137	F139	139 (W)	139 (R)	W139R	
28	F139	T144	140-143 (QSPH)	141-144 (FSRE)	Q140_H143delmsfsrf	
29	T144	F149	145-148 (AVKD)	146-149 (EVRE)	A145_D148delmsavkd	
30	F149	H51	150 (V)	151 (A)	V150A	
31	H51	P153/L154/H155	152 (I)	153 (V)	I152A	88-21-24
32	P153/L154/H155	P157	156-157 (IT)	157-158 (AA)	T156_I157delmsaa	
33	P157	V162	159-161 (ETS)	160-162 (GDA)	E159_S161delmsgda	
34	V162	E164/H165/D166	163 (K)	164 (A)	K163A	

FIG.31B (CONTINUADA)

# BC	N-ANCLA D1L3: AA CONSERVADA EN DI	C-ANCLA D1L3: AA CONSERVADA EN DI	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1L3: VARIABLE AA EN DI L3	BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN D1: VARIABLE AA EN DI	MUTACIONES DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES D1L3	CLUSTER BC
35	E163/165/166	L163	167 (E)	168 (A)	E167A	BB ₃₅₋₃₇
36	L168	V171/V172	169-170 (VE)	170-171 (YO)	V169 E170delinsYD	
37	V171/V172	D174/V175	173 (I)	174 (Q)	Y173L	
38	G174/V175	W179	176-178 (HRR)	177-179 (QEK)	K176_R179delinsQEK	BB ₃₈₋₄₀
39	W178	E182	180-181 (KA)	181-182 (GL)	K180_A181delinsGL	
40	E182	M187-GDFNAGCCSY-V197	183-186 (NFF)	184-187 (DVMC)	N183_F186delinsDVML	
41	M187-GDFNAGCCSY-V197	W202	198-201 (PKKA)	199-202 (RPSQ)	198P_201delinsRPSQ	
42	W202	I305/R206/L207	203-204 (KN)	204-205 (SS)	K203_N204delinsSS	
43	I305/R206/L207	T209	208 (R)	209 (W)	R208W	
44	T209	P211	210 (D)	211 (S)	D210S	BB ₄₄₋₄₆
45	P211	F213	212 (R)	213 (T)	R212T	
46	F213	W215/L216/R217	214 (V)	215 (Q)	V214Q	
47	W215/L216/R217	D219	218 (G)	219 (P)	G218P	BB ₄₇₋₄₉
48	D219	D222/T223/T224	220-221 (OE)	221-222 (SA)	Q220 E221delinsSA	
49	O222/T223/T224	Y229	225-226 (NKS)	226-228 (AIP)	V225_S228delinsAIP	
50	Y229	C231-AYDR/V237	230 (N)	230 (H)	N230H	BB ₅₀₋₅₂
51	C231-AYDR/V237	G240	238-239 (LR)	238-239 (VA)	L238 R239delinsVA	
52	G240	V247/V248/P249	241-246 (GEVSS)	241-246 (MLRGA)	Q241_S246delinsMLRGA	
53	V247/V248/P249	S251	250 (K)	250 (D)	K250D	BB ₅₃₋₅₅
54	S251	F255	252-254 (NSV)	253-254 (ALP)	N252_V254delinsALP	
55	F255	F257/Q258	256 (D)	256 (N)	D256N	
56	F257/Q258	Y261	259-260 (KA)	259-260 (JAA)	K259_A260delinsJAA	BB ₅₆₋₅₈
57	Y261	L263	263 (K)	262 (G)	K262G	
58	L263	A268	264-267 (TEEE)	264-267 (SDOL)	T264_E267delinsSDOL	
59	A268	S272/O273/H274	269-271 (LDV)	269-271 (OAI)	L268_V271delinsOAI	
60	S272/O273/H274	E276 E277/S278	279-281 (LH)	279-281 (LH)	E276 E277/S278	
61	E276 E277/S278	L283	282-283 (LH)	282-283 (LH)	L282 L283	
62	L283		284-285 (LH)	284-285 (LH)		
63			286-287 (LH)	286-287 (LH)		
64			288-289 (LH)	288-289 (LH)		
65			290-291 (LH)	290-291 (LH)		
66			292-293 (LH)	292-293 (LH)		
67			294-295 (LH)	294-295 (LH)		
68			296-297 (LH)	296-297 (LH)		
69			298-299 (LH)	298-299 (LH)		
70			300-301 (LH)	300-301 (LH)		
71			302-303 (LH)	302-303 (LH)		
72			304-305 (LH)	304-305 (LH)		
73			306-307 (LH)	306-307 (LH)		
74			308-309 (LH)	308-309 (LH)		
75			310-311 (LH)	310-311 (LH)		
76			312-313 (LH)	312-313 (LH)		
77			314-315 (LH)	314-315 (LH)		
78			316-317 (LH)	316-317 (LH)		
79			318-319 (LH)	318-319 (LH)		
80			320-321 (LH)	320-321 (LH)		
81			322-323 (LH)	322-323 (LH)		
82			324-325 (LH)	324-325 (LH)		
83			326-327 (LH)	326-327 (LH)		
84			328-329 (LH)	328-329 (LH)		
85			330-331 (LH)	330-331 (LH)		
86			332-333 (LH)	332-333 (LH)		
87			334-335 (LH)	334-335 (LH)		
88			336-337 (LH)	336-337 (LH)		
89			338-339 (LH)	338-339 (LH)		
90			340-341 (LH)	340-341 (LH)		
91			342-343 (LH)	342-343 (LH)		
92			344-345 (LH)	344-345 (LH)		
93			346-347 (LH)	346-347 (LH)		
94			348-349 (LH)	348-349 (LH)		
95			350-351 (LH)	350-351 (LH)		
96			352-353 (LH)	352-353 (LH)		
97			354-355 (LH)	354-355 (LH)		
98			356-357 (LH)	356-357 (LH)		
99			358-359 (LH)	358-359 (LH)		
100			360-361 (LH)	360-361 (LH)		

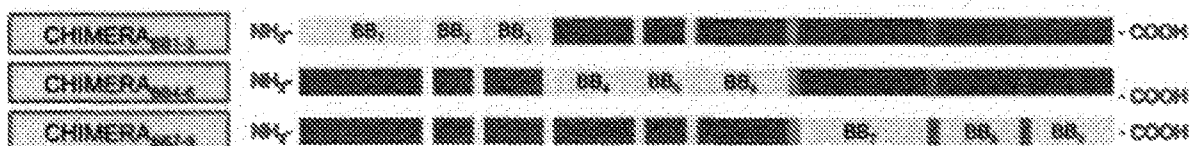
FIG. 22

INGENIERÍA DE CLÚSTER DE BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN

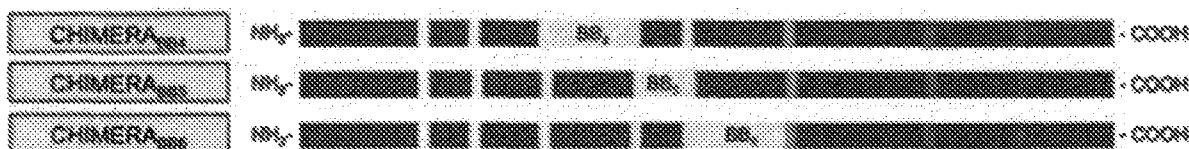
I. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS HOMÓLOGAS



II. TRANSFERENCIA DE CLÚSTERES DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN



III. TRANSFERENCIA DE BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN INDIVIDUALES (OPCIONAL)



IV. TRANSFERENCIA DE RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS INDIVIDUALES (OPCIONAL)

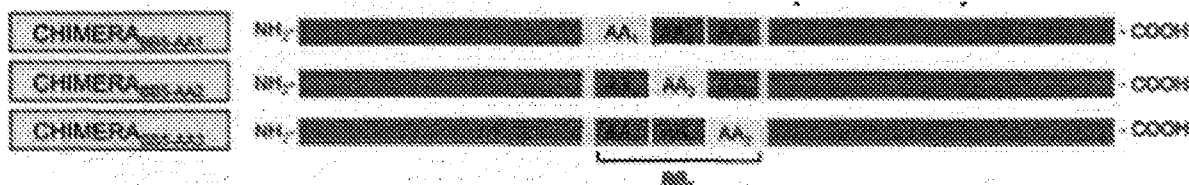


FIG. 33

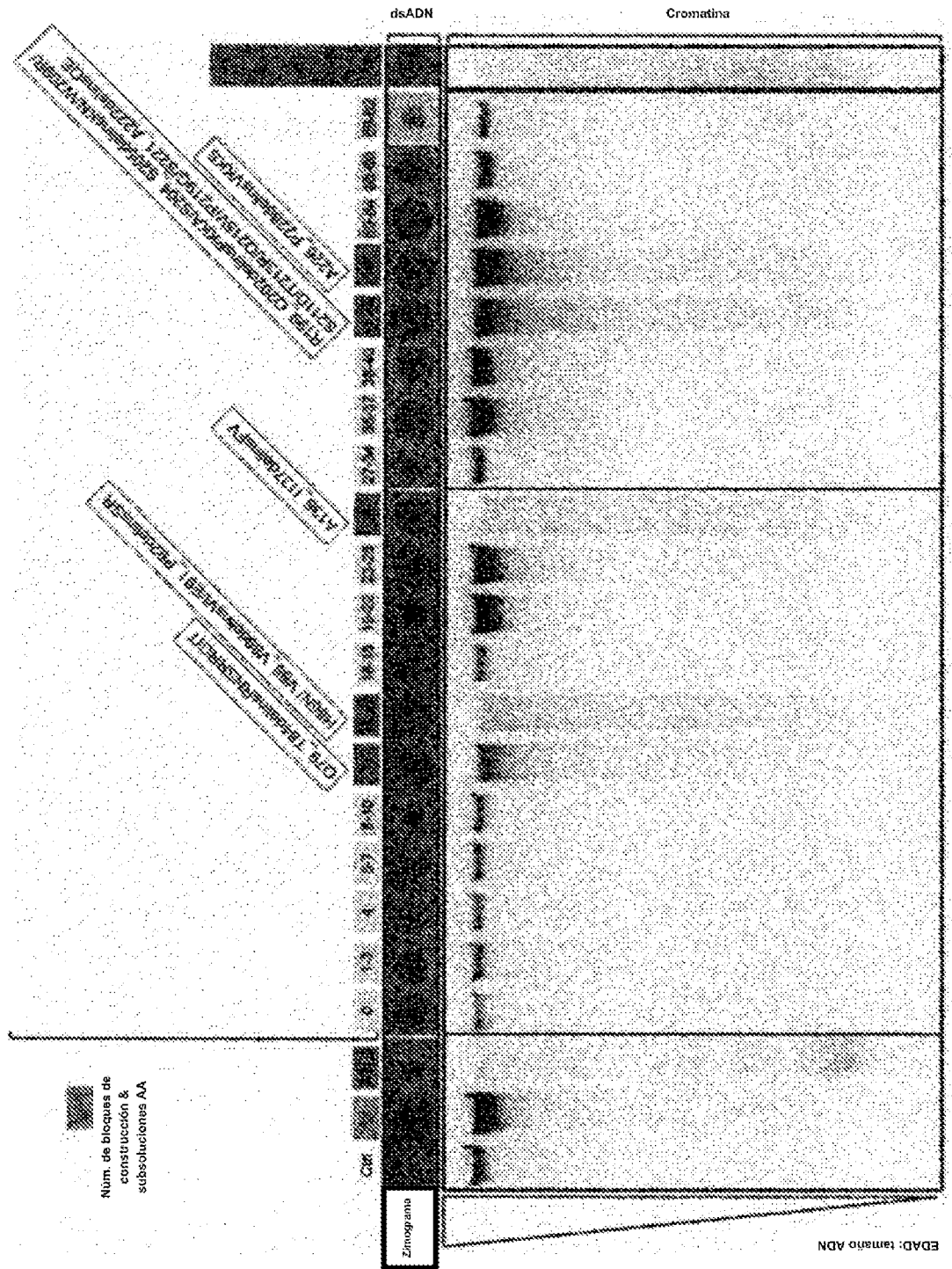


Fig. 34A

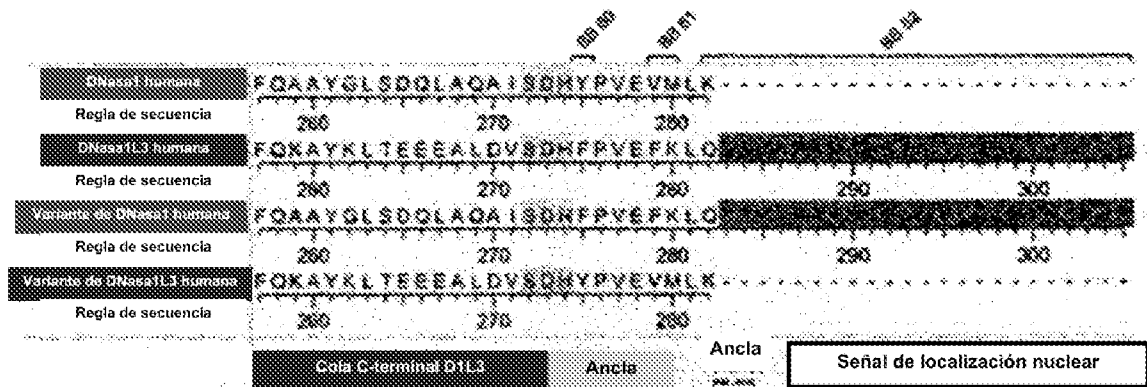


Fig. 34B

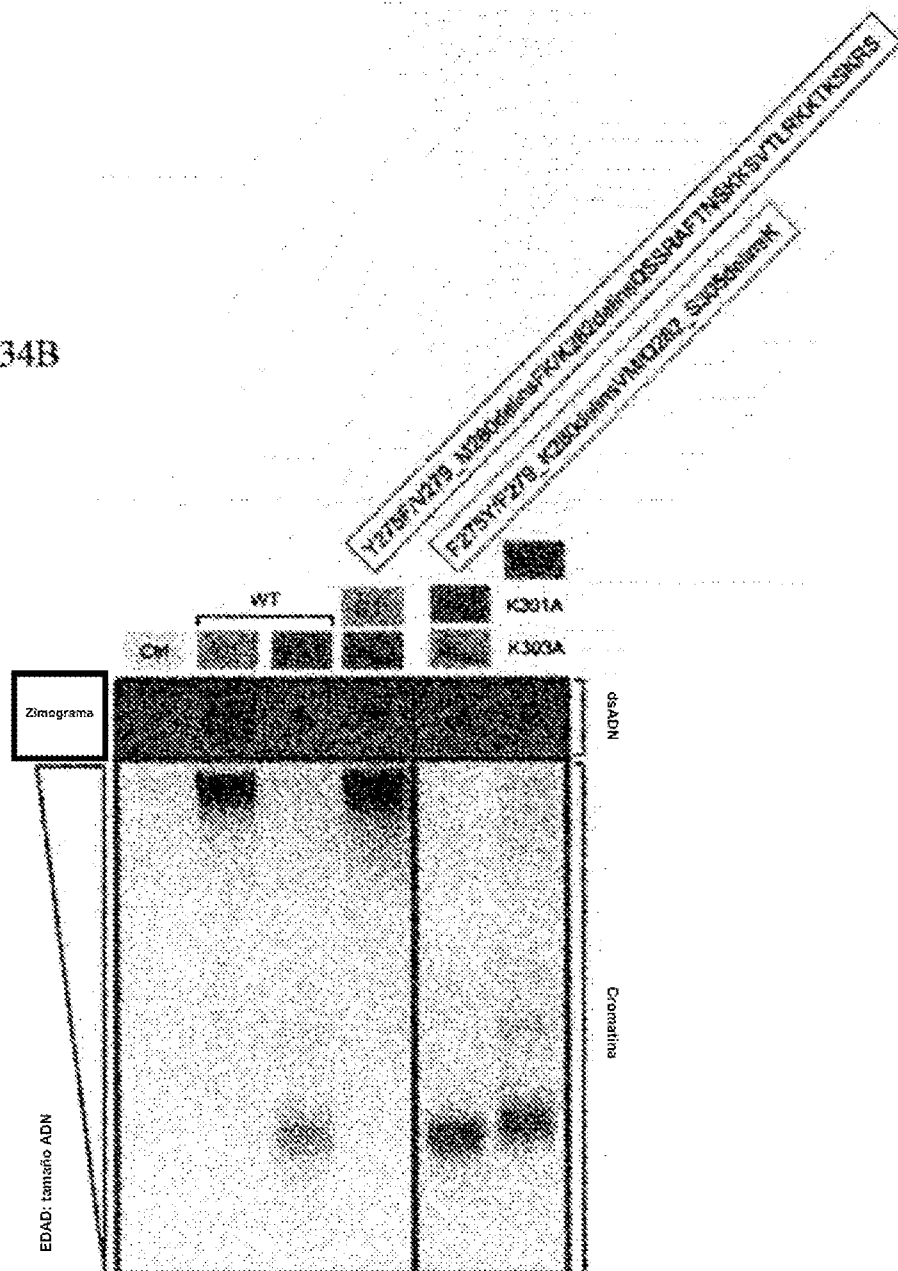


Fig. 35A

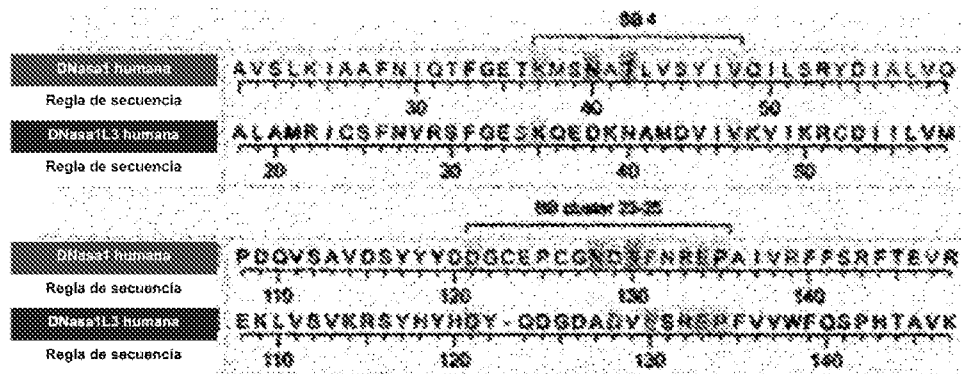


Fig. 35B

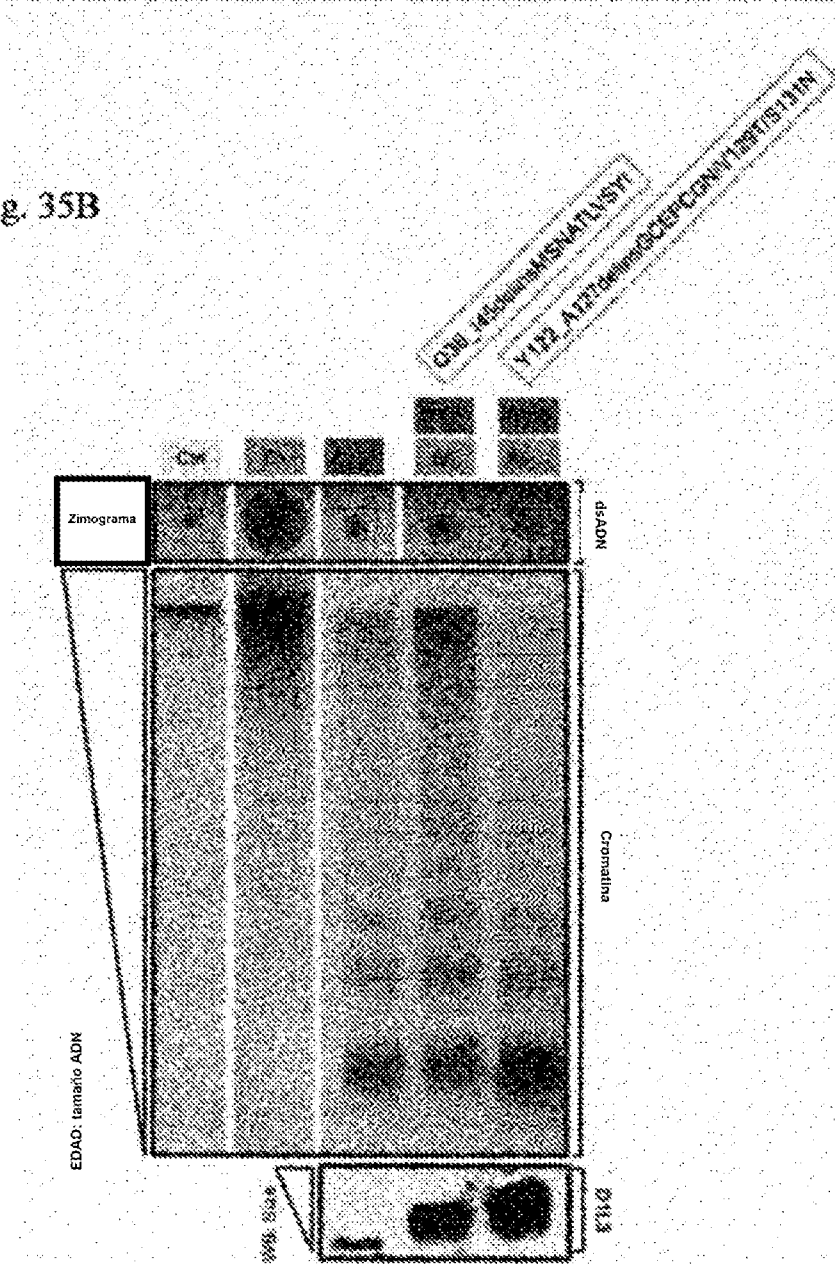


Fig. 36A

Cuádrulo TEN en cámara cardíaca

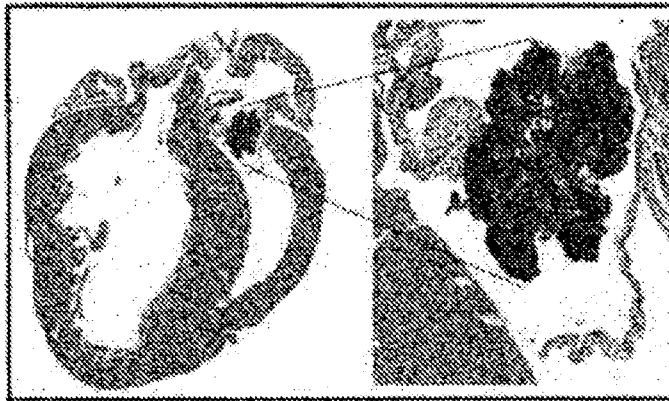


Fig. 36B

Muerte por medio de TEN

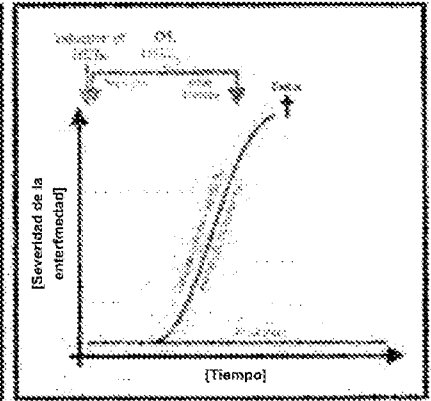


Fig. 36C Diseño experimental: terapia aguda anti-TEN

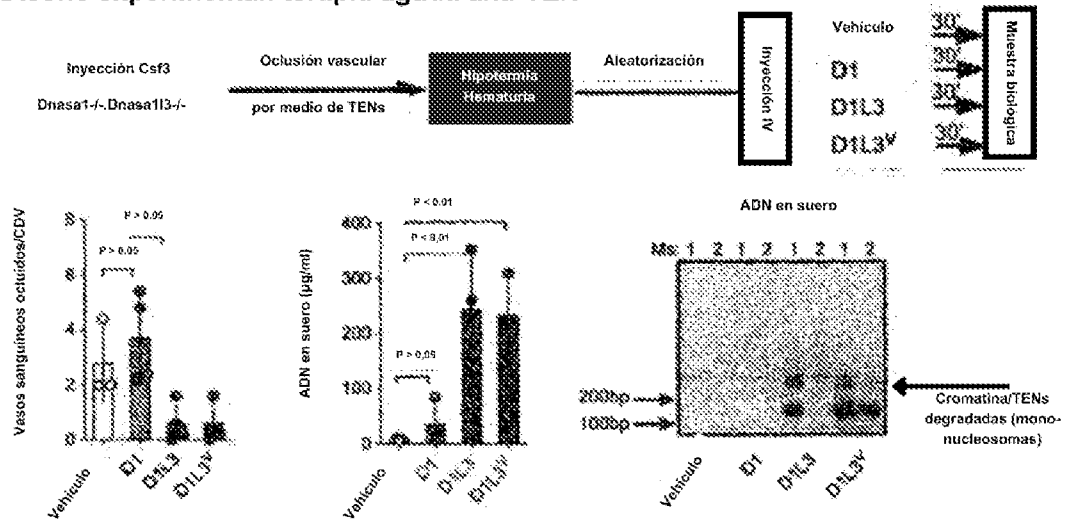


Fig. 36D

Fig. 36E

Fig. 36F

Fig. 37A Diseño experimental: terapia PARA lesión por isquemia-reperfusión



Fig. 37B

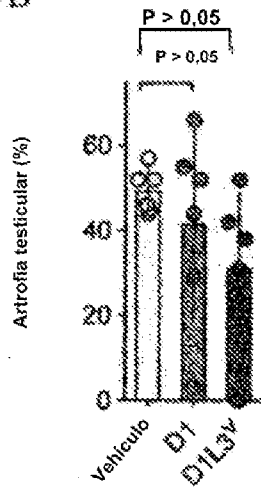
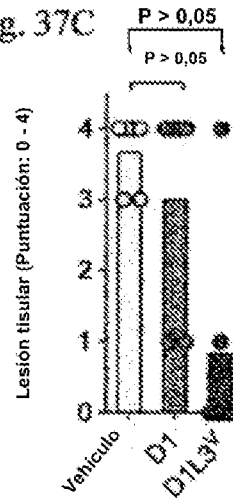


Fig. 37C



Puntuación de lesión tisular:

- (0) > 95% saludable
- (1) > 75% saludable
- (2) > 50% saludable
- (3) > 25% saludable
- (4) < 25% saludable

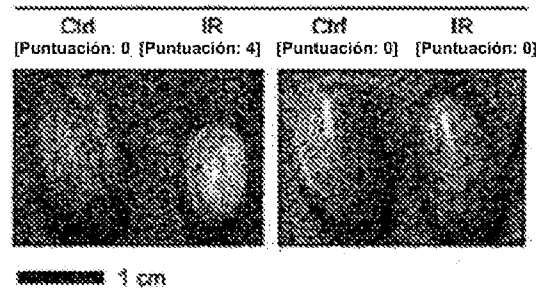


Fig. 38A

Células de ovario de hámster chino
(OHC)

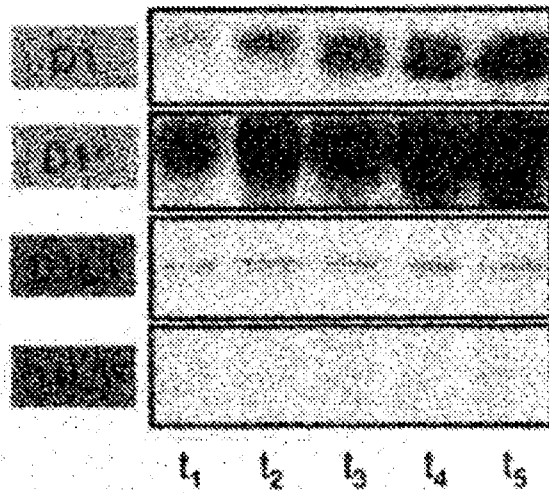


Fig. 38B

Pichia pastoris

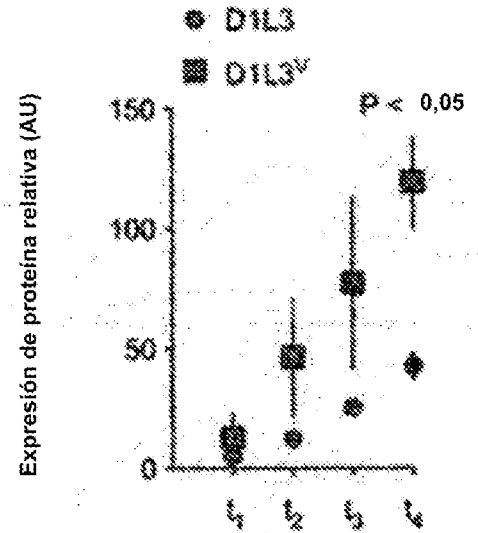
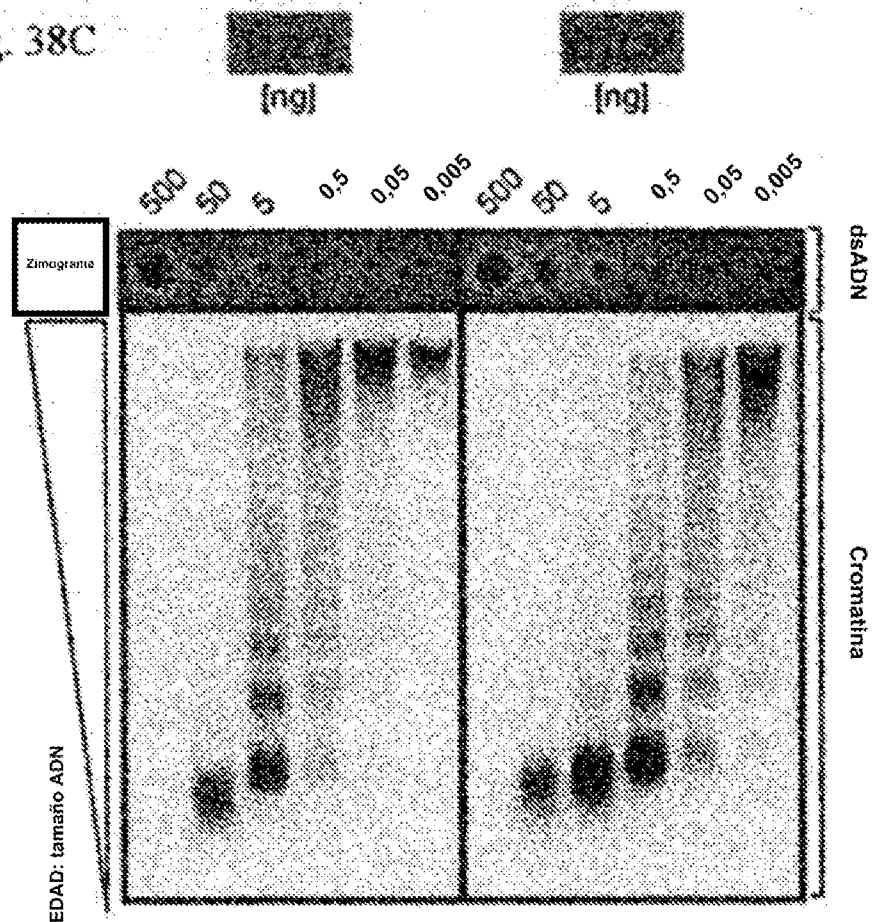


Fig. 38C



100-333933

SEQ ID NO	Descripción	Mutación (Proteína madura sin péptido señal)	Ingeniería de bloques de construcción	Parental SEQ ID NO
5	Variante de DNasa1	Q31RQ40A/Q37K/W290K (Q3RQ27K/Q37K/W187K)	-	1
6	Variante de DNasa1	Q31RQ40A/Q37K/Q377K/W290K/Q328R (Q3RQ37K/Q37K/Q3156K/W187K/Q3240K)	-	1
7	Variante de DNasa1	Q31RQ4136F/T227K (Q3R/A114F/T205K)	-	1
9	Variante de DNasa1	A138F/A194K (A114F/A142K)	-	1
10	Variante de DNasa1	Q79_T84delinsRN5RRGCT (C57_T62delinsRN5RRGCT)	+ (88 ₁)	1
11	Variante de DNasa1	K66N/V88_V89delinsVVE91_P92delinsR (R64N/V88_V87delinsVVE90_P70delinsR)	+ (88 ₁₋₁₈)	1
12	Variante de DNasa1	A136_J137delinsFV (A114_J115delinsFV)	+ (88 ₁₈)	1
13	Variante de DNasa1	R188_Q202delinsPKA/S204_S205delinsKNW208R/S211D/T213R/Q215W P219G/S221_A222delinsQE (R177_Q180delinsPKA/S182_S183delinsKNW187R/S189D/T181R/Q193V/ P187G/S198_A200delinsQE)	+ (88 ₁₋₁₀₀)	1
14	Variante de DNasa1	A228_P228delinsVKN3 (A204_P206delinsVKN3) Q79_T84delinsRN5RRGCT/R88N/V88_V89delinsVVE91_P92delinsR/A138_J137delinsFV/ R188_Q202delinsPKA/S204_S205delinsKNW208R/S211D/ T213R/Q215W/P219G/S221_A222delinsQE/A278_P228delinsVKN3 (C57_T82delinsRN5RRGCT/R64N/V88_V87delinsVVE90_P70delinsR/ A114_J115delinsFV/R177_Q180delinsPKA/S182_S183delinsKNW187R/S189D/ T181R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE/A204_P206delinsVKN3) P271Y/F278_K280delinsVM/Q282_S303delinsK (F253Y/F259_K260delinsV/M/Q282_S285delinsK)	+ (88 ₁₋₁₀₀) 88 ₁₋₁₀₀ 88 ₁₀₀₋₁₀₀ 88 ₁₀₀	1
15	Variante de DNasa1			1
17	Variante de DNasa1L3		+ (88 ₁₀₀₋₁₀₀)	2
18	Variante de DNasa1L3		+ (88 ₁)	2
20	Variante de DNasa1L3		+ (88 ₁₋₁₀₀)	2