



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020003403-7 A2



(22) Data do Depósito: 20/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2020

(54) Título: ENZIMAS DE DNASE ENGENHEIRADAS E USO NA TERAPIA

(51) Int. Cl.: C12N 9/22; C12N 9/18; C12N 9/00.

(30) Prioridade Unionista: 18/08/2017 US 62/547,220; 28/12/2017 US 62/611,166.

(71) Depositante(es): NEUTROLIS INC..

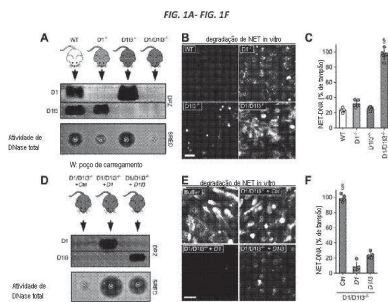
(72) Inventor(es): TOBIAS A. FUCHS; MIGUEL JIMÉNEZ-ALCÁZAR; JOSEPHINE GÖBEL; HANNA ENGLERT.

(86) Pedido PCT: PCT US2018047084 de 20/08/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/036719 de 21/02/2019

(85) Data da Fase Nacional: 18/02/2020

(57) Resumo: A presente invenção fornece proteínas DNase engenheiradas (incluindo DNase1 tipo 3 e DNase1) que são úteis no tratamento de condições caracterizadas por acumulação e / ou liberação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Em alguns aspectos, a invenção fornece composições e métodos para prevenir ou tratar a oclusão vascular envolvendo NETs. Conforme demonstrado neste documento, as NETs participam de um mecanismo não canônico de oclusão vascular, que não depende de fibrina ou plaquetas.



## **ENZIMAS DE DNASE PROJETADAS E USO NA TERAPIA**

### **PRIORIDADE**

[001] Este Pedido reivindica o benefício e a prioridade dos Pedidos N°s 62/611.166 depositado em 28 de dezembro de 2017 e 62/547.220 depositado em 18 de agosto de 2017, cada um dos quais é incorporado por referência em sua totalidade.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[002] A inflamação é uma resposta essencial do hospedeiro para controlar micróbios invasores e curar tecidos danificados. A inflamação descontrolada e persistente causa lesão tecidual em uma infinidade de distúrbios inflamatórios. Os neutrófilos são os leucócitos predominantes na inflamação aguda. Durante as infecções, os neutrófilos geram armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), treliças de filamentos de DNA decoradas com histonas e enzimas tóxicas que imobilizam e neutralizam bactérias. A relevância das NETs na defesa do hospedeiro é ilustrada pelo fato de que as DNases extracelulares servem como fatores de virulência em várias bactérias patogênicas. No entanto, as NETs liberadas de maneira inadequada podem prejudicar as células hospedeiras devido à sua atividade citotóxica, pró-inflamatória e protrombótica. De fato, as NETs são frequentemente associadas a danos inflamatórios ou isquêmicos nos órgãos e a infusão terapêutica de DNases limita a lesão do hospedeiro em vários modelos animais.

[003] A formação da armadilha extracelular (ET) não se limita aos neutrófilos, como outros leucócitos, como monócitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, e mastócitos também liberam ETs. Além disso, células cancerígenas, incluindo células de leucemia promielocítica aguda (APL) e células endoteliais lesionadas, podem expor filamentos de DNA, que possuem características semelhantes a ET.

[004] Como o hospedeiro degrada as NETs in vivo para limitar os danos nos tecidos durante os episódios de inflamação é pouco conhecido. Foi demonstrado que a DNase1 (D1) no soro digere a espinha dorsal do DNA das NETs in vitro. Outras DNases extracelulares foram identificadas, incluindo DNase1 tipo 3 (D1L3) em circulação, que pode digerir cromatina extracelular associada a micropartículas.

[005] D1 e D1L3 formam junto com a DNase1-tipo 1 (D1L1) e DNase1-tipo 2 (D1L2) a família de proteínas DNase1, um grupo de enzimas homólogas secretadas pela DNase que são expressas em humanos e fornecem medicamentos candidatos a doenças associadas à

NET. No entanto, as propriedades físicas, enzimáticas e farmacocinéticas dessas enzimas não são ideais para terapia.

[006] A presente invenção fornece DNases projetadas, incluindo DNase1 semelhante a 3 e DNase1, para terapia, inclusive para prevenir ou tratar oclusões vasculares que podem resultar da liberação de NETs durante episódios inflamatórios agudos.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[007] A presente invenção fornece proteínas DNase projetadas (incluindo DNase1 tipo 3 e DNase1) que são úteis no tratamento de condições caracterizadas por acúmulo e/ou liberação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Em alguns aspectos, a invenção fornece composições e métodos para prevenir ou tratar a oclusão vascular envolvendo NETs. Conforme demonstrado neste documento, as NETs participam de um mecanismo não canônico de oclusão vascular, que não depende de fibrina ou plaquetas.

[008] Em alguns aspectos, a invenção fornece variantes do DNase1 tipo 3 (D1L3) projetadas para ter propriedades físicas, farmacodinâmicas e/ou enzimáticas mais adequadas para a terapia, por exemplo, para reduzir ou impedir o acúmulo de NET em um indivíduo. Em algumas modalidades, a enzima D1L3 tem vantagens na fabricação, proporcionando a produção da enzima recombinante adequada para uso em terapia. Em várias modalidades, a invenção fornece uma variante D1L3 recombinante compreendendo uma ou mais alterações de aminoácidos resultando em uma ou mais glicosilações, inativação de um sinal de localização nuclear e/ou exclusão de toda ou parte de uma cauda C-terminal.

[009] Em várias modalidades, a variante de proteína D1L3 aumentou a estabilidade da proteína, maior resistência à inibição por proteases, maior biodisponibilidade e substancialmente a mesma ou melhor atividade de degradação de DNA e/ou cromatina e/ou NET (in vitro ou in vivo) em comparação à proteína D1L3 do tipo selvagem. Em várias modalidades, a variante D1L3 compreende uma ou mais das seguintes propriedades em relação ao D1L3 tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO: 2): a mesma ou substancialmente a mesma (ou superior) atividade de degradação de DNA livre de proteína (DNA nu), a mesma ou substancialmente a mesma (ou maior) atividade de degradação do DNA cromossômico (cromatina), resistência à protease, meia-vida circulatória aumentada e níveis mais altos de produção com sistemas de expressão in vitro (por exemplo, células de ovário de hamster chinês e/ou *Pichia pastoris*).

[010] Em algumas modalidades, a variante D1L3 inclui uma ou uma pluralidade de substituições de bloco da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1), aqui descrita como substituições de bloco de construção.

[011] Em alguns aspectos, a invenção fornece variantes do DNase1 (D1) projetadas para ter propriedades físicas, farmacodinâmicas e/ou enzimáticas mais adequadas para a terapia, por exemplo, para reduzir ou impedir o acúmulo de NET em um indivíduo. Em algumas modalidades, a enzima D1 tem vantagens na fabricação, proporcionando a produção da enzima recombinante adequada para uso em terapia. Em várias modalidades, a variante D1 projetada compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima madura da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, com uma ou mais substituições de aminoácidos, adições (incluindo inserções) ou deleções resultando em um ou mais de um sítio de ligação ao DNA mutado, um sítio de ligação à cromatina mutado, um sítio de ligação à actina mutado, um sítio de glicosilação mutado, adição de um sinal de localização nuclear (por exemplo, tendo semelhança ou identidade com NLS1 ou NLS2 de D1L3) e/ou um domínio C-terminal semelhante ou idêntico à cauda C-terminal de D1L3.

[012] Em várias modalidades, a variante D1 é projetada para compreender uma ou mais das seguintes características em relação à enzima do tipo selvagem: a mesma ou maior atividade de degradação do DNA livre de proteína (DNA nu), maior atividade de degradação do DNA cromossômico (cromatina), semelhante ou resistência melhorada à protease, resistência à actina, penetração semelhante ou melhorada do sangue na urina e/ou bile e níveis mais altos de produção em sistemas de expressão in vitro (por exemplo, células de ovário de hamster chinês e/ou *Pichia pastoris*).

[013] As variantes de D1 aqui descritas podem ter uma combinação de mutações pontuais, incluindo adição de resíduos catiônicos, e/ou podem compreender uma ou mais substituições de blocos de D1L3 (SEQ ID NO: 2). Tais substituições de bloco são descritas aqui e denominadas "substituições de bloco de construção".

[014] Em alguns aspectos, a invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo as variantes D1L3 e/ou D1, ou polinucleotídeos ou vetores que codificam os mesmos, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em várias modalidades, a composição é formulada para administração parenteral ou pulmonar. Em algumas modalidades, a composição é formulada para administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intra-articular, intramuscular, tópica ou subcutânea. Em algumas modalidades, a composição compreende

D1L3 e D1, que são cada uma opcionalmente variantes projetadas descritas aqui. Em algumas modalidades, a composição compreende uma proteína quimérica contendo sequências de blocos tanto de D1 quanto de D1L3. As substituições de bloco exemplares entre D1 e D1L3 são mostradas na FIG 31.

[015] Ainda em outros aspectos, a invenção fornece um processo para projetar enzima DNase, produzindo sequências quiméricas. Por exemplo, nesses aspectos, o método compreende o fornecimento de um alinhamento proteína-proteína das enzimas DNase doadora e receptora; a identificação de sequências variáveis de aminoácidos para transferência ("bloco de construção"). O aminoácido variável ou aminoácidos são ladeados por um ou mais aminoácidos conservados nas enzimas DNase doadora e receptora (a montante e a jusante do bloco de construção). Esses componentes podem ser trocados entre as proteínas receptora e doadora. A enzima quimérica é então produzida de forma recombinante.

[016] Ainda em outros aspectos, a invenção fornece um método para fazer uma composição farmacêutica para reduzir ou prevenir o acúmulo da armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Nestas modalidades, a invenção emprega um camundongo geneticamente modificado deficiente na atividade D1 e D1L3, e expressão heteróloga do polinucleotídeo G-CSF (por exemplo, em células de hepatócitos) ou que induz uma expressão endógena sustentada de G-CSF (por exemplo, via administração repetitiva de compostos microbianos). Este modelo de camundongo acumula NETs e desenvolve rapidamente oclusões vasculares relacionadas a NET. Nestas modalidades, a invenção compreende a administração de um inibidor NET candidato ou enzima DNase candidata (incluindo uma variante D1L3 ou D1 de acordo com esta divulgação) ao camundongo geneticamente modificado e a seleção de um inibidor de NET ou enzima DNase que reduz o acúmulo de NETs. O inibidor ou enzima selecionado é formulado para administração a um paciente humano.

[017] Em alguns aspectos, a invenção fornece um método para o tratamento de um indivíduo em necessidade de degradação da armadilha extracelular de neutrófilos (NET). O método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um D1L3 e/ou D1 e/ou variantes dos mesmos de acordo com esta divulgação. A variante D1L3 ou D1 pode ser administrada como composições farmacêuticas compreendendo a proteína recombinante, ou em algumas modalidades o DNA ou RNA de codificação, ou em algumas modalidades, vetores compreendendo o mesmo.

[018] Em várias modalidades, a presente invenção refere-se ao tratamento de doenças ou condições caracterizadas pela presença ou acúmulo de NETs. Tais doenças ou condições incluem, mas não se limitam a, doenças associadas a neutrofilia crônica (por exemplo, um aumento no número de neutrófilos), agregação e leucostase de neutrófilos, trombose e oclusão vascular (por exemplo, doença das células falciformes), lesão de isquemia-reperusão (por exemplo, vólvulo do intestino médio, torção testicular, reperusão de isquemia e reperusão de órgãos vitais, transplante de órgãos), lesão de tecido cirúrgico e traumático, reação ou doença inflamatória aguda ou crônica, doença autoimune (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), nefrite lúpica, artrite reumatoide, vasculite, esclerose sistêmica), doença cardiovascular (por exemplo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose, tromboembolismo venoso, incluindo terapia trombolítica), doença metabólica (por exemplo, diabetes), inflamação sistêmica (por exemplo, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, choque séptico, coagulação intravascular disseminada (DIC) e microangiopatia trombótica (TMA)), doenças inflamatórias do trato respiratório (por exemplo, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), lesão pulmonar aguda (ALI), lesão pulmonar induzida por fumaça, lesão pulmonar induzida por transfusão (TRALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e asma, atelectasia, bronquite, empiema), doenças inflamatórias renais (doenças renais agudas e crônicas, incluindo lesão renal aguda (AKI) e doença renal crônica (CKD), doenças inflamatórias relacionadas ao tecido transplantado (por exemplo, doença do enxerto contra o hospedeiro) e câncer (por exemplo, leucemia, metástase de tumor e tumores sólidos).

[019] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou está em risco de uma oclusão ductal em um sistema ductal. Exemplos não limitativos de um sistema ductal ou de um órgão ou tecido que contém um sistema ductal incluem duto biliar, duto lacrimal, duto lactífero, duto cístico, duto hepático, duto ejaculatório, duto parótido, duto submandibular, duto sublingual principal, duto de bartolino, cerebral aqueduto, pâncreas, glândula mamária, duto deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado. Como tal, a presente invenção é útil para tratar um indivíduo que tem pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, uma obstrução do canal deferente ou doença renal.

[020] Em outras modalidades, o indivíduo tem ou corre o risco de acumular NETs nas superfícies endoteliais (por exemplo, aderências cirúrgicas), na pele (por exemplo, feridas/cicatrices, úlceras) ou nas articulações sinoviais (por exemplo, gota, artrite). Por

exemplo, as NETs podem contribuir para aderências cirúrgicas, por exemplo, após um procedimento médico invasivo. A presente invenção pode ser administrada durante a cirurgia para prevenir ou inibir a formação de aderências cirúrgicas. Em alguns casos, D1, D1L3 (incluindo variantes dos mesmos), ou a combinação de D1 e D1L3 (ou variantes dos mesmos), conforme descrito aqui, pode ser administrado topicamente à pele para prevenir ou tratar feridas e/ou cicatrizes. Em outros casos, D1, D1L3 ou variantes, ou as combinações dos mesmos, conforme descrito neste documento, podem ser administrados às articulações sinoviais para prevenir ou tratar a gota e a artrite.

[021] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou está em risco de uma oclusão vascular compreendendo NETs.

[022] Em várias modalidades, a presente invenção refere-se ao tratamento de doenças tratáveis com a enzima DNase, incluindo D1 e estreptodornase. Tais doenças ou condições incluem trombose, acidente vascular cerebral, sepse, lesão pulmonar, aterosclerose, infecção viral, doença falciforme, infarto do miocárdio, infecção no ouvido, cicatrização de feridas, lesão hepática, endocardite, infecção hepática, pancreatite, disfunção primária do enxerto, reperfusão de isquemia de membros, lesão renal, coagulação sanguínea, inflamação induzida por alume, lesão hepatorenal, exsudações pleurais, hemotórax, coágulos sanguíneos, anemia pós-pneumática, úlceras, condições otorrinolaringológicas, infecções orais, lesões leves, sinusite, rinoplastias pós-operatórias, infertilidade, cateter da bexiga, limpeza de feridas, teste de reação cutânea, meningite pneumocócica, gota, úlceras de perna, fibrose cística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquite crônica, bronquiectasia, lúpus, discinesia ciliar primária, bronquiolite, empiema, infecções pleurais, câncer, doença dos olhos secos, infecções do trato respiratório inferior, hematomas crônicos, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva.

[023] Ainda em outras modalidades, a invenção fornece um método para a produção recombinante de D1 ou D1L3, ou variantes dos mesmos, utilizando um sistema de expressão não mamífero, como *Pichia pastoris*. Em algumas modalidades, a *Pichia pastoris* codifica a enzima DNase com o peptídeo sinal nativo, permitindo a secreção das células hospedeiras.

[024] Outros objetivos, modalidades e vantagens da presente invenção são evidentes na Descrição Detalhada a seguir.

## **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**[025]** As **FIG. 1A - A FIG. 1F** ilustram que DNase1 e DNase113 na circulação degradam NETs in vitro e caracterizam a atividade degradante de DNA do soro de WT, camundongos DNase1  $-/-$  (D1  $-/-$ ), DNase113  $-/-$  (D1L3  $-/-$ ), DNase1/DNase113  $-/-$  (D1/D1L3  $-/-$ ). A **FIG. 1A** fornece detecção de DNase1 (D1), DNase113 (D1L3) e atividade total da DNase pelos ensaios zimográficos DPZ e SRED. A **FIG. 1B** fornece imagens e a **FIG. 1C** fornece a quantificação de colorações de DNA de NETs geradas in vitro após incubação com soros dos genótipos indicados (N = 6). Barra de escala: 50  $\mu$ m. A **FIG. 1C** mostra a análise DPZ e SRED de soros de camundongos D1/D1L3  $-/-$  expressando estavelmente um plasmídeo com DNase1 (D1), DNase113 (D1L3) ou um plasmídeo de controle (Ctrl). A **FIG. 1E** mostra imagens e a **FIG. 1F** mostra a quantificação da coloração de DNA de NETs geradas in vitro após incubação com tampão ou soro de camundongos D1/D1L3  $-/-$  expressando D1, D1L3 ou Ctrl (N = 5). Barra de escala: 50  $\mu$ m. As imagens são representativas de dois ou mais experimentos independentes. Estatísticas: (**FIG. 1C** e **FIG. 1F**) ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni após o teste; § P <0,001 vs. todos os outros grupos.

**[026]** As **FIG. 2A-FIG. 2I** ilustram que a DNase1 ou a DNase113 é necessária para tolerar neutrofilia crônica. A neutrofilia crônica foi induzida por injeção de um plasmídeo de expressão de G-CSF (CSF3). Os controles receberam um plasmídeo vazio (Ctrl). A **FIG. 2A** mostra a contagem de neutrófilos no sangue de camundongos WT e controles após 2 semanas (N = 3-6). A **FIG. 2B** mostra estruturas do tipo NET (seta) em colorações de DNA de esfregaços de sangue de camundongos WT após 1 semana (N = 3). Barra de escala: 20  $\mu$ m. A **FIG. 2C** mostra a sobrevivência de camundongos WT (N = 7), DNase1  $-/-$  (D1  $-/-$ , N = 6), DNase113  $-/-$  (D1L3  $-/-$ , N = 6), DNase1/DNase113  $-/-$  (D1/D1L3  $-/-$ , N = 6) e controles (Ctrl, N = 4). A **FIG. 2D** mostra a sobrevivência de camundongos D1/D1L3  $-/-$  co-expressando CSF3 com DNase1 (CSF3/D1, N = 5), DNase113 (CSF3/D1L3, N = 6) e controles (CSF3/Ctrl, N = 4). As **FIGS. 2E-2I** caracterizam a mortalidade durante neutrofilia crônica (N = 4). A **FIG. 2E** mostra mudança na temperatura corporal periférica. A **FIG. 2F** fornece fotografias de plasma e urina. A **FIG. 2G** fornece a concentração de hemoglobina no sangue. A **FIG. 2H** fornece imagens de esfregaços de sangue. As setas apontam para esquistócitos. Barra de escala: 20  $\mu$ m. A **FIG. 2I** mostra a concentração de LDH no plasma. UT: camundongos não tratados (N = 5-6). As imagens são representativas de três ou mais camundongos. Estatísticas: (**FIGS. 2A, 2H, 2I**) ANOVA unidirecional e (**FIG. 2E**)

bidirecional, seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, (FIG. 2B) teste t de Student (FIGS. 2C, 2D) teste de classificação; #  $P < 0,01$ , §  $P < 0,001$  vs. todos os outros grupos ou linha de base (BL).

[027] **A FIG. 3A-FIG. 3G** ilustra que a DNase1 e a DNase113 impedem a oclusão vascular por coágulos de NET durante a neutrofilia crônica. A análise histológica de camundongos DNase1/DNase113  $-/-$  (D1/D1L3  $-/-$ ) coexpressando CSF3 com DNase1 (CSF3/D1,  $N = 4$ ), DNase113 (CSF3/D1L3,  $N = 4$ ) ou um plasmídeo de controle (CSF3/Ctrl,  $N = 4$ ). A FIG. 3A fornece colorações de hematoxilina e eosina (H&E) dos pulmões. Barras de escala: 500  $\mu\text{m}$  (visão geral), 25  $\mu\text{m}$  (detalhe). A FIG. 3B mostra a quantificação de vasos sanguíneos nos pulmões ocluídos por coágulos positivos para hematoxilina por campo de visão (FOV). Camundongos WT não tratados (UTWT,  $N = 4$ ), camundongos D1/D1L3  $-/-$  não tratados (UT;  $N = 4$ ). A FIG. 3C mostra imunocoloração de vasos sanguíneos ocluídos para a mieloperoxidase marcadora de neutrófilos (MPO) e cromatina. As FIGS. 3D e 3E mostram imunocoloração para fator de von Willebrand (vWF), fibrina e DNA. Foram detectados três tipos de coágulos de NET ( $\alpha$ , vWF +/fibrina-;  $\beta$ , vWF +/fibrina +;  $\gamma$ , vWF-/fibrina-). A FIG. 3F fornece quantificação de vWF e fibrina em coágulos de NET. Dados mostrados como média  $\pm$  SD,  $n = 108$ . A FIG. 3G mostra a sobrevivência de camundongos D1/D1L3  $-/-$  expressando CSF3 tratados com IgG ( $N = 4$ ), IgG anti-plaquetária ( $N = 5$ ) e dabigatrano ( $N = 5$ ). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ . As imagens são representativas de três ou mais camundongos. (FIGS. 3C, 3D, 3E) linha pontilhada indica a parede do vaso. Estatística: (FIG. 3B) ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; §  $P < 0,001$  vs. todos os outros grupos, (FIG. 3G) Teste de log-rank;  $P > 0,05$  IgG anti-plaquetária ou Dabigatran vs. IgG.

[028] **As FIG. 4A-FIG. 4I** ilustram que a DNase1 e a DNase113 protegem contra lesão do hospedeiro na septicemia. Camundongos WT ( $N = 5$ ) e camundongos com uma deficiência combinada em DNase1 e DNase113 (D1/D1L3  $-/-$ ) expressando DNase1 (D1,  $N = 7$ ), DNase113 (D1L3,  $N = 8$ ) ou um plasmídeo de controle (Ctrl,  $N = 11$ ) foram tratados com lipopolissacarídeo e *E. coli* sacrificada pelo calor para induzir septicemia. A FIG. 4A mostra o tempo de sobrevivência de camundongos sépticos. A FIG. 4B mostra a concentração de hemoglobina no sangue. A FIG. 4C mostra fotografias de plasma e urina. A FIG. 4D fornece concentração de LDH no plasma. A FIG. 4E mostra a quantificação de esquistócitos no sangue por campo de visão (FOV). A FIG. 4F mostra a quantificação de

vasos sanguíneos ocluídos nos pulmões por FOV. A FIG. 4G mostra colorações de hematoxilina e eosina (H&E) dos pulmões. As pontas de flecha apontam para vasos sanguíneos ocluídos. Barras de escala: 500  $\mu$ m. As FIGS. 4H e 4I mostram coloração por H&E de vaso sanguíneo parcial e totalmente ocluído. As setas apontam para NETs que cobrem o espaço intercelular. Inserções são visões gerais. Barras de escala: 50  $\mu$ m. Estatística: (FIG. 4A) Teste de log-rank; # P <0,01 vs. todos os outros grupos (FIGS. 4B-4F) ANOVA unidirecional, seguida por pós-testes de comparações múltiplas de Bonferroni; § P <0,001, # P <0,01.

[029] As **FIG. 5A-FIG. 5E** mostram um modelo de murino de neutrofilia crônica. Os camundongos WT com quatro semanas de idade foram injetados com um plasmídeo de expressão em CSF3 (CSF3) ou com um plasmídeo de controle vazio (Ctrl). A FIG. 5A mostra os níveis de G-CSF no plasma (N = 3-6). BL: linha de base, antes da injeção; Ctrl: camundongos que expressam o plasmídeo de controle sem CSF3 por 2 semanas (N = 4-5). A FIG. 5B mostra imunocoloração para elastase de neutrófilos de pulmões, rins e fígado. Barras de escala: 200  $\mu$ m. A FIG. 5C mostra fotografias e pesos dos baços (N = 5-6). Barra de escala: 1 cm. A FIG. 5D mostra o peso corporal dos camundongos nos horários indicados (N = 3-5). A FIG. 5E mostra contagens de neutrófilos no sangue total e níveis plasmáticos de ALT, AST, BUN e creatinina 2 semanas após a injeção. As imagens são representativas de três ou mais camundongos. Estatísticas: (FIGS. 5A, 5C) ANOVA unidirecional e (FIG. 5D) bidirecional, seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni e (FIG. 5E) teste t de Student; # P <0,01, § P <0,001 vs. (FIG. 5A) BL ou (FIG. 5C) UT.

[030] As **FIG. 6A-FIG. 6D** mostram que a DNase1 e a DNase113 impedem a formação de coágulos de NET e lesão de órgãos no fígado e rins durante a neutrofilia crônica. Análise de camundongos DNase1/DNase113 -/- (D1/D1L3 -/-) coexpressando CSF3 um plasmídeo de controle (CSF3/Ctrl, N = 4), com DNase1 (CSF3/D1, N = 4) ou com DNase113 (CSF3/D1L3, N = 4). Os controles incluem WT não tratados (UTWT, N = 4) e camundongos D1/D1L3 -/- não tratados (UT; N = 4). A FIG. 6A mostra os níveis plasmáticos de alanina e aspartato aminotransferases (ALT, AST). A FIG. 6B mostra os níveis plasmáticos de nitrogênio da ureia no sangue (BUN) e creatinina. A FIG. 6C fornece quantificação de coágulos intravasculares ricos em hematoxilina em fígados por seção e em rins por campo de visão (FOV). A FIG. 6D fornece colorações H&E de fígado e rins. Barras de escala: 500  $\mu$ m (visões gerais), 50  $\mu$ m (detalhes). As imagens são representativas de três ou mais

camundongos. Estatística: (FIGS. 6A, 6B, 6C) ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; #  $P < 0,01$ , §  $P < 0,001$  vs. todos os outros grupos.

[031] As **FIG. 7A-FIG. 7C** mostram que coágulos positivos para hematoxilina são compostos de NETs. Análise de pulmões de camundongos DNase1/DNase113 -/- (D1/D1L3 -/-) com neutrofilia crônica (D1/D1L3 -/- + CSF3/Ctrl) mostrada nas FIGS. 3A-3G. A FIG. 7A fornece coloração com hematoxilina e eosina (H&E), para DNA, e para cromatina de seções pulmonares consecutivas. Barras de escala: 200  $\mu\text{m}$ . A FIG. 7B fornece imunocoloração de vaso sanguíneo ocluído para cromatina, CRAMP (peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina) e DNA. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ . A FIG. 7C fornece imunocoloração de vaso sanguíneo ocluído para cromatina, histona citrulinada 3 (citH3) e DNA. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ . As imagens são representativas de três ou mais camundongos.

[032] As **FIG. 8A e FIG. 8B** mostram que NETs humanas formam coágulos in vitro. A FIG. 8A fornece uma fotografia do coágulo NET (seta) gerado por neutrófilos humanos ativados por PMA in vitro. Neutrófilos não tratados (UT) ou neutrófilos ativados na presença de DNase1 humana recombinante (PMA + D1) serviram como controle. Barras de escala: 5 mm. A FIG. 8B fornece colorações de hematoxilina e eosina (H&E) e imunocoloração para cromatina e a mieloperoxidase marcadora de neutrófilos (MPO) de coágulos NET gerados in vitro. Barras de escala: 200  $\mu\text{m}$ . As imagens são representativas de três ou mais experimentos independentes.

[033] As **FIG. 9A e FIG. 9B** mostram que a degradação de NET se correlaciona com a atividade da doença em STEC-HUS. A FIG. 9A mostra imagens e a FIG. 9B mostra a quantificação da coloração de DNA de NETs geradas in vitro após incubação com tampão, plasma de doadores saudáveis normais ( $N = 7$ ) ou plasma coletado no estado de doença aguda (Aguda) e em remissão (Rem.) de 11 pacientes com STEC-HUS. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . Estatísticas: ANOVA unidirecional, seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni após o teste; §  $P < 0,001$  vs. todos os outros grupos.

[034] A **FIG. 10** fornece uma tabela de descrições de tecido humano de vários pacientes examinados, como número de pacientes, causa de morte, conforme indicado no relatório de autópsia (ARDS, síndrome do desconforto respiratório agudo). Sexo e idade do paciente. Tipo de tecido analisado. Os tecidos foram analisados em um procedimento de três etapas: primeiro, identificação de coágulos/agregados ricos em hematoxilina nas colorações de

hematoxilina e eosina; segundo, identificação de NETs em coágulos ricos em hematoxilina por imunocoloração para cromatina e mieloperoxidase (MPO); terceiro, identificação da localização dos coágulos NET na arquitetura pulmonar.

[035] As **FIG. 11A-FIG. 11D** mostram que NETs humanas formam coágulos in situ. Tecido pulmonar coletado na autópsia de dois pacientes com sepse (Paciente nº 6 e nº 7 na FIG. 10). A FIG. 11A mostra a coloração por H&E de dois coágulos intravasculares ricos em hematoxilina no tecido pulmonar do paciente nº 6. A FIG. 11B mostra a imunocoloração da seção consecutiva para cromatina e mieloperoxidase (MPO) do vaso sanguíneo esquerdo mostrado no painel A. A FIG. 11C mostra o vaso sanguíneo de coloração de H&E no tecido pulmonar do paciente nº 7 mostra coágulos intravasculares ricos em hematoxilina. A FIG. 11D mostra imunocoloração de seção consecutiva para cromatina e MPO. As setas apontam para coágulos de NETs. Barra de escala: 50 µm.

[036] A **FIG. 12** mostra que os coágulos NET ocluem vasos sanguíneos em camundongos sépticos. Imunocoloração de vaso sanguíneo completamente ocluído em camundongos sépticos DNase1/DNase113 -/- para DNA, cromatina e mieloperoxidase (MPO). As colorações de DNA e cromatina das NETs (setas) parecem mais escuras do que as nucleares (asteriscos) e cobrem o espaço intercelular. Barras de escala: 10 µm.

[037] A **FIG. 13A-FIG. 13F** mostra que DNase1 e DNase113 degradam NETs por mecanismos distintos. A FIG. 13A fornece colorações de DNA de NETs fixadas por PFA geradas in vitro após incubação com soros de camundongos WT, DNase1 -/- (D1 -/-), DNase113 -/- (D1L3 -/-), DNase1/DNase113 -/- (D1/D1L3 -/-). Os dados são representativos de  $\geq 3$  experimentos independentes. Barra de escala: 50 µm. A FIG. 13B mostra a concentração de fragmentos de DNA sem células liberados de NETs fixados por PFA após incubação com soros de camundongos WT, D1-/-, D1L3-/- e D1/D1L3-/- A FIG. 13C mostra colorações de DNA de NETs não fixas geradas in vitro após incubação com veículo, DNase1 de murino recombinante (rmD1) ou DNase113 de murino recombinante (rmD1L3). A FIG. 13D mostra a concentração de fragmentos de DNA sem células liberados de NETs não fixadas geradas in vitro após incubação com veículo, rmD1 ou rmD1L3. A FIG. 13E mostra colorações de DNA de NETs fixadas em PFA geradas in vitro após incubação com veículo, rmD1 ou rmD1L3. A FIG. 13F mostra a concentração de fragmentos de DNA sem células liberados de NETs não fixadas por PFA geradas in vitro após incubação com veículo, rmD1

ou rmD1L3. Estatísticas por ANOVA unidirecional, seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; §  $P < 0,0001$ .

[038] **A FIG. 14A-FIG. 14G** fornecem atividade DNase1 e DNase113 na circulação de humanos e camundongos. As FIG. 14A-FIG. 14E mostram a atividade da DNase no plasma humano e murino quantificado por SRED. A FIG. 14A ilustra a suplementação de plasma de doadores saudáveis normais (NHD) com anticorpos policlonais contra a DNase1 humana ( $\alpha$ -hDNase1), mas não com IgG, bloqueia a atividade de degradação do DNA de maneira dependente da concentração (\*:  $p < 0,05$  vs. IgG). A FIG. 14B mostra plasma suplementado com 200  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -hDNase1 e heparina, um inibidor da DNase113, bloqueia a atividade residual da DNase no plasma suplementado com 200  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -hDNase1 (\*:  $p < 0,05$  vs. NHD). As FIG. 14C-FIG. 14E fornecem uma comparação da atividade da DNase em diluições em série de plasma de camundongos e NHD. A FIG. 14C ilustra que a atividade total da DNase de camundongos WT é aproximadamente 10 vezes maior que na NHD. A FIG. 14D mostra que a atividade da DNase1 no plasma de camundongos DNase113  $-/-$  é aproximadamente 10 vezes maior que o plasma humano suplementado com 500  $\mu\text{g/ml}$  de heparina. (E atividade da DNase113 no plasma de camundongos DNase1  $-/-$  é aproximadamente 10 vezes maior que o plasma humano suplementado com 200  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -hDNase1. (F, G) A degradação de NET in vitro é ilustrada na FIG. 14F e FIG. 14G. A FIG. 14F mostra neutrófilos ativados incubados com plasma apenas de NHD ou suplementados com 200  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -hDNase1, plasma de pacientes com TMA e plasma de camundongos WT, DNase1  $-/-$  e DKO (barras de escala: 200  $\mu\text{m}$ ). A FIG. 14G mostra DNA sem células em sobrenadantes de neutrófilos ativados incubados com plasma de fontes indicadas (§:  $p < 0,001$  vs. NHD). A degradação de NET in vitro pelo plasma humano depende da DNase1, pois a DNase113 no plasma humano não é suficiente para degradar as NETs.

[039] **A FIG. 15A-FIG. 15C** mostram um curso letal de neutrofilia crônica em uma cepa alternativa de camundongos DNase1/DNase13  $-/-$ . Uma cepa alternativa de camundongos DNase1  $-/-$  (ver Métodos do Exemplo 1) foi cruzada com camundongos DNase113  $-/-$  para gerar camundongos com uma deficiência combinada. A FIG. 15A fornece curvas de sobrevivência de neutrofilia em camundongos WT ( $N = 9$ ), DNase1  $-/-$  (D1  $-/-$ ,  $N = 5$ ) e DNase1/DNase113  $-/-$  (D1/D1L3  $-/-$ ,  $N = 5$ ). A neutrofilia crônica foi induzida por injeção de um plasmídeo de expressão de CSF3 (CSF3). A FIG. 15B fornece colorações de hematoxilina e eosina (H&E) das seções pulmonares. A seta aponta para coágulos positivos

para hematoxilina em camundongos D1/D1L3  $-/-$ . Barra de escala: 500  $\mu$ m. A FIG. 15C fornece sobrevivência de camundongos D1/D1L3  $-/-$  coexpressando CSF3 com um plasmídeo de controle (CSF3/Ctrl, N = 6), com DNase1 (CSF3/D1, N = 5) ou com DNase1L3 (CSF3/D1L3, N = 6) Estatística: Teste de log-rank; § P <0,001.

[040] **A FIG. 16A-FIG. 16B** mostram a abordagem de triagem para identificar variantes hiperativas da DNase1 e DNase1L3 in vitro. A FIG. 16A mostra uma biblioteca de DNases incluídas DNase1L3 do tipo selvagem (I, D1L3), DNase1 do tipo selvagem (II, D1) e suas variantes. As variantes D1 e D1L3 foram projetadas transferindo aminoácidos de D1L3 para D1 (III, D1<sup>V</sup>) e D1 para D1L3 (IV, D1L3<sup>V</sup>). A atividade da DNase foi testada usando a degradação do DNA de alto peso molecular (HMW), dsDNA e cromatina, como substrato. Na FIG. 16B, a zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, D1, 0,0005 ng). D1 degrada o dsDNA aproximadamente 100 vezes mais eficientemente que o D1L3. A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. D1L3 degrada a cromatina aproximadamente 100 vezes mais eficientemente que D1. Na razão de 10: 1 ou 1: 1 (m/m), D1 e D1L3 mostram efeitos sinérgicos na degradação da cromatina.

[041] **A FIG. 17** mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1) e da DNase1L3 humana (SEQ ID NO: 2). São destacados o peptídeo sinal, aminoácidos conservados, resíduos adicionais de arginina e lisina em regiões variáveis de D1L3 e a cauda C-terminal de D1L3. As régua de sequência indicam a posição dos aminoácidos.

[042] **A FIG. 18** mostra uma lista de resíduos de arginina e lisina que estão presentes apenas na DNase1L3. O aminoácido correspondente na DNase1 e a substituição de aminoácidos na DNase1 são indicados. Os números entre parênteses são a posição de aminoácidos na proteína madura sem peptídeo sinal. Os resíduos de arginina e lisina que estão localizados na cauda C-terminal de D1L3 são mostrados nas pistas 29-37. Este aplicativo testou 22 das 37 variantes possíveis do DNase1.

[043] **A FIG. 19** mostra a caracterização de variantes da DNase1 com substituições únicas de aminoácidos arginina e lisina listados na FIG. 18. A zimografia mostrou atividade

de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. As substituições de aminoácidos que causam um aumento na atividade de degradação da cromatina são destacadas em azul. As amostras sem esse efeito são mostradas em azul claro.

[044] **A FIG. 20** mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1), DNase1 de camundongo (SEQ ID NO: 3), DNase1 de rato (SEQ ID NO: 4) e DNase1L3 humana (SEQ ID NO: 2). As réguas de sequência indicam a posição dos aminoácidos. Os peptídeos de sinal são destacados em cinza. Os resíduos de aminoácidos catiônicos (arginina: R, lisina: K) que estão presentes na DNase1 de camundongo/rato e na DNase1L3 humana, mas não na DNase1 humana, são destacados. Quatro desses resíduos R/K são mostrados na DNase1 do camundongo (Q31R, Q49K, Q79R, W209R). A DNase1 de rato contém dois resíduos R/K adicionais (Q177K, G262K).

[045] **A FIG. 21A-FIG. 21B** mostra uma comparação entre DNase1 murina e humana. (FIG. 21A) A zimografia mostra a atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A DNase1 murina (mD1) e a DNase1 humana (D1) mostram níveis semelhantes de atividade de degradação do dsDNA. A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. A DNase1 murina (mD1) mostra mais atividade de degradação da cromatina que a DNase1 humana (D1). (FIG. 21B) A terapia genética com DNase1 humana fornece apenas proteção parcial da oclusão vascular letal por NETs. A neutrofilia crônica com formação intravascular de NET concomitante foi induzida pela expressão hepática de *Csf3*, que codifica com G-CSF. Os dados mostram a curva de sobrevivência de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* que expressam *Csf3*. Os animais foram injetados com *Csf3* e um vetor de controle vazio (*Ctrl*, N = 6), com uma mistura de *Csf3* e DNase1 humana (*hDnase1*, N = 12) e com *Csf3* e DNase1 murina (*mDnase1*, N = 5). Os valores de P foram calculados usando o teste log-rank.

[046] **A FIG. 22A-FIG. 22B** mostra a caracterização de variantes de DNase1 humana do tipo roedor in vivo e in vitro. (FIG. 20A) A terapia genética com variantes de DNase1 do tipo roedor fornece proteção total contra oclusão vascular letal por NETs. A neutrofilia crônica com formação intravascular de NET concomitante foi induzida pela expressão hepática de *Csf3*, que codifica para G-CSF. Os dados mostram a curva de sobrevivência de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* que expressam *Csf3*. Os animais foram injetados com *Csf3* e um vetor de controle vazio (*Ctrl*, N = 6), com uma mistura de *Csf3* e DNase1 humana (*hDnase1*, N = 12), como mostrado na FIG. 21. Um terceiro grupo de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* recebeu uma injeção de *Csf3* e o gene que codifica a variante DNase1 de tipo murino, que contém 4 mutações de aminoácidos Q31R/Q49K/Q79R/W209R (*Q31R/Q49K/Q79R/W209R*, N = 6). Um quarto grupo de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* recebeu uma injeção de *Csf3* e o gene que codifica a variante DNase1 do tipo rato, que contém 6 mutações de aminoácidos Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R e G262K (*Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K*, N = 6). Os valores de P foram calculados usando o teste log-rank. (FIG. 22B) A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, *Ctrl*). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. A variante tipo murino da DNase1 humana (Q31R/Q49K/Q79R/W209R) e a variante tipo rato da DNase1 humana (Q31R/Q49K/Q79R/Q177K/W209R/G262K) mostram dsDNA semelhante, mas mais atividade de degradação da cromatina que a DNase1 humana selvagem tipo.

[047] **A FIG. 23** mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos da DNase1 humana (D1, SEQ ID NO: 1) e da DNase1L3 humana (D1L3, SEQ ID NO: 2). As réguas de sequência marcam as posições dos aminoácidos. Os aminoácidos de D1 com mutações publicadas são destacados. O D1L3 humano contém três mutações associadas ao ganho de função na DNase1 humana (Q31R/T227K/A136F) e quatro mutações que não estão ligadas ao aumento da atividade.

[048] **As FIG. 24A-24B** mostram a caracterização de variantes da DNase1 (D1<sup>V</sup>) com as mutações Q31R, T227K e/ou A136F. (FIG. 24A) Os sobrenadantes da cultura de células

HEK293 transfectadas foram analisados. As células HEK transfectadas com DNase1 do tipo selvagem (D1) e DNase1L3 (D1L3) serviram como controle. A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. O D1<sup>V</sup> que apresenta três mutações de aminoácidos Q31R/T227K/A136F possui atividade degradante de dsDNA semelhante, mas uma capacidade maior de degradar a cromatina do que D1 e D1<sup>V</sup>, apresentando Q31R, T227K, A136F ou Q31R/T227K. (FIG. 24B) A terapia genética com um D1<sup>V</sup> hiperativo fornece proteção parcial total da oclusão vascular letal por NETs. A neutrofilia crônica com formação intravascular de NET concomitante foi induzida pela expressão hepática de *Csf3*, que codifica com G-CSF. Os dados mostram a curva de sobrevivência de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* que expressam *Csf3*. Os animais foram injetados com *Csf3* e um vetor de controle vazio (*Ctrl*, N = 6), com uma mistura de *Csf3* e DNase1 humana (*hDnase1*, N = 12), como mostrado na FIG. 21. Além disso, um grupo de camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup> Dnase1l3<sup>-/-</sup>* receberam uma injeção de *Csf3* e o gene que codifica uma variante DNase1 humana, que contém a mutação tripla de aminoácidos Q31R/T227K/A136F (*Q31R/T227K/A136F*, N = 6). Os valores de P foram calculados usando o teste log-rank.

[049] A FIG. 25 mostra uma comparação da DNase1 do tipo selvagem (D1) e das variantes da DNase1 (D1<sup>V</sup>) caracterizando as mutações Q31R/T227K/A136F. As proteínas purificadas foram analisadas nas quantidades indicadas. A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, 0 ng). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. A variante DNase1 que apresenta as mutações Q31R/T227K/A136F degrada a cromatina aproximadamente 10 a 20 vezes mais eficientemente do que a DNase1 de tipo selvagem.

[050] **A FIG. 26** mostra uma comparação das variantes da DNase1 (D1<sup>V</sup>) com as mutações de aminoácidos A164K, A136F e A164K/A136F com DNase1 do tipo selvagem (D1) e tipo selvagem (D1L3). Os sobrenadantes da cultura de células HEK transfectadas foram analisados. A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. As variantes DNase1 com A136F/A164K degradam a cromatina com mais eficiência.

[051] **A FIG. 27A-FIG. 27B** mostra o desenvolvimento de uma variante DNase1 com a mutação A226\_T227insK. (FIG. 26A) Alinhamento da sequência de aminoácidos da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1) e da DNase1L3 humana (SEQ ID NO: 2). As régua de sequência marcam as posições dos aminoácidos. Os resíduos críticos de arginina na DNase1L3 são destacados. Os aminoácidos compartilhados entre a DNase1 e a DNase1L3 são destacados e servem como âncoras para substituir a sequência de aminoácidos ATP da DNase1 por VKKS da DNase1L3. (FIG. 26B) A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). O gel foi carregado com as variantes DNase1 (D1), DNase1 do tipo selvagem (D1<sup>V</sup>) que apresentam as mutações A226\_T227insK, T227K e A226\_P228delinsVKKS. A226\_T227insK, mas não A226\_P228delinsVKKS, está associado a uma atividade reduzida de degradação do dsDNA.

[052] **A FIG. 28** mostra a estrutura da DNase1 humana [4AWN]. A folha beta do N-terminal e a folha beta do C-terminal são destacados e o motivo S272/D273/H274, que é conservado entre os membros da família da proteína D1.

[053] **A FIG. 29** mostra o conceito de engenharia de blocos de construção de proteínas homólogas. A tecnologia transfere aminoácidos variáveis únicos ou múltiplos, que são ladeados por aminoácidos variáveis únicos ou múltiplos conservados, entre uma proteína doadora e receptora.

[054] **A FIG. 30** mostra um alinhamento de sequência de aminoácidos de DNase1 e DNase1L3 de camundongo (SEQ ID NOS: 3 e 34), rato (SEQ ID NOS: 4 e 35), chimpanzé

(SEQ ID NOS: 36 e 37) e humano (SEQ ID NOS: 1 e 2). O peptídeo sinal N-terminal e os aminoácidos conservados são destacados. Os aminoácidos variáveis não são destacados e servem como blocos de construção que podem ser transferidos da DNase1 para a DNase1L3 e vice-versa. Abreviações: AA, aminoácido.

[055] **As FIG. 31A-FIG. 31B** mostram listas de blocos de construção na DNase1 humana (D1) e na DNase1L3 humana (D1L3). A FIG. 31A mostra aminoácidos que são conservados em D1 e D1L3, que servem como âncoras N e C, respectivamente. Os blocos de construção são aminoácidos variáveis em D1 e D1L3. As mutações que transferem os Blocos de Construção de D1L3 para D1 são mostradas. A FIG. 31B mostra âncoras N e C em D1L3. As mutações que transferem os Blocos de Construção de D1 para D1L3 são listadas. AA: aminoácido.

[056] **A FIG. 32** mostra uma aplicação da engenharia de blocos de construção de proteínas homólogas. O aplicativo usa como uma etapa inicial de triagem a transferência de grupos de blocos de construção entre um doador homólogo e uma proteína receptora. As etapas opcionais adicionais são a transferência de blocos de construção individuais, seguida pela transferência de aminoácidos individuais. Em uma etapa final (não mostrada), vários aminoácidos, blocos de construção e aglomerados de blocos de construção podem ser combinados para degenerar uma enzima quimérica.

[057] **A FIG. 33** mostra a caracterização de variantes da DNase1 (D1<sup>V</sup>) que apresentam blocos de construção da DNase1L3 (D1L3). A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. As substituições de blocos de construção que causam um aumento na atividade de degradação da cromatina são destacadas na sombra escura. As amostras sem esse efeito são mostradas em leve nuance. Uma variante da DNase1 que caracteriza a combinação dos blocos de construção 11, 12-14, 26, 41-48 e 49 mostra atividade degradante da cromatina semelhante à DNase1L3 do tipo selvagem.

[058] **A FIG. 34A-FIG.34B** mostra o desenvolvimento de uma variante DNase1L3 sem a cauda C-terminal da DNase1L3 do tipo selvagem. A FIG. 34A mostra um alinhamento da

sequência de aminoácidos da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1) e da DNase1L3 humana (SEQ ID NO: 2). As réguas de sequência marcam as posições dos aminoácidos. A cauda C-terminal da DNase1L3 é destacada e seu sinal de localização nuclear é encaixotado. Os aminoácidos compartilhados entre DNase1 e DNase1L3 são indicados. Os aminoácidos localizados após o motivo SDH conservado foram trocados pelo grupo de blocos de construção 60-62 entre DNase1 e DNase1L3. A FIG. 34B mostra zimografia mostrando atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. Os géis foram carregados com DNase1 (D1), variante DNase1 (D1<sup>V</sup>) do tipo selvagem que apresenta o grupo BB 60-62 de D1, variante DNase1L3 (D1L3<sup>V</sup>) que apresenta o grupo BB 60-62 de D1 e um D1L3<sup>V</sup> com duas mutações (K301A, K303A) foram feitas para desativar o NLS2. O D1L3<sup>V</sup> com o grupo BB 60-62 de D1 mostrou atividade degradante da cromatina aumentada em comparação com o D1L3 do tipo selvagem.

[059] **A FIG. 35A-FIG. 35B** mostra o desenvolvimento de variantes de DNase1L3 glicosiladas (D1L3<sup>V</sup>). A FIG. 35A mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da DNase1 humana (SEQ ID NO: 1) e da DNase1L3 humana (SEQ ID NO: 2). As réguas de sequência marcam as posições dos aminoácidos. Os motivos de glicosilação N40-X-T42 e N128-X-T130 da DNase1 são destacados. Os sítios fazem parte do bloco de construção (BB) 4 e do grupo de construção (BB) 23-25. Os aminoácidos compartilhados relevantes entre DNase1 e DNase1L3 são destacados. (FIG. 35B) A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, Ctrl). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. Os géis foram carregados com DNase1L3 tipo selvagem (D1L3), variante DNase1L3 (D1L3<sup>V</sup>) que apresenta BB4 de D1 e variante DNase1L3 (D1L3<sup>V</sup>) que apresenta o grupo BB 23-25 de D1. Um Western Blot (WB) com anticorpos contra D1L3

detectou que D1L3<sup>V</sup> apresentava quantidades aumentadas de proteínas maiores. As duas variantes da DNase1L3 glicosilada (D1L3<sup>V</sup>) mantiveram sua capacidade de degradar a cromatina.

[060] **A FIG. 36A-FIG. 36F** mostra o efeito terapêutico da DNase1L3 (SEQ ID NO: 2) e uma sua variante (SEQ ID NO: 17) contra NETs in vivo. A FIG. 36A mostra uma coloração de H&E de um coração de camundongo com um coágulo denso de NETs rico em hematoxilina dentro de uma câmara cardíaca. A FIG. 36B mostra uma linha do tempo começando com a indução de NETs, levando à oclusão vascular por NETs e morte. Hematúria e hipotermia são sinais externos para coágulos de NET in vivo. (FIG. 36C) Esboço do desenho experimental: *Csf3* foi expresso em *Dnase1*<sup>-/-</sup> *Dnase1l3*<sup>-/-</sup> para induzir coágulos vasculares de NETs. Os camundongos que apresentaram hematúria e hipotermia foram randomizados por injeção de veículo (N = 3), dornase alfa (D1, N = 3), DNase1L3 purificada (D1L3, N = 3) ou uma variante DNase1L3 purificada (SEQ ID NO: 17, D1L3<sup>V</sup>, N = 3). Após 30 minutos, foram coletados pulmões e soro. A terapia com D1L3 ou D1L3<sup>V</sup>, mas não com solução salina ou D1, reduziu significativamente a oclusão vascular por NETs nos pulmões (FIG. 36D) e aumentou os níveis de DNA no soro (FIG. 36E). A FIG. 36F mostra oligo-nucleossomos no soro de camundongos que recebem a terapia D1L3. Os camundongos que recebem D1L3<sup>V</sup> mostraram mono- e di-nucleossomos menores. Isolados de DNA do soro de camundongos que receberam terapia D1 mostraram leves manchas de DNA de vários tamanhos, enquanto nenhum DNA pôde ser isolado do soro de camundongos injetados com veículo.

[061] **A FIG. 37A-FIG.37C** mostra o efeito terapêutico de uma variante DNase1L3 (SEQ ID NO: 17) em um modelo de rato de lesão de isquemia-reperfusão (IR). (FIG: 37A) Esboço do desenho experimental: Um testículo de ratos machos do tipo selvagem foi submetido a torção testicular. O procedimento causa uma lesão no tecido isquêmico. Os camundongos foram randomizados. Foi realizada uma torção do testículo, seguida por uma injeção de veículo (N = 6), dornase alfa (D1, N = 6) ou uma variante DNase1L3 purificada (SEQ ID NO: 17, D1L3<sup>V</sup>, N = 6) . O testículo não tratado e o isquêmico foram coletados após 7 dias. A FIG. 37B mostra que a terapia com o D1L3<sup>V</sup>, mas não com solução salina ou D1, reduziu significativamente a atrofia no testículo isquêmico. A FIG. 37C quantificou a lesão tecidual macroscópica. Todos os testículos não tratados são acastanhados e vascularizados, indicando tecido saudável (Ctrl, pontuação: 0). Torção testicular seguida de

tecido danificado por reperfusão, que parecia esbranquiçado (IR, Pontuação: 4). A terapia com D1L3<sup>V</sup>, mas não com solução salina ou D1, reduziu substancialmente a lesão tecidual e 4/6 dos testículos não mostraram sinais de lesão. Barra de escala: 1 cm.

[062] **As FIG. 38A-FIG. 38C** mostram os níveis de expressão de DNase1, DNase1L3 e variantes dos mesmos. (FIG. 38A) Conjuntos estáveis de células CHO produzindo DNase1 do tipo selvagem (D1), uma variante do mesmo (D1<sup>V</sup>, SEQ ID NO: 7), D1L3 do tipo selvagem e uma variante do mesmo (D1L3<sup>V</sup>, SEQ ID NO: 17) foram cultivadas em biorreatores. As amostras foram coletadas periodicamente e analisadas por Western Blot. A expressão de D1 e D1<sup>V</sup> foi detectada, mas apenas baixos níveis de D1L3 e D1L3<sup>V</sup>. (FIG. 38B) A expressão robusta de D1L3 e D1L3<sup>V</sup> foi alcançada em *Pichia pastoris*. (FIG. 38C) A zimografia mostrou atividade de degradação do dsDNA como círculos escuros. A atividade de degradação do dsDNA se correlaciona com o diâmetro. As amostras sem atividade mostram o carregamento bem como uma pequena mancha preta (por exemplo, D1L3, 0,0005 ng). A eletroforese em gel de agarose (AGE) do DNA isolado da cromatina digerida mostra uma mudança do DNA de alto peso molecular para o DNA de peso molecular inferior ou baixo que se correlaciona com a atividade de degradação da cromatina. D1L3<sup>V</sup> degrada a cromatina aproximadamente 10 vezes mais eficientemente que D1L3.

[063] **A FIG. 39** ilustra certas variantes da DNase de acordo com esta divulgação. São listadas as mutações de aminoácidos na DNase1 e DNase1L3 com peptídeo sinal, bem como as proteínas maduras sem peptídeo sinal. As mutações que foram geradas usando a Engenharia de blocos de construção são marcadas com “+” e os Blocos de construção são indicados entre colchetes.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[064] A presente invenção fornece proteínas DNase projetadas, membros da família de proteína DNase1 (incluindo DNase1 tipo 3 e DNase1) que são úteis no tratamento de condições caracterizadas por acúmulo e/ou liberação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Em alguns aspectos, a invenção fornece composições e métodos para prevenir ou tratar a oclusão vascular envolvendo NETs. Conforme demonstrado neste documento, as NETs participam de um mecanismo não canônico de oclusão vascular, que não depende de fibrina ou plaquetas.

[065] Como usado aqui, o termo "armadilha extracelular de neutrófilos" ou "NET" refere-se a qualquer armadilha extracelular ("ET") compreendendo DNA extracelular formado por

células como, mas não limitado a, neutrófilos, monócitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastócitos células, células cancerígenas, células lesionadas (por exemplo, células endoteliais lesionadas) e semelhantes. A menos que o contexto indique o contrário, os termos NET e ET são usados aqui de forma intercambiável.

[066] Existem duas enzimas extracelulares de DNase encontradas na circulação de humanos e camundongos, DNase1 (D1) e DNase1 tipo 3 (D1L3). Essas enzimas podem ser deficientes em sua capacidade e mecanismo de degradar NETs in vitro e in vivo e são encontradas em concentrações relativamente baixas em humanos e camundongos. As enzimas naturais não possuem propriedades físicas, enzimáticas e/ou farmacodinâmicas ideais para terapia recombinante e, particularmente, para terapia sistêmica.

[067] D1 e D1L3 pertencem, junto com DNase1 tipo 1 (D1L1) e DNase1 tipo 2 (D1L2), à família de proteínas DNase1. D1 e D1L3 são expressos em uma variedade de espécies, incluindo humanos, primatas e roedores. Em humanos e camundongos, D1 e D1L3 mostram uma similaridade proteica de 49-52%. No entanto, apesar de sua homologia, D1 e D1L3 diferem na origem celular, na sensibilidade aos inibidores e na afinidade do substrato. D1 preferivelmente cliva DNA livre de proteínas (por exemplo, DNA bacteriano, DNA de plasmídeo), enquanto D1L3 tem como alvo a cromatina, o complexo de DNA e histonas, que é comumente encontrado no núcleo das células eucarióticas. A atividade D1 é inibida por ligação à actina monomérica e sensível a concentrações fisiológicas de sal. Além disso, D1 é glicosilado em N40 (corresponde a N18 na enzima madura sem peptídeo sinal) e N128 (N106), que torna a enzima resistente à inativação por proteases séricas. Ao contrário, o D1L3 carece de sítios de glicosilação e de ligação à actina, o que causa sua suscetibilidade a várias proteases e resistência à actina, respectivamente.

[068] Em alguns aspectos, a invenção fornece variantes D1L3 projetadas para ter propriedades físicas, farmacodinâmicas e/ou enzimáticas mais adequadas para a terapia, por exemplo, para reduzir ou impedir o acúmulo de NET em um indivíduo. Em várias modalidades, a invenção fornece uma variante de proteína D1L3 recombinante compreendendo: uma ou mais glicosilações, uma ou mais alterações de aminoácidos resultando em maior afinidade do substrato, inativação de um sinal de localização nuclear, exclusão de toda ou parte de uma cauda C-terminal, pegilação e fusão a uma proteína ou porção transportadora. Em várias modalidades, a variante D1L3 aumentou a estabilidade da proteína, aumentou a resistência à protease, aumentou a biodisponibilidade, aumentou a

meia-vida em circulação e/ou substancialmente o mesmo ou melhor DNA e/ou cromatina e/ou atividade de degradação da NET, maior produção níveis com sistemas de expressão in vitro (por exemplo, células de ovário de hamster chinês e/ou *Pichia pastoris*) em comparação com a proteína D1L3 de tipo selvagem da SEQ ID NO: 2.

[069] Em várias modalidades, a variante D1L3 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência com a enzima definida pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, com uma ou mais modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO: 2 como aqui descrito. Em algumas modalidades, a variante D1L3 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a enzima DNase definida pela SEQ ID NO: 2.

[070] Tal como aqui utilizado, quando se refere à identidade de sequência com enzimas DNase do tipo selvagem e, salvo indicação em contrário, sequências referem-se a enzimas maduras sem o peptídeo sinal. Além disso, salvo indicação em contrário, as posições dos aminoácidos são numeradas em relação à sequência completa da DNase traduzida, incluindo o peptídeo sinal, para maior clareza. Desta forma, por exemplo, a referência à identidade de sequência com a enzima da SEQ ID NO: 2 refere-se a uma porcentagem de identidade com a enzima madura que tem M21 no N-terminal. Do mesmo modo, a referência à identidade de sequência com a enzima da SEQ ID NO: 1 (D1 humano) refere-se a uma identidade percentual com a enzima madura tendo L23 no N-terminal.

[071] A semelhança das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, isto é, a porcentagem de identidade de sequência, pode ser determinada através de alinhamentos de sequência, como conhecido na técnica. Tais alinhamentos podem ser realizados com vários algoritmos conhecidos na técnica, como com o algoritmo matemático de Karlin e Altschul (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), com hmalign (pacote HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) ou com o algoritmo CLUSTAL (Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, TJ (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 4673-80). Algoritmos exemplares são incorporados nos programas BLASTN e BLASTP de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Ao utilizar programas BLAST, são utilizados os parâmetros padrão dos respectivos programas.

[072] Em algumas modalidades, a variante da proteína D1L3 recombinante compreende uma ou mais sequências de consenso de glicosilação, por exemplo, NX (T/S). A enzima de

tipo selvagem humana (SEQ ID NO: 2) não contém uma sequência de glicosilação de consenso. No entanto, o projeto de uma sequência de consenso de glicosilação em D1L3 pode fornecer glicosilação (e resistência à protease) sem impacto substancial na atividade da enzima. Em algumas modalidades, a sequência de consenso de glicosilação inclui uma substituição D38N e uma substituição N40T ou N40S e/ou uma substituição A127N e uma substituição V129T ou V129S da sequência do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO: 2). Em algumas modalidades, a enzima D1L3 recombinante possui um, dois, três ou quatro sítios de glicosilação. A sequência de consenso pode ser introduzida na proteína em um sítio que não afeta sua atividade enzimática e, em algumas modalidades, está localizada perto de partes da enzima importantes para manter a estrutura da enzima (por exemplo, nos aminoácidos 25 a 289 e, em algumas modalidades, dentro dos aminoácidos 24 a 150).

[073] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma enzima DNase compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 2, em que a enzima tem uma substituição de asparagina na posição correspondente para a posição 38 e/ou posição 127 da SEQ ID NO: 2, e o N38 e/ou N127 é glicosilado. Em algumas modalidades, a substituição na posição 38 e/ou 127 é feita através de uma substituição de bloco de construção da SEQ ID NO: 1, como aqui descrito.

[074] Em várias modalidades, as variantes de D1L3 com uma ou mais glicosilações exibem maior resistência à degradação da protease sérica e/ou uma meia-vida sérica aumentada em comparação com a proteína D1L3 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2).

[075] Em algumas modalidades, a variante de proteína D1L3 compreende uma inativação de um sinal de localização nuclear (NLS). O D1L3 apresenta dois sítios de localização nuclear (NLS1, NLS2), que direcionam a enzima para o núcleo durante a apoptose. De fato, o D1L3 é necessário para a fragmentação do DNA nuclear em células apoptóticas e necróticas *in vivo*. NLS1 está localizado próximo ao N-terminal (cerca das posições de aminoácidos 80 a 96 em relação à SEQ ID NO: 2). NLS2 (posições de aminoácidos 291 a 304 em relação à SEQ ID NO: 2) é incorporado dentro de uma cauda C-terminal (posições de aminoácidos 283 a 305 em relação à SEQ ID NO: 2) que é exclusiva para D1L3 e não está presente em D1. Pensa-se que a cauda do C-terminal seja necessária para o D1L3 degradar diferentes substratos do DNA extracelular, a saber o DNA encapsulado em lipídeos e a cromatina nos corpos apoptóticos. Os lipídeos encapsulam o DNA durante as

transfecções. Em resumo, cDNA, DNA livre de proteínas e lipídeos catiônicos formam um complexo que penetra através da membrana plasmática das células-alvo. D1L3 interfere nas transfecções e a cauda do C-terminal é crítica para esta função. Os substratos fisiológicos de D1L3 são corpos apoptóticos, vesículas lipídicas extracelulares cheias de cromatina de células apoptóticas. A cauda do C-terminal permite que o D1L3 penetre através das membranas lipídicas dos corpos apoptóticos e degrade a carga da cromatina. Pensa-se também que a cauda do C-terminal seja necessária para a degradação da cromatina extracelular sem lipídeos por D1L3. Assim, a cauda do C-terminal, uma característica molecular única de D1L3, parece ser responsável pelas afinidades de substrato distintas de D1 e D1L3.

[076] A inativação de um ou mais NLSs melhora a disponibilidade e/ou atividade da enzima na circulação. Em algumas modalidades, a inativação do NLS é por exclusão de todo ou parte de NLS1 e/ou NLS2. Em algumas modalidades, o NLS é inativado por substituição e/ou exclusão de aminoácidos no NLS1 e/ou NLS2. Em algumas modalidades, o NLS2 é excluído, total ou parcialmente. Em algumas modalidades, a variante de proteína D1L3 compreende uma exclusão de toda ou parte da cauda do C-terminal e/ou substituição de um ou mais aminoácidos na cauda do C-terminal.

[077] Em certas modalidades, a variante D1L3 contém uma ou mais, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais substituições, adições (por exemplo, inserções) ou deleções de aminoácidos no domínio NLS1. O domínio NLS2 ou uma porção dele pode ser excluído. Em certas modalidades, a variante de proteína D1L3 contém uma ou mais, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos no domínio da cauda do C-terminal. O domínio da cauda do C-terminal ou uma porção do mesmo pode ser excluído. Em várias modalidades, a variante de proteína D1L3 contém uma ou mais, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos no domínio NLS2 que está localizado no domínio da cauda do C-terminal. O domínio NLS2 ou uma porção dele pode ser excluído na variante de proteína D1L3.

[078] Em vários aspectos, a invenção fornece uma tecnologia de projeto de proteínas que se baseia na transferência de um único aminoácido ou de aminoácidos adjacentes múltiplos, denominados "blocos de construção", entre dois membros de uma família de proteínas, como membros da família de proteínas DNase1 para gerar variantes enzimaticamente ativas dos membros da família da proteína DNase1 (incluindo a variante de D1 e D1L3). Um "bloco de

construção" é definido pelos aminoácidos que são variáveis entre dois ou mais membros da família da proteína DNase1. Esses aminoácidos variáveis são ladeados por aminoácidos que são conservados entre dois ou mais membros da família da proteína DNase1 ("âncoras"). A variável de aminoácido único ou vários aminoácidos contíguos ("blocos de construção") são trocados entre membros da família de proteínas DNase1, implantando-os entre um único aminoácido conservado ou vários aminoácidos contíguos ("âncoras").

[079] Essa abordagem é referida aqui como "projeto de proteínas de blocos de construção". Onde três ou mais aminoácidos são transferidos, até 1/3 dos aminoácidos pode ser posteriormente substituído. Por exemplo, onde três ou seis aminoácidos são transferidos como um bloco de construção, um ou até dois resíduos podem ser substituídos adicionalmente, respectivamente. Em algumas modalidades, quatro ou mais aminoácidos são transferidos como uma substituição de bloco de construção e até 25% dos aminoácidos transferidos são substituídos adicionalmente, por exemplo, com modificações conservadoras ou não conservadoras de aminoácidos. Por exemplo, onde quatro, oito ou doze aminoácidos são transferidos, um, dois ou três aminoácidos (respectivamente) podem ser substituídos adicionalmente na substituição do bloco de construção.

[080] Em vários aspectos (incluindo em conexão com as modalidades descritas anteriormente), a variante D1L3 compreende pelo menos uma substituição de bloco de construção de D1. A FIG. 31 ilustra 62 substituições de blocos de construção entre D1 e D1L3.

[081] As substituições exemplares de blocos de construção de D1 incluem uma ou mais dos seguintes:

[082] substituição de 1-20 (MSRELAPLLLLLLSIHSALA) da SEQ ID NO: 2 por 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) da SEQ ID NO: 1; substituição de 21-25 (MRICS) da SEQ ID NO: 2 por 23-27 (LKIAA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 28-30 (VRS) da SEQ ID NO: 2 por 30-32 (IQT) da SEQ ID NO: 1; substituição de 33-34 (ES) da SEQ ID NO: 2 por 35-36 (ET) da SEQ ID NO: 1; substituição de 36-45 (QEDKNAMDVI) da SEQ ID NO: 2 por 38-47 (MSNATLVSYI) da SEQ ID NO: 1; substituição de 47-51 (KVIK) da SEQ ID NO: 2 por 49-53 (QILS) da SEQ ID NO: 1; substituição de 52 (C) da SEQ ID NO: 2 por 54 (Y) da SEQ ID NO: 1; substituição de 54-58 (IILVM) da SEQ ID NO: 2 por 56-60 (IALVQ) da SEQ ID NO: 1; substituição de 60-61 (IK) da SEQ ID NO: 2 por 62-63 (VR) da SEQ ID NO: 1; substituição de 63-70 (SNNRICPI) da SEQ ID NO: 2 por 65-72

(SHLTAVGK) da SEQ ID NO: 1; substituição de 72-74 (MEK) da SEQ ID NO: 2 por 74-76 (LDN) da SEQ ID NO: 1; substituição de 77-84 (RNSRRGIT) da SEQ ID NO: 2 por 79-84 (QDAPDT) da SEQ ID NO: 1; substituição de 86 (N) da SEQ ID NO: 2 por 86 (H) da SEQ ID NO: 1; substituição de 88-89 (VI) da SEQ ID NO: 2 por 88-89 (VV) da SEQ ID NO: 1; substituição de 91-92 (SR) da SEQ ID NO: 2 por 91-92 (EP) da SEQ ID NO: 1; substituição de 96-97 (NT) da SEQ ID NO: 2 por 96-97 (NS) da SEQ ID NO: 1; substituição de 101 (Q) da SEQ ID NO: 2 por 101 (R) da SEQ ID NO: 1; substituição de 103 (A) da SEQ ID NO: 2 por 103 (L) da SEQ ID NO: 1; substituição de 105 (L) da SEQ ID NO: 2 por 105 (V) da SEQ ID NO: 1; substituição de 107-110 (KEKL) da SEQ ID NO: 2 por 107-110 (RPDQ) da SEQ ID NO: 1; substituição de 113-116 (VKRS) da SEQ ID NO: 2 por 113-116 (AVDS) da SEQ ID NO: 1; substituição de 118 (H) da SEQ ID NO: 2 por 118 (Y) da SEQ ID NO: 1; substituição de 120 (H) da SEQ ID NO: 2 por 120 (D) da SEQ ID NO: 1; substituição de 122-127 (YQDGDA) da SEQ ID NO: 2 por 122-128 (GCEPCGN) da SEQ ID NO: 1; substituição de 129 (V) da SEQ ID NO: 2 por 130 (T) da SEQ ID NO: 1; substituição de 131 (S) da SEQ ID NO: 2 por 132 (N) da SEQ ID NO: 1; substituição de 135-136 (FV) da SEQ ID NO: 2 por 136-137 (AIV) da SEQ ID NO: 1; substituição de 138 (W) da SEQ ID NO: 2 por 139 (R) da SEQ ID NO: 1; substituição de 140-143 (QSPH) da SEQ ID NO: 2 por 141-144 (FSRF) da SEQ ID NO: 1; substituição de 145-148 (AVKD) da SEQ ID NO: 2 por 146-149 (EVRE) da SEQ ID NO: 1; substituição de 150 (V) da SEQ ID NO: 2 por 151 (A) da SEQ ID NO: 1; substituição de 152 (I) da SEQ ID NO: 2 por 153 (V) da SEQ ID NO: 1; substituição de 156-157 (TT) da SEQ ID NO: 2 por 157-158 (AA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 159-161 (ETS) da SEQ ID NO: 2 por 160-162 (GDA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 163 (K) da SEQ ID NO: 2 por 164 (A) da SEQ ID NO: 1; substituição de 167 (E) da SEQ ID NO: 2 por 168 (A) da SEQ ID NO: 1; substituição de 169-170 (VE) da SEQ ID NO: 2 por 170-171 (YD) da SEQ ID NO: 1; substituição de 173 (T) da SEQ ID NO: 2 por 174 (L) da SEQ ID NO: 1; substituição de 176-178 (KHR) da SEQ ID NO: 2 por 177-179 (QEK) da SEQ ID NO: 1; substituição de 180-181 (KA) da SEQ ID NO: 2 por 181-182 (GL) da SEQ ID NO: 1; substituição de 183-186 (NFIF) da SEQ ID NO: 2 por 184-187 (DVML) da SEQ ID NO: 1; substituição de 198-201 (PKKA) da SEQ ID NO: 2 por 199-202 (RPSQ) da SEQ ID NO: 1; substituição de 203-204 (KN) da SEQ ID NO: 2 por 204-205 (SS) da SEQ ID NO: 1; substituição de 208 (R) da SEQ ID NO: 2 por 209 (W) da SEQ ID NO: 1; substituição de 210 (D) da SEQ ID NO: 2 por 211 (S) da SEQ ID NO: 1;

substituição de 212 (R) da SEQ ID NO: 2 por 213 (T) da SEQ ID NO: 1; substituição de 214 (V) da SEQ ID NO: 2 por 215 (Q) da SEQ ID NO: 1; substituição de 218 (G) da SEQ ID NO: 2 por 219 (P) da SEQ ID NO: 1; substituição de 220-221 (QE) da SEQ ID NO: 2 por 221-222 (SA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 225-228 (VKKS) da SEQ ID NO: 2 por 226-228 (ATP) da SEQ ID NO: 1; substituição de 230 (N) da SEQ ID NO: 2 por 230 (H) da SEQ ID NO: 1; substituição de 238-240 (LRG) da SEQ ID NO: 2 por 238-240 (VAG) da SEQ ID NO: 1; substituição de 241-246 (QEIVSS) da SEQ ID NO: 2 por 241-246 (MLLRGA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 250 (K) da SEQ ID NO: 2 por 250 (D) da SEQ ID NO: 1; substituição de 252-254 (NSV) da SEQ ID NO: 2 por 252-254 (ALP) da SEQ ID NO: 1; substituição de 256 (D) da SEQ ID NO: 2 por 256 (N) da SEQ ID NO: 1; substituição de 259-260 (KA) da SEQ ID NO: 2 por 259-260 (AA) da SEQ ID NO: 1; substituição de 262 (K) da SEQ ID NO: 2 por 262 (G) da SEQ ID NO: 1; substituição de 264-267 (TEEE) da SEQ ID NO: 2 por 264-267 (SDQL) da SEQ ID NO: 1; substituição de 269-271 (LDV) da SEQ ID NO: 2 por 269-271 (QAI) da SEQ ID NO: 1; substituição de 275 (F) da SEQ ID NO: 2 por 275 (Y) da SEQ ID NO: 1; substituição de 279-280 (FK) da SEQ ID NO: 2 por 279-280 (VM) da SEQ ID NO: 1; e substituição de 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) da SEQ ID NO: 2 por 282 (K) da SEQ ID NO: 1.

[083] Estas substituições de bloco de construção de D1 resultam em variantes de D1L3 que apresentam uma ou mais das seguintes mutações:

M1\_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21\_S25delinsLKIAA,  
V28\_S30delinsIQT, E33\_S34delinsET, Q36\_I45delinsMSNATLVSYI,  
K47\_K50delinsQILS, C52Y, I54\_M58delinsIALVQ, I60\_K61delinsVR,  
S63\_I70delinsSHLTAVGK, M72\_K74delinsLDN, R77\_T84delinsQDAPDT, N86H,  
V88\_I89delinsVV, S91\_R92delinsEP, N96\_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V,  
K107\_L110delinsRPDQ, V113\_S116delinsAVDS, H118Y, H120D,  
Y122\_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, I35F\_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.

[084] O termo "delins" refere-se a uma exclusão entre e incluindo dois aminoácidos indicados, com uma inserção de um aminoácido ou sequência de aminoácidos no sítio da exclusão. Por exemplo, a notação E91\_P92delinsSR significa que os aminoácidos de E91 a P92 são excluídos e os aminoácidos SR são inseridos no sítio da exclusão (por exemplo, a sequência de aminoácidos resultante terá S91 e R92).

[085] O termo "ins" refere-se a uma inserção de aminoácidos entre dois aminoácidos indicados. Por exemplo, a notação E91\_P92insSR significa que os aminoácidos SR são inseridos entre E91 e P92, resultando na sequência E91, S92, R93 e P94.

[086] Várias mutações em uma enzima são separadas por "/", por exemplo, T227K/A136F ou

R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE.

[087] Em algumas modalidades, a variante D1L3 compreende uma ou mais substituições de blocos de construção adjacentes. Por exemplo, a variante D1L3 pode compreender em relação à SEQ ID NO: 2 a mutação F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). Em algumas modalidades, a variante D1L3 pode compreender em relação à SEQ ID NO: 2 a mutação Q36\_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19). Em algumas modalidades, a variante D1L3 pode compreender em relação à SEQ ID NO: 2 a mutação Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20).

[088] Em uma modalidade exemplar, a variante D1L3 compreende 2 ou 3 substituições selecionadas das mutações em relação à SEQ ID NO:2: Q36\_I45delinsMSNATLVSYI, Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N, F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK

[089] Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma enzima DNase compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 2 e compreende pelo menos uma substituição de bloco de construção da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. As substituições de blocos de construção entre SEQ ID NOS: 1 e 2 são ilustradas e numeradas na **FIG. 31**. Por exemplo, em algumas modalidades, a enzima compreende a mutação F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK e que opcionalmente compreende a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a enzima compreende as mutações Q36\_I45delinsMSNATLVSYI, Y122\_A127delinsGCEPCGN, V129T ou S131N e, opcionalmente, possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20.

[090] Exemplos de variantes de D1L3 incluem as que compreendem a sequência de aminoácidos das SEQ ID Nos: 17 a 20. A invenção, em algumas modalidades, inclui derivados com 1 a 10 (por exemplo, 1 a 5) inserções, deleções ou substituições de aminoácidos em relação a qualquer uma das SEQ ID NOS: 17 a 20. Em algumas modalidades, a variante D1L3 compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em bloco adicionais de uma DNase homóloga (por exemplo, de D1). Tais substituições de bloco podem substituir pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou pelo menos 5 aminoácidos. Em algumas modalidades, as substituições de bloco substituem de 2 a 20 aminoácidos, como de 3 a 15 aminoácidos ou de 3 a 10 aminoácidos, com bloco de construção comparável da DNase homóloga.

[091] As variantes projetadas da proteína D1L3 podem compreender uma ou mais substituições, adições (inserções), deleções ou truncamentos de aminoácidos adicionais na sequência de aminoácidos do D1L3 humano (SEQ ID NO: 2). As substituições de aminoácidos podem incluir substituições conservadoras e/ou não conservadoras.

[092] Por exemplo, as "substituições conservativas" podem ser feitas, por exemplo, com base na semelhança na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou na natureza anfipática dos resíduos de aminoácidos envolvidos. Os 20 aminoácidos de ocorrência natural podem ser agrupados nos seguintes seis grupos de aminoácidos padrão: (1) hidrofóbico: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) ácido: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg; (5) resíduos que influenciam na orientação da cadeia: Gly, Pro; e (6) aromático: Trp, Tyr, Phe. "Substituições conservativas" são definidas como trocas de um aminoácido por outro aminoácido listado dentro do mesmo grupo dos seis grupos de aminoácido padrão mostrados anteriormente. Por exemplo, a troca de Asp por Glu mantém uma carga negativa no polipeptídeo assim modificado. Além disso, a glicina e a prolina podem ser substituídas entre si com base na sua capacidade de interromper as hélices  $\alpha$ . Tal como aqui utilizadas, "substituições não conservativas" são definidas como trocas de um aminoácido por outro aminoácido listado em um grupo diferente dos seis grupos de aminoácidos padrão (1) a (6) mostrados anteriormente.

[093] Em algumas modalidades, a variante de proteína D1L3 compreende uma fusão N-terminal ou C-terminal com uma fração de meia-vida prolongada, como albumina, transferrina, uma proteína Fc ou elastina. Ver US 9.458.218, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em algumas modalidades, o D1L3 é dimerizado por uma região de dobradiça de imunoglobulina. Por exemplo, as enzimas projetadas aqui descritas também podem incluir um domínio de fusão Fc (por exemplo, domínios de dobradiça e CH2 e domínios CH3 de uma imunoglobulina). Em outros casos, a proteína D1L3 projetada é fundida à albumina, por exemplo, albumina humana ou um fragmento da mesma. Ver WO 2015/066550; US 9.221.896, que são aqui incorporadas por referência na sua totalidade. A albumina pode ser unida no N-terminal ou no C-terminal da proteína D1 projetada e pode opcionalmente compreender um ligante de aminoácido. Em algumas modalidades, D1L3 e D1 são juntos dimerizados por uma região de dobradiça Fc, criando uma molécula dimérica com propriedades funcionais sinérgicas para NETs de degradação.

[094] Em algumas modalidades, a variante da proteína D1L3 recombinante compreende uma ou mais porções de polietileno glicol (PEG), que podem ser conjugadas em uma ou mais posições ou no C-terminal. Em algumas modalidades, o aminoácido nativo nessa posição é substituído por um aminoácido possuindo uma cadeia lateral adequada para reticulação com porções hidrofílicas para facilitar a ligação da porção hidrofílica ao peptídeo. Em outras modalidades, um aminoácido modificado para compreender um grupo hidrofílico é adicionado ao peptídeo no C-terminal. A(s) cadeia(s) de PEG pode(m) ter um peso molecular na faixa de cerca de 500 a cerca de 40.000 Daltons. Em algumas modalidades, a(s) cadeia(s) de PEG tem um peso molecular na faixa de cerca de 500 a cerca de 5.000 Daltons. Em algumas modalidades, a(s) cadeia(s) de PEG tem um peso molecular de cerca de 10.000 a cerca de 20.000 Daltons.

[095] Em várias modalidades, a variante da proteína D1L3 aumentou a estabilidade da proteína, a disponibilidade sérica aumentada e substancialmente a mesma ou melhor atividade de degradação da NET (conforme determinado in vitro ou in vivo) em comparação com a proteína D1L3 do tipo selvagem. Em várias modalidades, a variante D1L3 compreende uma ou mais das seguintes propriedades em relação ao tipo selvagem D1L3: maior atividade de degradação do DNA livre de proteínas (DNA nu), a mesma ou substancialmente a mesma (por exemplo, pelo menos 50%) degradação cromossômica do DNA atividade, resistência à protease, meia-vida aumentada e níveis mais altos de produção

com sistemas de expressão in vitro (por exemplo, células de ovário de hamster chinês e/ou *Pichia pastoris*).

[096] A fragmentação do DNA pode ser medida usando métodos conhecidos pelos versados na técnica, como eletroforese em gel e ensaios de atividade da DNase. Os métodos para quantificar NETs, a degradação de NET e a atividade de fragmentação de DNA são descritos em, por exemplo, 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, e Jiménez-Alcázar et al. *J Thromb Haemost*, 2015, 13, 732-742.

[097] Em alguns aspectos, a invenção fornece variantes do DNase1 (D1) projetadas para ter propriedades físicas, farmacodinâmicas e/ou enzimáticas mais adequadas para a terapia, por exemplo, para reduzir ou impedir o acúmulo de NET em um indivíduo. Em algumas modalidades, a variante é mais passível de expressão recombinante, proporcionando desse modo vantagens consideráveis de fabricação. Em várias modalidades, a variante D1 projetada compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima madura definida pela sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, com uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos resultando em um ou mais de um sítio de ligação ao DNA mutado, adição de um sítio de ligação à cromatina, um sítio de ligação à actina mutado, mutação de um sítio de glicosilação, adição de um sinal de localização nuclear (por exemplo, tendo semelhança ou identidade com NLS1 ou NLS2 de D1L3) e/ou um domínio C-terminal semelhante ou idêntico à cauda C-terminal de D1L3. A variante D1 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 1, com uma ou mais modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO: 1, como aqui descrito. Em algumas modalidades, a variante D1L3 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade com a enzima de SEQ ID NO: 1.

[098] Em várias modalidades, a variante D1 compreende uma ou mais substituições, adições, deleções ou truncamentos de aminoácidos na sequência de aminoácidos de D1 humano (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos e podem incluir substituições conservadoras e/ou não conservadoras, conforme descrito. Por

exemplo, a variante D1 pode ter de 1 a 20 (ou de 1 a 10 ou de 1 a 5) substituições, deleções ou inserções de aminoácidos em relação à enzima de SEQ ID NO: 1.

[099] Em algumas modalidades, a variante D1 compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em bloco adicionais de uma DNase homóloga (por exemplo, de D1L3). Tais substituições de bloco podem substituir cada um de 1 a 24 aminoácidos, como de 3 a 15 aminoácidos, ou de 3 a 10 aminoácidos, da DNase homóloga. Em algumas modalidades, a variante D1 compreende de 2 a 5 substituições de bloco da DNase homóloga (por exemplo, D1L3). Em algumas modalidades, 2 ou 3 substituições contíguas de blocos de construção são transferidas.

[100] Em várias modalidades, a variante D1 é projetada para compreender uma ou mais das seguintes características em relação à enzima do tipo selvagem: substancialmente a mesma ou maior atividade de degradação do DNA livre de proteína (DNA nu) (por exemplo, pelo menos 50% ou melhor), maior atividade de degradação do DNA cromossômico, resistência semelhante ou melhorada à protease, resistência à actina, meia-vida sérica aumentada, penetração aprimorada do sangue na urina ou bile ou uma combinação dessas propriedades.

[101] Em algumas modalidades, a enzima D1 projetada compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos 50% (ou pelo menos 70%, 80%, 90%) de identidade de sequência com o domínio C-terminal da proteína D1L3 de tipo selvagem (por exemplo, aminoácidos 283 a 305 da SEQ ID NO: 2).

[102] Em algumas modalidades, a enzima D1 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 50% ou pelo menos 75% de identidade de sequência com o NLS1 do D1L3 do tipo selvagem (aminoácidos 35 a 51 da SEQ ID NO: 2), um sinal de localização nuclear 2 (NLS2) possuindo uma identidade de sequência substancial ao NLS2 da proteína D1L3 de tipo selvagem (aminoácidos 296 a 304 da SEQ ID NO: 2).

[103] Em vários aspectos, a variante D1 recombinante compreende uma ou mais substituições de bloco de construção selecionadas de: substituição de 1-22 (MRGMKLLGALLALAALLQGAVS) da SEQ ID NO:1 por 1-20 (MSRELAPLLL LLSIHSALA) da SEQ ID NO:2; substituição de 23-27 (LKIAA) da SEQ ID NO:1 por 21-25 (MRICS) da SEQ ID NO:2; substituição de 30-32 (IQT) da SEQ ID NO:1 por 28-30 (VRS) da SEQ ID NO:2; substituição de 35-36 (ET) da SEQ ID NO:1 por 33-34 (ES) da SEQ ID NO:2; substituição de 38-47 (MSNATLVSYI) da SEQ ID NO:1 por 36-45

(QEDKNAMDVI) da SEQ ID NO:2; substituição de 49-52 (QILS) da SEQ ID NO:1 por 47-50 (KVIK) da SEQ ID NO:2; substituição de 54 (Y) da SEQ ID NO:1 por 52 (C) da SEQ ID NO:2; substituição de 56-60 (IALVQ) da SEQ ID NO:1 por 54-58 (IILVM) da SEQ ID NO:2; substituição de 62-63 (VR) da SEQ ID NO:1 por 60-61 (IK) da SEQ ID NO:2; substituição de 65-72 (SHLTAVGK) da SEQ ID NO:1 por 63-70 (SNNRICPI) da SEQ ID NO:2; substituição de 74-76 (LDN) da SEQ ID NO:1 por 72-74 (MEK) da SEQ ID NO:2; substituição de 79-84 (QDAPDT) da SEQ ID NO:1 por 77-84 (RNSRRGIT) da SEQ ID NO:2; substituição de 86 (H) da SEQ ID NO:1 por 86 (N) da SEQ ID NO:2; substituição de 88-89 (VV) da SEQ ID NO:1 por 88-89 (VI) da SEQ ID NO:2; substituição de 91-92 (EP) da SEQ ID NO:1 por 91-92 (SR) da SEQ ID NO:2; substituição de 96-97 (NS) da SEQ ID NO:1 por 96-97 (NT) da SEQ ID NO:2; substituição de 101 (R) da SEQ ID NO:1 por 101 (Q) da SEQ ID NO:2; substituição de 103 (L) da SEQ ID NO:1 por 103 (A) da SEQ ID NO:2; substituição de 105 (V) da SEQ ID NO:1 por 105 (L) da SEQ ID NO:2; substituição de 107-110 (RPDQ) da SEQ ID NO:1 por 107-110 (KEKL) da SEQ ID NO:2; substituição de 113-116 (AVDS) da SEQ ID NO:1 por 113-116 (VKRS) da SEQ ID NO:2; substituição de 118 (Y) da SEQ ID NO:1 por 118 (H) da SEQ ID NO:2; substituição de 120 (D) da SEQ ID NO:1 por 120 (H) da SEQ ID NO:2; substituição de 122-128 (GCEPCGN) da SEQ ID NO:1 por 122-127 (YQDGDA) da SEQ ID NO:2; substituição de 130 (TF) da SEQ ID NO:1 por 129 (V) da SEQ ID NO:2; substituição de 132 (N) da SEQ ID NO:1 por 131 (S) da SEQ ID NO:2; substituição de 136-137 (AI) da SEQ ID NO:1 por 135-136 (FV) da SEQ ID NO:2; substituição de 139 (R) da SEQ ID NO:1 por 138 (W) da SEQ ID NO:2; substituição de 141-144 (FSRF) da SEQ ID NO:1 por 140-143 (QSPH) da SEQ ID NO:2; substituição de 146-149 (EVRE) da SEQ ID NO:1 por 145-148 (AVKD) da SEQ ID NO:2; substituição de 151 (A) da SEQ ID NO:1 por 150 (V) da SEQ ID NO:2; substituição de 153 (V) da SEQ ID NO:1 por 152 (I) da SEQ ID NO:2; substituição de 157-158 (AA) da SEQ ID NO:1 por 156-157 (TT) da SEQ ID NO:2; substituição de 160-162 (GDA) da SEQ ID NO:1 por 159-161 (ETS) da SEQ ID NO:2; substituição de 164 (A) da SEQ ID NO:1 por 163 (K) da SEQ ID NO:2; substituição de 168 (A) da SEQ ID NO:1 por 167 (E) da SEQ ID NO:2; substituição de 170-171 (YD) da SEQ ID NO:1 por 169-171 (VE) da SEQ ID NO:2; substituição de 174 (L) da SEQ ID NO:1 por 173 (T) da SEQ ID NO:2; substituição de 177-179 (QEK) da SEQ ID NO:1 por 176-178 (KHR) da SEQ ID NO:2; substituição de 181-182 (GL) da SEQ ID NO:1 por 180-181 (KA) da SEQ ID NO:2; substituição de 184-187 (DVML) da SEQ ID

NO:1 por 183-187 (NFIF) da SEQ ID NO:2; substituição de 199-202 (RPSQ) da SEQ ID NO:1 por 198-201 (PKKA) da SEQ ID NO:2; substituição de 204-205 (SS) da SEQ ID NO:1 por 203-204 (KN) da SEQ ID NO:2; substituição de 209 (W) da SEQ ID NO:1 por 208 (R) da SEQ ID NO:2; substituição de 211 (S) da SEQ ID NO:1 por 210 (D) da SEQ ID NO:2; substituição de 213 (T) da SEQ ID NO:1 por 212 (R) da SEQ ID NO:2; substituição de 215 (Q) da SEQ ID NO:1 por 214 (V) da SEQ ID NO:2; substituição de 219 (P) da SEQ ID NO:1 por 218 (G) da SEQ ID NO:2; substituição de 221-222 (SA) da SEQ ID NO:1 por 220-221 (QE) da SEQ ID NO:2; substituição de 226-228 (ATP) da SEQ ID NO:1 por 225-228 (VKKS) da SEQ ID NO:2; substituição de 230 (H) da SEQ ID NO:1 por 230(N) da SEQ ID NO:2; substituição de 238-239 (VA) da SEQ ID NO:1 por 238-239 (LR) da SEQ ID NO:2; substituição de 241-246 (MLLRGA) da SEQ ID NO:1 por 241-246 (QEIVSS) da SEQ ID NO:2; substituição de 250-251 (D) da SEQ ID NO:1 por 250-251 (K) da SEQ ID NO:2; substituição de 252-254 (ALP) da SEQ ID NO:1 por 252-254 (NSV) da SEQ ID NO:2; substituição de 256 (N) da SEQ ID NO:1 por 256 (D) da SEQ ID NO:2; substituição de 259-260 (AA) da SEQ ID NO:1 por 259-260 (KA) da SEQ ID NO:2; substituição de 262 (G) da SEQ ID NO:1 por 262 (K) da SEQ ID NO:2; substituição de 264-267 (SDQ) da SEQ ID NO:1 por 264-267 (TEEE) da SEQ ID NO:2; substituição de 269-271 (QAI) da SEQ ID NO:1 por 269-271 (LDV) da SEQ ID NO:2; substituição de 275 (Y) da SEQ ID NO:1 por 275 (F) da SEQ ID NO:2; substituição de 279-280 (VM) da SEQ ID NO:1 por 279-280 (FK) da SEQ ID NO:2; e substituição de 282 (K) da SEQ ID NO:1 por 282-305 (QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS) da SEQ ID NO:2.

[104] Estes blocos de construção de D1L3 resultam em variantes de D1, que apresentam uma ou mais das seguintes mutações: 1M\_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA, L23\_A27delinsMRICS, I30\_T32delinsVRS, E35\_T36delinsES, M38\_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49\_S52delinsKVIK, Y54C, I56\_Q60delinsIILVM, V62\_R63delinsIK, S65\_K72delinsSNNRICPI, L74\_N76delinsMEK, Q79\_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88\_V89delinsVI, E91\_P92delinsSR, N96\_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107\_Q110delinsKEKL, A113\_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122\_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136\_I137delinsFV, R139W, F141\_F144delinsQSPH, E146\_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157\_A158delinsTT, G160\_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170\_D171delinsVE, L174T, Q177\_K179delinsKHR, G181\_L182delinsKA,

D184\_L187delinsNFIF, R199\_Q202delinsPKKA, S204\_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221\_A222delinsQE, A226\_P228delinsVKKS, H230N, V238\_A239delinsLR, M241\_A246delinsQEIVSS, D250K, A252\_P254delinsNSV, N256D, A259\_A260delinsKA, G262K, S264\_L267delinsTEEE, Q269\_I271delinsLDV, Y275F, V279\_M280delinsFK, K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS.

[105] Em algumas modalidades, uma variante D1 recombinante compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: Y275F, V279\_M280delinsFK e K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16). Tais variantes compreendem uma cauda C-terminal e exibem maior afinidade por complexos DNA-lipídeos.

[106] Em algumas modalidades, uma variante D1 recombinante compreende as seguintes modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO: 1: Q79\_T84delinsRNSRRGIT (por exemplo, SEQ ID NO: 10); H86N e/ou V88\_V89delinsVI e/ou E91\_P92delinsSR (por exemplo, SEQ ID NO: 11, que inclui todos os três); A136\_I137delinsFV (por exemplo, SEQ ID NO: 12); R199\_Q202delinsPKKA e/ou S204\_S205delinsKN e/ou W209R e/ou S211D e/ou T213R e/ou Q215V e/ou P219G e/ou S221\_A222delinsQE (por exemplo, SEQ ID NO: 13, que inclui todos os oito) ; e A226\_P228delinsVKKS (por exemplo, SEQ ID NO: 14).

[107] Em algumas modalidades, onde a variante D1 compreende a substituição H86N, a variante compreende pelo menos uma modificação de adição, como uma substituição de bloco de construção ou outra mutação pontual aqui descrita (como a adição de um aminoácido catiônico ou substituição que resulta em resistência à actina).

[108] Em algumas modalidades, a variante D1 compreende pelo menos duas substituições contíguas adjacentes de blocos de construção que resultam em mutações em relação à SEQ ID NO: 1 de: H86N/V88\_V89delinsVI (por exemplo, SEQ ID NO: 11); R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE (por exemplo, SEQ ID NO: 13); Y275F/V279\_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16).

[109] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma enzima DNase compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 1, e compreendendo pelo menos uma substituição de blocos de construção da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, em que a enzima

DNase tem atividade de degradação da cromatina aumentada em comparação com a enzima DNase da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a enzima compreende pelo menos duas substituições de blocos de construção adjacentes da SEQ ID NO: 2. As substituições de blocos de construção entre D1 (SEQ ID NO: 1) e D1L3 (SEQ ID NO: 2) são ilustradas na **FIG. 31**.

[110] Em algumas modalidades, a enzima compreende a seguinte modificação em relação à SEQ ID NO: 1: Q79\_T84delinsRNSRRGIT e, opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

[111] Em algumas modalidades, a enzima compreende a seguinte modificação em relação à SEQ ID NO: 1: H86N/V88\_V89delinsVI/E91\_P92delinsSR e, opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

[112] Em algumas modalidades, a enzima compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: A136\_I137delinsFV e, opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12.

[113] Em algumas modalidades, a enzima compreende duas ou mais das seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: R199\_Q202delinsPKKA e/ou S204\_S205delinsKN, e/ou W209R e/ou S211D e/ou T213R e/ou Q215V, e/ou P219G e/ou S221\_A222delinsQE, e opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13 (que compreende todas as oito).

[114] Em algumas modalidades, a enzima compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: A226\_P228delinsVKKS e, opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

[115] Em algumas modalidades, a enzima compreende duas ou mais das seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: Q79\_T84delinsRNSRRGIT e/ou H86N e/ou V88\_V89delinsVI e/ou E91\_P92delinsSR e/ou A136\_I137delinsFV e/ou R199\_Q202delinsPKKA e/ou S204\_S205delinsKN e/ou W209R e/ou S211D e/ou T213R e/ou Q215V e/ou P219G e/ou S221\_A222delinsQE e/ou A226\_P228delinsVKKS e, opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ NO: 15.

[116] Em algumas modalidades, a enzima compreende duas ou mais as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO: 1: Y275F e/ou V279\_M280delinsFK e/ou K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS, e opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

[117] Exemplos de variantes de D1 incluem as que compreendem a sequência 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 e SEQ ID NO: 16. A invenção, em algumas modalidades, inclui derivados com 1 a 10 (por exemplo, 1 a 5) inserções, deleções ou substituições de aminoácidos em relação a qualquer uma das SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em algumas modalidades, a variante D1 compreende uma ou mais substituições de aminoácidos em bloco adicionais de uma DNase homóloga (por exemplo, de D1L3). Essas substituições de bloco podem substituir de 2 a 20 aminoácidos, como de 3 a 15 aminoácidos ou de 3 a 10 aminoácidos da variante D1, por aminoácidos de bloco de construção da DNase homóloga (por exemplo, D1L3, SEQ ID NO : 2). As substituições de blocos de construção entre D1 e D1L3 são ilustradas na **FIG. 31**. Em algumas modalidades, a enzima DNase compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% ou pelo menos 97% idêntica à SEQ ID NO: 15.

[118] Em algumas modalidades, a enzima exibe uma ou mais propriedades selecionadas de: afinidade semelhante ou superior ao DNA livre de proteínas em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1, uma atividade de degradação da cromatina mais alta em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1, uma atividade enzimática que é resistente à inibição pela actina em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1 e uma combinação das mesmas.

[119] Em algumas modalidades, a variante D1 compreende uma fusão N-terminal ou C-terminalom uma fração de meia-vida prolongada, como albumina, transferrina, um Fc ou uma proteína tipo elastina, como descrito para D1L3. Em algumas modalidades, a enzima D1 é dimerizada por uma região de dobradiça de imunoglobulina.

[120] Em várias modalidades, a variante D1 exibe uma ou mais propriedades selecionadas de: a mesma ou maior atividade de degradação do DNA livre de proteína (DNA nu), maior atividade de degradação do DNA cromossômico (cromatina), semelhante ou resistência melhorada à protease, resistência à actina, penetração semelhante ou melhorada do sangue na urina e/ou bile e níveis mais altos de produção em sistemas de expressão in vitro (por exemplo, células de ovário de hamster chinês e/ou *Pichia pastoris*), e uma combinação dos mesmos.

[121] Em várias modalidades, a enzima DNase compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos da enzima da SEQ ID NO: 1 e compreende a substituição, inserção ou adição de um ou mais resíduos de arginina e/ou lisina, em que a enzima DNase tem atividade de degradação da cromatina aumentada em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, os um ou mais resíduos de arginina e/ou lisina são substituições de aminoácidos selecionadas de substituições nas posições correspondentes às posições 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 e 280 da SEQ ID NO: 1. Modificações exemplares nessas posições incluem 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 e K280M. Em várias modalidades, a enzima compreende a substituição e/ou inserção de pelo menos dois ou pelo menos três ou pelo menos quatro ou pelo menos cinco ou pelo menos seis resíduos de arginina e/ou lisina. Em algumas modalidades, a enzima DNase compreende uma arginina ou lisina em uma ou mais posições correspondentes às posições 31, 49, 76, 79, 92, 109, 164, 177, 200, 201, 204, 209, 213 e 262 da SEQ ID NO: 1, que são opcionalmente selecionados de Q31R, Q49R, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, W209R, T213R, W209R, e G262K. Essas posições/substituições podem fornecer independentemente uma atividade melhor, incluindo a atividade para degradar a cromatina.

[122] Em várias modalidades, se a enzima compreender uma substituição de Q31R ou T227K, a enzima compreenderá pelo menos duas modificações de aminoácidos selecionadas 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 e K280M. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos incluem Q31R e T227K em relação à SEQ ID NO: 1.

[123] Em algumas modalidades, a enzima DNase tem uma arginina ou lisina nas posições correspondentes às posições 31, 49, 79 e 209 da SEQ ID NO: 1 e pode opcionalmente compreender as seguintes substituições de aminoácidos: Q31R, Q49K, Q79R e W209R. Essas posições abrigam uma arginina ou lisina no D1 de murino, mas não o D1 humano do tipo selvagem, e podem transferir a atividade de degradação da cromatina para o D1 humano.

[124] Em algumas modalidades, a enzima DNase tem uma arginina ou lisina nas posições correspondentes às posições 31, 49, 79, 177, 209 e 262 da SEQ ID NO: 1 e pode opcionalmente compreender as substituições de aminoácidos Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K. Quatro dessas posições abrigam uma arginina ou lisina no D1 de rato, mas não o D1 humano tipo selvagem, e juntos podem transferir a atividade de degradação da cromatina para o D1 humano.

[125] Em algumas modalidades, a enzima DNase tem um resíduo de lisina ou arginina nas posições correspondentes às posições 31 e 227 da SEQ ID NO: 1.

[126] Em algumas modalidades, a enzima DNase tem uma lisina ou arginina na posição correspondente à posição 164 da SEQ ID NO: 1, que é opcionalmente lisina (A164K).

[127] Em várias modalidades, a proteína D1 projetada contém uma ou mais modificações de aminoácidos (por exemplo, substituições, adições e deleções) no sítio de ligação à actina (por exemplo, substituição de A136, como A136F), impedindo ou evitando a ligação à actina. Como tal, a proteína D1 projetada pode ser resistente à actina ou substancialmente resistente à actina. Ver Ulmer et al., *PNAS USA*, vol. 93, pp 8225-8229 (1996). Assim, em várias modalidades, a enzima DNase compreende uma substituição de aminoácidos na posição 136 em relação à SEQ ID NO: 1, e que é opcionalmente A136F. As mutações em D1 que proporcionam resistência à actina, como mutações na posição 136 (por exemplo, A136F, ou substituição de outro aminoácido volumoso, hidrofóbico, cíclico ou aromático nesta posição), podem ser combinadas com qualquer outra mutação aqui descrita, incluindo a adição de resíduos catiônicos ou substituições de blocos de construção.

[128] Em algumas modalidades, a variante D1 é resistente à inibição de actina e capaz de degradar a cromatina. Por exemplo, a variante D1 pode compreender as seguintes substituições de aminoácidos: Q31R, T227K e A136F em relação à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a enzima DNase compreende as seguintes substituições de aminoácidos: A164K e A136F.

[129] Em algumas modalidades, a enzima DNase compreende uma sequência de consenso de glicosilação que compreende uma substituição N40S e/ou uma substituição N128S em relação à SEQ ID NO: 1. Por exemplo, em algumas modalidades a enzima compreende as substituições de aminoácidos: Q31R, N40S, A136F, N128S e T227K em relação à SEQ ID NO: 1.

[130] Em várias modalidades, a variante D1 contém uma ou mais modificações de aminoácidos (por exemplo, substituições, adições, inserções e deleções) nos sítios de glicosilação, aumentando assim a afinidade para o DNA encapsulado em lipídeos. Como tal, a proteína D1 projetada pode degradar o DNA encapsulado em lipídeos em reações de transfecção. Ver Wilber et al., *Mol Ther* 6, 35-42 (2002).

[131] Em várias modalidades, a variante D1 é glicosilada ou pode não ser glicosilada, particularmente onde a meia-vida de circulação longa não é necessária. As alterações de aminoácidos aqui descritas podem ser feitas no contexto de variantes glicosiladas ou não glicosiladas.

[132] Em algumas modalidades, a variante D1 é resistente à inibição de actina e capaz de degradar a cromatina dentro das vesículas de lipídeo. Exemplos de variantes de D1 compreendem uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas entre: Q31R, T227K, A136F, N40D ou N40A e N128D ou N128S, com aminoácidos numerados de acordo com a SEQ ID NO: 1. Tais variantes podem não ter sítios de glicosilação, que são benéficos de uma perspectiva de fabricação.

[133] Em algumas modalidades, a variante D1 é resistente à inibição da actina e capaz de degradar a cromatina nas vesículas de lipídeo e compreende modificações de aminoácidos Q31R, T227K, A136F, N40D e N128D em relação à SEQ ID NO: 1.

[134] Outras modificações em D1 podem ser como descrito em Pan et al. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11701-11708 e no documento US 2014/0199329, cuja divulgação completa é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[135] A variante D1 projetada pode ter uma meia-vida sérica aumentada ou prolongada em comparação com a proteína D1 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o D1 projetado compreende um domínio de fusão Fc (por exemplo, uma região de dobradiça e/ou domínios CH2 e domínios CH3 de uma imunoglobulina). Em algumas modalidades, o D1 projetado é fundido à albumina, por exemplo, albumina humana ou um fragmento do mesmo. A albumina pode ser unida no N-terminal ou no C-terminal da enzima D1 projetada, opcionalmente através de um ligante de aminoácido.

[136] Em alguns aspectos, a invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo as variantes D1L3 e/ou D1 recombinantes, ou polinucleotídeos ou vetores que codificam as mesmas, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em várias modalidades, a variante da proteína D1L3 recombinante é formulada para administração parenteral ou pulmonar. Em

algumas modalidades, a composição é formulada para administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intra-articular, intramuscular, tópica ou subcutânea, ou outra via aqui descrita. Em algumas modalidades, a composição compreende D1L3 e D1, que são cada uma opcionalmente variantes projetadas descritas aqui. Em algumas modalidades, a variante D1L3 recombinante e a variante D1 recombinante são formuladas para administração parenteral ou pulmonar.

[137] O termo "veículo farmacologicamente aceitável" inclui, mas não se limita a, qualquer veículo que não interfira na eficácia da atividade biológica dos ingredientes e que não seja tóxico para o paciente ao qual é administrado. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis etc. Tais veículos podem ser formulados por métodos convencionais e podem ser administrados ao indivíduo em uma dose adequada. Preferivelmente, as composições são estéreis. Estas composições também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos.

[138] As vias de administração incluem, por exemplo: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular, intravenosa, subcutânea, intra-arterial, oral, sublingual, pulmonar ou transdérmica. Em algumas modalidades, a administração é efetuada oralmente ou por injeção ou infusão parenteral. Em algumas modalidades, a via de administração é tópica, inclusive como colírios ou lavagem bucal.

[139] Ainda em outros aspectos, a invenção fornece um método para fazer uma composição farmacêutica para reduzir ou prevenir o acúmulo da armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Nestas modalidades, a invenção emprega um camundongo geneticamente modificado deficiente na atividade D1 e D1L3, e expressão heteróloga de um polinucleotídeo G-CSF (por exemplo, em células de hepatócitos) ou indução de uma expressão endógena sustentada de G-CSF (por exemplo, por meio da administração repetitiva de compostos microbianos). Este modelo de camundongo acumula NETs e desenvolve rapidamente oclusões vasculares relacionadas a NET. Nestas modalidades, a invenção compreende a administração de um inibidor NET candidato ou enzima DNase candidata (incluindo uma variante D1L3 ou D1 de acordo com esta divulgação) ao camundongo geneticamente modificado e a seleção de um inibidor de NET ou enzima DNase

que reduz o acúmulo de NETs. O inibidor ou enzima selecionado é formulado (como descrito) para administração a um paciente humano.

[140] Um versado na técnica reconhece métodos padrão para gerar camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase113<sup>-/-</sup>* nocaute duplo. Descrições detalhadas podem ser encontradas, por exemplo, no Pedido Europeu nº EP 17152528.0.

[141] Em alguns aspectos, a invenção fornece um método para o tratamento de um indivíduo em necessidade de degradação da armadilha extracelular de neutrófilos (NET). O método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1L3 e/ou D1 (que pode incluir variantes aqui descritas, ou em algumas modalidades uma ou mais enzimas do tipo selvagem, incluindo para terapia de combinação D1L3 e D1) de acordo com esta divulgação. D1L3 ou D1 pode ser administrado como composições farmacêuticas compreendendo a proteína recombinante, ou em algumas modalidades compreendendo o DNA ou RNA de codificação ou vetores compreendendo o mesmo.

[142] Em algumas modalidades, o método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um D1L3 ou uma variante do mesmo e um D1 ou uma variante do mesmo. O D1L3 ou sua variante, e o D1 ou sua variante, podem ser administrados em uma única composição farmacêutica ou em composições farmacêuticas separadas. Em algumas modalidades, a razão de D1L3 ou sua variante para D1 ou sua variante é na faixa de 100: 1 a 1: 100 em massa, ou 10: 1 a 1:10 em massa, e é opcionalmente cerca de 1: 1.

[143] Em algumas modalidades, o indivíduo exibe degradação de NET prejudicada e/ou exibe acúmulo de NET patológico. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um distúrbio inflamatório crônico ou agudo. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma infecção aguda ou crônica.

[144] Em várias modalidades, a presente invenção refere-se ao tratamento de doenças ou condições caracterizadas pela presença ou acúmulo de NETs. Tais doenças ou condições incluem, mas não se limitam a, doenças associadas a neutrofilia crônica (por exemplo, um aumento no número de neutrófilos), agregação e leucostase de neutrófilos, trombose e oclusão vascular (por exemplo, doença das células falciformes), lesão de isquemia-reperusão (por exemplo, vólvulo do intestino médio, torção testicular, reperusão de isquemia e reperusão de órgãos vitais, transplante de órgãos), lesão de tecido cirúrgico e traumático, reação ou doença inflamatória aguda ou crônica, doença autoimune (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), nefrite lúpica, artrite reumatoide, vasculite,

esclerose sistêmica), doença cardiovascular (por exemplo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose, tromboembolismo venoso, incluindo terapia trombolítica), doença metabólica (por exemplo, diabetes), inflamação sistêmica (por exemplo, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, choque séptico, coagulação intravascular disseminada (DIC) e microangiopatia trombótica (TMA)), doenças inflamatórias do trato respiratório (por exemplo, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), lesão pulmonar aguda (ALI), lesão pulmonar induzida por fumaça, lesão pulmonar induzida por transfusão (TRALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e asma, atelectasia, bronquite, empiema), doenças inflamatórias renais (doenças renais agudas e crônicas, incluindo lesão renal aguda (AKI) e doença renal crônica (CKD), doenças inflamatórias relacionadas ao tecido transplantado (por exemplo, doença do enxerto contra o hospedeiro) e câncer (por exemplo, leucemia, metástase de tumor e tumores sólidos).

[145] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou está em risco de sistemas ducturais de oclusão de NETs. A presente invenção pode ser administrada a um indivíduo para tratar pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, obstruções do canal deferente ou doenças renais. Em tais modalidades, o método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um D1L3 ou uma variante do mesmo e/ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1 ou uma variante do mesmo. Por exemplo, o indivíduo pode ser administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 2 e uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80 % ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, as enzimas compreendem a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 2 e a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

[146] Em algumas modalidades, o sistema ductal é o duto biliar, duto lacrimal, duto lactífero, duto cístico, duto hepático, duto ejaculatório, duto parótido, duto submandicular, duto sublingual principal, duto de Bartholin, aqueduto cerebral, pâncreas, glândula mamária, canal deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado. Por exemplo, o indivíduo pode ter pancreatite, colangite (por exemplo, colangite esclerosante primária), conjuntivite, mastite, doença do olho seco, obstrução do canal deferente ou doença renal. Em algumas modalidades, a enzima DNase é administrada por administração intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal. Em várias modalidades, a DNase, quando aplicada, por exemplo, por via

intravenosa, estará presente na forma enzimaticamente ativa em vários sistemas ductais, como no fluido biliar.

[147] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou corre o risco de acumular NETs nas superfícies endoteliais (por exemplo, aderências cirúrgicas), na pele (por exemplo, feridas/cicatrizes) ou nas articulações sinoviais (por exemplo, gota e artrite). A presente invenção pode ser administrada a um indivíduo para tratar uma condição caracterizada por um acúmulo de NETs em uma superfície endotelial como, mas não limitado a, uma aderência cirúrgica. Em várias modalidades, a presente invenção pode ser administrada a um indivíduo para tratar uma condição caracterizada por um acúmulo de NETs na pele, como, mas não limitado a, feridas e cicatrizes. Em certas modalidades, a presente invenção pode ser administrada a um indivíduo para tratar uma condição caracterizada por um acúmulo de NETs em uma articulação sinovial, como, mas não limitado a, gota e artrite.

[148] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou está em risco de uma oclusão vascular compreendendo NETs. Em tais modalidades, o método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um D1L3 ou uma variante do mesmo e/ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1 ou uma variante do mesmo. Por exemplo, o indivíduo pode ser administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, a enzima compreende a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o indivíduo é ainda administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 1, tal como a enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

[149] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma condição relacionada às NETs, conforme descrito em WO 2016/118476 e US 9.642.822, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[150] Em várias modalidades, o indivíduo tem uma doença que é ou foi tratada com DNases do tipo selvagem, incluindo D1 e estreptodornase. Tais doenças ou condições incluem trombose, acidente vascular cerebral, sepse, lesão pulmonar, aterosclerose, infecção viral, doença falciforme, infarto do miocárdio, infecção no ouvido, cicatrização de feridas, lesão hepática, endocardite, infecção hepática, pancreatite, disfunção primária do enxerto, reperfusão de isquemia de membros, lesão renal, coagulação sanguínea, inflamação induzida

por alume, lesão hepatorenal, exsudações pleurais, hemotórax, coágulos sanguíneos, anemia pós-pneumática, úlceras, condições otorrinolaringológicas, infecções orais, lesões leves, sinusite, rinoplastias pós-operatórias, infertilidade, cateter da bexiga, limpeza de feridas, teste de reação cutânea, meningite pneumocócica, gota, úlceras de perna, fibrose cística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquite crônica, bronquiectasia, lúpus, discinesia ciliar primária, bronquiolite, empiema, infecções pleurais, câncer, doença dos olhos secos, infecções do trato respiratório inferior, hematomas crônicos, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva.

[151] Em certas modalidades, a presente invenção refere-se ao tratamento de doenças ou condições caracterizadas por deficiência de D1, deficiência de D1L3 e deficiência de D1 e D1L3. Em alguns casos, o indivíduo tem uma mutação no gene *Dnase1* e/ou *Dnase1l3*. Esses indivíduos também podem ter uma doença autoimune (por exemplo, SLE, esclerose sistêmica) ou uma doença inflamatória. Em alguns casos, o indivíduo possui um inibidor adquirido de D1 (por exemplo, anticorpo anti-DNase1 e actina) e/ou de D1L3 (por exemplo, anticorpo anti-DNase1l3). Esses indivíduos também podem ter uma doença autoimune (por exemplo, SLE, esclerose sistêmica) ou uma doença inflamatória (por exemplo, sepse e lesão por isquemia-reperfusão).

[152] Em algumas modalidades, o indivíduo tem fibrose cística e a composição da DNase é administrada por administração pulmonar.

[153] Em várias modalidades, por exemplo, onde o indivíduo está em risco ou exibe sintomas de oclusão vascular relacionada à NET, a proteína ou composição (por exemplo, compreendendo D1L3, D1 ou uma variante de D1L3 ou D1, incluindo variantes aqui descritas ) pode ser administrada por via intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intra-arterial.

[154] Em várias modalidades, o indivíduo é monitorado quanto à atividade de degradação de NET de sangue, plasma ou soro. Por exemplo, o indivíduo pode ser monitorado por cerca de uma semana a cerca de quatro semanas, para reduzir o risco de oclusão vascular ou ductal pelas NETs, ou danos aos órgãos relacionados à NET. Em algumas modalidades, o indivíduo pode receber de uma a quatro administrações ao longo de uma semana a um mês (ou 1-2 semanas), conforme necessário para evitar ou reduzir o acúmulo intravascular de NET (incluindo oclusões intravasculares relacionadas a NET) durante uma infecção aguda ou evento inflamatório. Em outras modalidades, o indivíduo pode receber infusão contínua ao

longo de uma hora a um mês (ou 1-2 semanas). Em alguns casos, o indivíduo pode receber pelo menos uma, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou mais infusões diárias, por exemplo (sem limitação), no caso de doenças críticas, como sepse, acidente vascular cerebral ou infarto do miocárdio.

[155] O tratamento de doenças ou condições relacionadas a NETs pode envolver a administração de uma variante D1, uma variante D1L3 ou uma combinação compreendendo uma variante D1 e uma variante D1L3. Em algumas modalidades, duas ou mais variantes da proteína D1 aqui descritas são administradas. Em algumas modalidades, duas ou mais variantes da proteína D1L3 aqui descritas são administradas.

[156] As presentes variantes de proteína D1 e variantes de proteína D1L3 podem ser administradas como uma terapia profilática, como antes do início de um ou mais sintomas da doença ou condição.

[157] Conforme usado neste documento, "tratamento" ou "tratar" ou "tratado" refere-se ao tratamento terapêutico em que o objetivo é retardar (diminuir) uma condição fisiológica, distúrbio ou doença indesejada, ou obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, alívio dos sintomas; diminuição da extensão da condição, distúrbio ou doença; estabilização (*isto é*, não piora) do estado da condição, distúrbio ou doença; atraso no início ou lentidão da progressão da condição, distúrbio ou doença; melhoria da condição, distúrbio ou estado da doença; e remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável, ou aprimoramento ou melhoria da condição, distúrbio ou doença. O tratamento inclui provocar uma resposta clinicamente significativa sem níveis excessivos de efeitos colaterais. Em outras modalidades, "tratamento" ou "tratar" ou "tratado" refere-se a medidas profiláticas, em que o objetivo é atrasar o início ou reduzir a gravidade de uma condição fisiológica indesejada, distúrbio ou doença, como, por exemplo, uma pessoa que está predisposto a uma doença (por exemplo, um indivíduo que carrega um marcador genético para uma doença como o lúpus).

[158] Nos métodos da invenção, a terapia é usada para fornecer uma resposta terapêutica positiva em relação a uma doença ou condição. Por "resposta terapêutica positiva" entende-se uma melhoria na doença ou condição e/ou uma melhoria nos sintomas associados à doença ou condição. Por exemplo, uma resposta terapêutica positiva se refere a uma ou mais das seguintes melhorias na doença: (1) uma redução nas armadilhas

extracelulares de neutrófilos; (2) uma redução de coágulos intravasculares; (3) redução de coágulos ductais; (4) uma redução do acúmulo de NETs nas articulações sinoviais; (5) um aumento na degradação de armadilhas extracelulares de neutrófilos; (6) um aumento na degradação do DNA livre de proteínas extracelulares; (7) um aumento na degradação do DNA cromossômico extracelular ou DNA ligado à proteína; (8) um aumento na degradação de armadilhas extracelulares de neutrófilos na presença de autoanticorpos; (9) uma redução na inflamação de tecido/órgão; (10) uma redução na lesão de tecido/órgão; (11) uma redução na atrofia de tecidos/órgãos; (12) um aumento na taxa de sobrevivência do paciente; e (13) algum alívio de um ou mais sintomas associados à doença ou condição.

[159] Respostas terapêuticas positivas em qualquer doença ou condição podem ser determinadas por critérios de resposta padronizados específicos para essa doença ou condição. A resposta clínica pode ser avaliada quanto a alterações na oclusão vascular e na presença de NETs, usando técnicas de triagem como ressonância magnética (MRI), ultrassonografia, histologia e contagem de NETs na circulação. Além dessas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo sob terapia pode experimentar o efeito benéfico de uma melhora nos sintomas associados à doença.

[160] Os regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode ser administrado um bolo único, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. As composições parenterais podem ser formuladas na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem neste documento refere-se a unidades discretas fisicamente adequadas como doses unitárias para os indivíduos a ser tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com o veículo farmacêutico necessário.

[161] Em várias modalidades, a presente invenção fornece um vetor de expressão, compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante tipo selvagem ou D1L3 ou D1 aqui descrita, que pode ser útil para terapia genética. A terapia genética pode ser útil para doenças crônicas, como uma deficiência genética de D1L3 e/ou D1 (como uma mutação deletéria). Em várias modalidades, o vetor de expressão compreende DNA ou RNA. Em várias modalidades, o vetor de expressão é um vetor de expressão de mamífero.

[162] Em algumas modalidades, os vetores de expressão compreendem um ácido nucleico que codifica as variantes de proteínas operacionalmente ligadas a uma região de controle de expressão, ou complemento da mesma, que é funcional em uma célula hospedeira (por exemplo, célula procariótica, eucariótica ou de mamífero). A região de controle da expressão é capaz de acionar a expressão do ácido nucleico que codifica o agente de bloqueio e/ou de estimulação operativamente ligado, de tal modo que o agente de bloqueio e/ou estimulação seja produzido em uma célula humana transformada com o vetor de expressão.

[163] As regiões de controle de expressão são polinucleotídeos reguladores (por vezes aqui referidos como elementos), tais como promotores e intensificadores, que influenciam a expressão de um ácido nucleico operativamente ligado. Uma região de controle de expressão de um vetor de expressão da invenção é capaz de expressar ácido nucleico de codificação operativamente ligado em uma célula humana. Em uma modalidade, a região de controle da expressão confere expressão regulável a um ácido nucleico operativamente ligado. Um sinal (às vezes denominado estímulo) pode aumentar ou diminuir a expressão de um ácido nucleico operativamente ligado a essa região de controle de expressão. Essas regiões de controle de expressão que aumentam a expressão em resposta a um sinal são frequentemente denominadas induzíveis. Essas regiões de controle de expressão que diminui a expressão em resposta a um sinal são frequentemente denominadas repressíveis. Normalmente, a quantidade de aumento ou diminuição conferida por esses elementos é proporcional à quantidade do sinal presente; quanto maior for a quantidade de sinal, maior será o aumento ou a diminuição na expressão.

[164] Os sistemas de expressão funcionais em células humanas são bem conhecidos na técnica e incluem sistemas virais. Geralmente, um promotor funcional numa célula humana é qualquer sequência de DNA capaz de ligar a RNA polimerase de mamífero e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência de codificação em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação de transcrição, que é normalmente colocada próxima da extremidade 5' da sequência de codificação, e tipicamente uma TATA box localizada 25-30 pares de bases a montante do sítio de iniciação da transcrição. Acredita-se que a caixa TATA direcione a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no sítio correto. Um promotor também conterá tipicamente um elemento promotor a montante (elemento intensificador), tipicamente localizado dentro de 100 a 200 pares de bases a montante da caixa TATA. Um elemento promotor a montante determina a taxa na qual a transcrição é iniciada e pode atuar

em qualquer orientação. De particular utilidade como promotores são os promotores de genes virais de mamífero, uma vez que os genes virais são frequentemente altamente expressos e possuem uma ampla faixa de hospedeiros. Exemplos incluem o promotor precoce de SV40, o promotor de LTR do vírus do tumor mamário de camundongo, o promotor tardio principal de adenovírus, o promotor do vírus herpes simplex e o promotor de CMV.

[165] Quando apropriado, os agentes de administração de genes, como, *por exemplo*, as sequências de integração, também podem ser usados. Várias sequências de integração são conhecidas na técnica (*ver, por exemplo*, 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). Estes incluem recombinases e transposases. Exemplos incluem Cre (Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), lambda (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), Flp (Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R (Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31 (*ver, por exemplo*, Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335: 667-678, 2004), sleeping beauty, transposases de uma família marinha (Plasterk, *et al.*, *supra*) e componentes para integração de vírus, como AAV, retrovírus e antivírus com componentes que proporcionam a integração de um vírus, como as sequências de LTR de retrovírus e lentivírus e as sequências de ITR de AAV (Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). Adicionalmente, podem ser utilizadas estratégias de integração genética direta e direcionada para inserir sequências de ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão quiméricas incluindo as tecnologias de edição de gene CRISPR/CAS9, dedo de zinco, TALEN e meganuclease.

[166] Todas as referências citadas são aqui expressamente incorporadas por referência na sua totalidade.

## EXEMPLOS

### **Exemplo 1: DNases hospedeiras impedem a oclusão vascular por armadilhas extracelulares de neutrófilos**

[167] Coágulos de plaquetas e fibrina obstruem os vasos sanguíneos na hemostasia e trombose. Aqui relatamos um mecanismo não canônico para oclusão vascular baseado em armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), fibras de DNA antimicrobianas liberadas por neutrófilos ativados. Mostramos que duas DNases, DNase1 e DNase1-3, degradam as

NETs na circulação durante episódios de inflamação murina. Na ausência de ambas as DNases, as NETs intravasculares formam coágulos que obstruem os vasos sanguíneos e causam danos aos órgãos. As oclusões vasculares em pacientes com infecções bacterianas graves estão associadas a um defeito de degradação de NETs *ex vivo* e à formação de coágulos intravasculares de NET. A DNase1 e a DNase1 tipo 3 são expressas independentemente e, portanto, fornecem proteção dupla ao hospedeiro contra efeitos deletérios das NETs na inflamação.

[168] A inflamação é uma resposta essencial do hospedeiro para controlar micróbios invasores e curar tecidos danificados (1). A inflamação descontrolada e persistente causa lesão tecidual em uma infinidade de distúrbios inflamatórios. Os neutrófilos são os leucócitos predominantes na inflamação aguda. Durante as infecções, os neutrófilos geram armadilhas extracelulares (NETs), treliças de filamentos de DNA decoradas com histonas e enzimas tóxicas que imobilizam e neutralizam bactérias (2). A relevância das NETs na defesa do hospedeiro é ilustrada pelo fato de que as DNases extracelulares servem como fatores de virulência em várias bactérias patogênicas (3, 4). No entanto, as NETs liberadas de maneira inadequada podem prejudicar as células hospedeiras devido à sua atividade citotóxica, pró-inflamatória e protrombótica (5-7). De fato, as NETs são frequentemente associadas a danos inflamatórios ou isquêmicos nos órgãos e a infusão terapêutica de DNases limita a lesão do hospedeiro em vários modelos animais (8, 9).

[169] Como o hospedeiro degrada as NETs *in vivo* para limitar os danos nos tecidos durante os episódios de inflamação é pouco conhecido. Trabalhos anteriores mostraram que a DNase1 no soro digere a espinha dorsal do DNA das NETs *in vitro* (10). Analisamos o soro de camundongos do tipo selvagem por zimografia e detectamos duas DNases enzimaticamente ativas, DNase1 e DNase1 tipo 3 [(DNase113) (FIG. 1A). Ambas as enzimas são membros da família da proteína DNase1, mas diferem na origem e na afinidade do substrato. A DNase1 é expressa por tecidos não hematopoiéticos e preferivelmente cliva o DNA livre de proteínas (11,12). A DNase113, também conhecida como DNase  $\gamma$ , é secretada pelas células imunológicas e tem como alvo complexos DNA-proteína-proteínas, como nucleossomos (11,13). Geramos camundongos que não tinham atividade de degradação do DNA no soro devido a uma deficiência combinada de DNase1 e DNase113 (FIG. 1A). As NETs geradas *in vitro* permaneceram intactas após a exposição aos soros de DNase1/DNase113  $-/-$ , enquanto os soros de camundongos tipo selvagem, DNase1  $-/-$  e

DNase113<sup>-/-</sup> degradaram as NETs (FIG. 1B e FIG. 1C). Utilizamos um plasmídeo de expressão específico para hepatócitos em conjunto com a administração de genes hidrodinâmicos para expressar estavelmente o cDNA da DNase1 ou DNase113 no fígado de camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup>. Dado que ambas as enzimas contêm uma sequência de sinal de proteína secretora (11), essa abordagem restaurou a atividade da DNase1 ou DNase113 na circulação (FIG. 1D) e a capacidade dos soros de camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup> de degradar NETs (FIG. 1E e FIG. 1F). Tomados em conjunto, esses dados mostram que duas enzimas hospedeiras expressas independentemente, DNase1 e DNase113, degradam NETs *in vitro*.

[170] Para testar a exigência de DNase1 e DNase113 para a degradação de NET *in vivo*, objetivamos estimular cronicamente camundongos do tipo selvagem DNase1 <sup>-/-</sup>, DNase113 <sup>-/-</sup> e DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup> com o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). O G-CSF desencadeia neutrofilia, uma característica da inflamação aguda, e estimula uma subpopulação de neutrófilos para liberar espontaneamente as NETs *ex vivo* (14). Clonamos o cDNA do CSF3, que codifica G-CSF, no plasmídeo de expressão específico para hepatócitos. A injeção hidrodinâmica de camundongos do tipo selvagem com o plasmídeo CSF3 resultou em níveis cronicamente elevados de G-CSF no plasma (FIG. 5A). Consequentemente, o hemograma de neutrófilos aumentou constantemente e as NETs formadas espontaneamente foram detectadas em esfregaços de sangue (FIG. 2A e FIG. 2B). Além disso, observamos um número aumentado de neutrófilos residentes em órgãos vitais e esplenomegalia (FIG. 5B e FIG. 5C). É importante ressaltar que os camundongos do tipo selvagem injetados no CSF3 cresceram normalmente, não desenvolveram lesão de órgãos e não mostraram sinais macroscópicos de angústia ou comportamento anormal (FIG. 5D e FIG. 5E). Coletivamente, esses dados sugerem que a neutrofilia crônica com formação concomitante de NET é bem tolerada em camundongos do tipo selvagem.

[171] A seguir, expressamos estavelmente CSF3 no fígado de camundongos DNase1 <sup>-/-</sup>, DNase113 <sup>-/-</sup> e DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup>. Os camundongos com uma única deficiência na DNase1 ou DNase113 não mostraram sinais de angústia (não mostrados), enquanto todos os camundongos com uma deficiência combinada morreram dentro de 6 dias após a injeção do CSF3 (FIG. 2C). Os camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup> que receberam o plasmídeo de controle sem CSF3 sobreviveram sem mostrar quaisquer anomalias (FIG. 2C, não mostrada). Coexpressamos DNase1 ou DNase113 com CSF3 em camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup>

para induzir neutrofilia e NETs e, simultaneamente, restaurar DNase1 ou DNase113 na circulação. A expressão de qualquer DNase foi suficiente para os camundongos DNase1/DNase113  $-/-$  sobreviverem sem mostrar nenhum sinal de angústia (FIG. 2D). Os camundongos DNase1/DNase113  $-/-$  que coexpressam *CSF3* com um plasmídeo de controle sem *DNase1* e *DNase113* morreram dentro de 5 dias após a administração do gene (FIG. 2D). A mortalidade nesses camundongos foi precedida por uma hipotermia de rápido progresso, que foi evidenciada como uma forte diminuição da temperatura corporal periférica dentro de 8 horas antes do exitus (FIG. 2E). A hipotermia foi acompanhada de anemia hemolítica demonstrada por plasma e urina avermelhados e redução da hemoglobina no sangue (FIG. 2F e FIG. 2G). Esquistócitos abundantes em esfregaços de sangue indicaram que a anemia hemolítica foi causada pela fragmentação dos eritrócitos (FIG. 2H). Além disso, detectamos níveis plasmáticos elevados de lactato desidrogenase (LDH), transaminases hepáticas e os marcadores de lesão renal, nitrogênio da ureia no sangue e creatinina, que indicaram danos a múltiplos órgãos (FIG. 2I, FIG. 6A e FIG. 6B). A coexpressão de *DNase1* ou *DNase113* com *CSF3* manteve a temperatura corporal e a integridade dos eritrócitos e órgãos (FIG. 2E a FIG. 2I; FIG. 6A e FIG. 6B). Em conclusão, esses dados indicam que a DNase1 ou a DNase113 é necessária para evitar lesões no hospedeiro durante a neutrofilia crônica.

[172] A análise histológica de camundongos DNase1/DNase113  $-/-$  com neutrofilia crônica mostrou coágulos intravasculares positivos para hematoxilina com eritrócitos retidos que ocluíram total ou parcialmente vasos sanguíneos nos pulmões, fígado e rins (FIG. 3A e B; FIG. 6C e FIG. 6D). A expressão de DNase1 ou DNase113 na circulação impediu essas oclusões vasculares. Os coágulos positivos para hematoxilina mostraram um padrão de coloração violeta claro abundante que foi esporadicamente corado com uma coloração violeta escuro de núcleos de leucócitos individuais, sugerindo que o DNA não condensado é o principal componente do coágulo (FIG. 3A). Dado que o colapso nuclear e o desdobramento da cromatina firmemente compactada são uma característica da formação da NET (15), coramos os coágulos positivos para hematoxilina para os marcadores da NET. Observamos uma coloração robusta com corantes fluorescentes intercalantes de DNA de fita dupla e anticorpos contra a cromatina (FIG. 7A). A colocalização de cromatina descondensada com a enzima mieloperoxidase derivada de grânulos de neutrófilos, peptídeos antimicrobianos de catelicidina e histonas citrulinadas com marcador substituto de

NET confirmou que os coágulos foram compostos de NETs (FIG. 3C, FIG. 7B e FIG. 7C). Para identificar os componentes dos trombos canônicos, coramos os coágulos de NET para fibrina e fator de von Willebrand (vWF), uma proteína armazenada nas vesículas secretoras de plaquetas e no endotélio vascular. Os coágulos de NET foram muito heterogêneos em seu teor de vWF e fibrina (FIG. 3D e FIG. 3E). As seções transversais dos coágulos NET foram cobertas em média com 46% de vWF, enquanto 9% dos coágulos NET não coraram para o vWF (FIG. 3E e FIG. 3F). A fibrina foi praticamente ausente e detectada em menos de 23% dos vasos ocluídos (FIG. 3E). Esses dados estão de acordo com as descobertas de que as NETs servem como andaime independente de fibrina para imobilizar plaquetas e eritrócitos *in vitro* (6). A ausência de vWF e fibrina em alguns coágulos sugere que as NETs podem ser suficientes para a oclusão vascular. Para corroborar essa noção, objetivamos gerar coágulos de NET a partir de neutrófilos puros *in vitro*. Isolamos neutrófilos do sangue e induzimos a formação de NET, enquanto expomos as células a forças de cisalhamento para imitar o fluxo sanguíneo. Nesta configuração, observamos coágulos macroscopicamente visíveis e sensíveis à DNase (FIG. 8A), que se assemelhavam à aparência de coágulos de NET na vasculatura de murino (FIG. 8B). Agora, reduzimos as plaquetas da circulação e inibimos farmacologicamente a trombina para bloquear a formação de fibrina em camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup> que expressam CSF3. Ao contrário da expressão de DNase1- ou DNase113-, nenhum tratamento antitrombótico poderia impedir a mortalidade nesses animais (FIG. 3H). Coletivamente, os dados sugerem que coágulos de NETs são suficientes para obstruir os vasos sanguíneos durante a neutrofilia crônica em camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup>.

[173] A formação de coágulos de NET em camundongos DNase1/DNase113 <sup>-/-</sup> está associada a características de microangiopatias trombóticas induzidas por infecção (TMAs) e coagulação intravascular disseminada em pacientes, incluindo esquistócitos, anemia hemolítica e falência de órgãos devido a oclusões vasculares. Analisamos o plasma de pacientes com TMA com síndrome hemolítico-urêmica devido a uma infecção por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga [STEC-HUS, (16)]. Seps e choque séptico eram complicações frequentes nesses pacientes (17). As NETs geradas *in vitro* permaneceram intactas após a exposição ao plasma do paciente coletado no estado de doença aguda, enquanto o plasma de pacientes em remissão degradou as NETs (FIG. 9A e FIG. 9B). Os dados indicam um defeito adquirido e temporário na degradação da NET, estendendo assim

relatórios anteriores (18,19). É importante notar que os pacientes com STEC-HUS foram efetivamente tratados com um regime que incluía infusão de plasma de doadores saudáveis (17), uma fonte de DNases, que potencialmente restaurou a degradação da NET.

[174] É reportado que grandes agregados de NETs são formados no líquido sinovial e nos dutos pancreáticos dos pacientes (21,22), mas ainda não foram descritos em outros tecidos. Portanto, nosso objetivo foi identificar agregados intravasculares de NETs em pacientes com doenças inflamatórias graves. Examinamos o tecido pulmonar coletado na autópsia de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo e/ou sepse (FIG. 10). Detectamos coágulos positivos para hematoxilina nos vasos sanguíneos de dois pacientes sépticos (FIG. 11A e FIG. 11C). Em ambos os casos, os coágulos foram compostos por cromatina e MPO (FIG. 11B e FIG. 11D), indicando que as NETs podem formar coágulos intravasculares na sepse humana.

[175] A septicemia é um gatilho potente e rápido da formação intravascular de NET em camundongos (7). Portanto, levantamos a hipótese de que um defeito na degradação da NET pode agravar a doença. De fato, observamos que camundongos com uma deficiência combinada de *DNase1* e *DNase113*, mas não de tipo selvagem, foram altamente suscetíveis a baixas doses de lipopolissacarídeo e *E. coli* morta pelo calor (FIG. 4A). Semelhante aos camundongos *DNase1/DNase113*<sup>-/-</sup> neutrofílicos, a análise sanguínea de camundongos *DNase1/DNase113*<sup>-/-</sup> sépticos mostrou anemia hemolítica e hematúria (FIG. 4B e FIG. 4C), juntamente com níveis aumentados de LDH plasmático e esquistócitos em esfregaços de sangue (FIG. 4D e FIG. 4E). Além disso, detectamos vasos sanguíneos parcial ou totalmente ocluídos abundantes no pulmão (FIG. 4F e FIG. 4G). A análise detalhada de vasos parcialmente ocluídos revelou coágulos de NETs dentro do lúmen vascular (FIG. 4H). Em vasos completamente ocluídos, os coágulos de NET foram congestionados com eritrócitos e leucócitos retidos (FIG. 4I; FIG. 12A e FIG. 12B). É importante ressaltar que a expressão hepática de *DNase1* ou *DNase113* em camundongos *DNase1/DNase113*<sup>-/-</sup> impediu a oclusão vascular e restaurou o fenótipo do tipo selvagem. Tomados em conjunto, esses dados indicam que a *DNase1* ou *DNase113* circulante impede a formação de coágulos de NET e a lesão do hospedeiro na septicemia.

[176] Em resumo, enquanto plaquetas e fibrina formam coágulos hemostáticos e trombos patológicos (23), nossos dados introduzem coágulos de NET como um mecanismo não canônico para oclusão vascular em estados inflamatórios. Semelhante aos fios de fibrina, as

NETs são moléculas ultra grandes e estáveis (6). Em altas concentrações, como as encontradas na neutrofilia crônica ou na septicemia, as NETs intravasculares podem formar coágulos, com tamanho suficiente para obstruir os vasos sanguíneos e, assim, causar danos aos eritrócitos e órgãos. Para manter a integridade do sangue e do tecido durante a inflamação, o hospedeiro expressa independentemente a DNase1 e a DNase113 como um sistema de proteção dupla contra NETs intravasculares. No entanto, os defeitos genéticos e adquiridos nesses fatores hospedeiros podem atrasar a degradação das NETs e, assim, precipitar a doença. Os defeitos adquiridos podem envolver a inibição da DNase1 por actina monomérica externa a partir de tecido danificado e a inativação da DNase113 por proteases séricas (11). As mutações na DNase1 e DNase113 foram identificadas em pacientes e estão associadas ao lúpus eritematoso sistêmico (SLE), uma doença autoimune sistêmica (24,25). Curiosamente, os camundongos deficientes em DNase1 e DNase113 desenvolvem espontaneamente doença do tipo SLE com a idade (13,26). As NETs são compostas por autoantígenos proeminentes e os neutrófilos de pacientes com SLE têm uma capacidade aumentada de liberar NETs (27). Uma capacidade de depuração reduzida pode aumentar as NETs de meia-vida e, assim, promover a doença autoimune (10,27). Em conclusão, defeitos nas DNases hospedeiras podem antecipar os efeitos deletérios das NETs em uma infinidade de doenças inflamatórias.

[177] Consequentemente, a degradação de NET mediada por DNase1- e DNase113 fornece uma oportunidade terapêutica atraente para pacientes que sofrem de condições inflamatórias. Para testar se a DNase1 e a DNase113 degradam as NETs pelo mesmo ou por mecanismos distintos, reticulamos proteínas nas NETs usando fixador. As NETs fixas foram degradadas eficientemente pelos soros DNase113  $-/-$ , mas resistiram à degradação pelos soros DNase1  $-/-$  (FIG. 13A e FIG. 13B). De acordo com esses resultados, a exposição de NETs à DNase1 ou DNase113 recombinante mostrou que ambas as DNases degradam NETs naive (FIG. 13C e FIG. 13D), enquanto as NETs fixas são resistentes à atividade da DNase113 (FIG. 13E e FIG. 13F). Coletivamente, esses dados *in vitro* sugerem que a DNase1 e a DNase113 degradam NETs por meio de mecanismos distintos.

[178] Finalmente, comparamos a atividade da DNase1 e DNase113 na circulação de camundongos para humanos. Para discriminar a atividade da DNase1 e DNase113, geramos anticorpos contra a DNase1 humana ( $\alpha$ -hDNase1), que bloqueiam a atividade da DNase1 no plasma de doadores saudáveis normais (NHD) (FIG. 14A). A heparina é um inibidor

conhecido da DNase113 e foi usada para bloquear a atividade de degradação do DNA pela DNase113 (FIG. 14B). O plasma de murino apresentou atividade DNase total aproximadamente 10 vezes maior (FIG. 14C), atividade DNase1 (FIG. 14D) e atividade DNase113 (FIG. 14E) que o plasma humano. Além disso, a DNase113 no plasma de murino, mas não no plasma humano, degrada as NETs de maneira eficiente (FIG. 14F e FIG. 14G). Os dados sugerem que a concentração de DNase113 na circulação humana não é suficiente para degradar NETs. Portanto, possibilitando a degradação de NET mediada por DNase113 em pacientes uma nova e promissora estratégia terapêutica para doenças inflamatórias.

## **Materiais e Métodos**

### **Plasma do paciente**

[179] Amostras de plasma com citrato foram obtidas de pacientes durante o surto de STEC-HUS em 2011 na Alemanha (16). Os critérios de inclusão em nosso estudo foram identificação positiva de STEC/*E. coli* entero-hemorrágica ou diarreia com sangue, contagem de plaquetas  $\leq 150 \times 10^9/L$  ou diminuição de  $\geq 25\%$  em 1 semana, evidência de hemólise (LDH acima do limite normal, haptoglobina) abaixo do limite normal ou presença de esquistócitos) e estágio agudo da lesão renal  $\geq 1$ .

### **Tecido humano**

[180] Os tecidos humanos foram fixados à temperatura ambiente durante a noite em formalina tamponada com fosfato a 5%. Todos os tecidos foram coletados na autópsia e submetidos originalmente para fins de diagnóstico e estudados de acordo com os princípios éticos nacionais. A causa da morte dos pacientes é indicada na FIG. 10.

### **Camundongos**

[181] Todos os camundongos estavam em um contexto genético C57BL/6. Cruzamos camundongos DNase1<sup>-/-</sup> e DNase1 tipo 3<sup>-/-</sup> (26,28) descritos anteriormente para gerar camundongos DNase1/DNase113<sup>-/-</sup>. Recentemente, foi relatado que esta cepa de camundongos DNase1<sup>-/-</sup> contém uma mutação fora do alvo no gene de sobreposição de *DNase1* *Trap1/Hsp75*, que codifica uma acompanhante mitocondrial (29). Portanto, incluímos uma cepa DNase1<sup>-/-</sup> alternativa (30) para gerar camundongos DNase1/DNase113<sup>-/-</sup> para experimentos de controle (FIG. 15A-FIG. 15C)

### **Deteção de DNase1 por desnaturação por zimografia por eletroforese em gel de poliacrilamida (DPZ)**

[182] Realizamos DPZ, como descrito anteriormente com modificações (19). Em resumo, os géis de dodecil sulfato de sódio (SDS) - poliacrilamida foram preparados com géis de empilhamento de 4% (v/v) sem DNA e géis de resolução de 10% (v/v) contendo 200 µg/ml de DNA de testículos de salmão (Sigma-Aldrich, Alemanha). Para a detecção de DNase1, 0,5 µl de soro de murino foram misturados com 14,5 µl de água e 5 µl de tampão de carregamento de gel SDS (BioRad, Alemanha). A mistura foi fervida durante 5 minutos e carregada nos géis. A eletroforese foi realizada a 120 V usando tampão de eletroforese Tris/glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS a 0,1% (p/v), pH 8,7). Após eletroforese, as proteínas foram redobradas incubando os géis durante a noite a 37 °C em um tampão de redobragem contendo 5% (p/v) de leite em pó, 10 mM de Tris/HCl pH 7,8, 3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 U/mL de penicilina e estreptomicina 100 µg/mL. Os géis foram transferidos para um tampão de redobragem sem leite em pó e incubados por mais 24 horas a 37 °C. O DNA foi marcado fluorescentemente com 1x SYBR Safe (Thermo Scientific, Alemanha) e as imagens fluorescentes de géis foram gravadas usando um escâner de fluorescência (Molecular Imager FX, BioRad, Alemanha).

#### **Deteção de DNase113 por DPZ**

[183] Para a detecção de DNase113, 2 µl de soro foram misturados com 12 µl de água, 5 µl de tampão de gelificação de SDS e 1 µl de beta-mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich). A BME reduz as pontes dissulfeto da DNase1, causando sua inativação (11). A mistura foi fervida durante 5 minutos e carregada nos géis. A eletroforese foi realizada como descrito para a DNase1. O SDS foi removido lavando os géis com 10 mM de Tris/HCl pH 7,8 por 30 minutos a 50 °C duas vezes. As proteínas foram redobradas incubando os géis por 48 horas a 37 °C em um tampão de redobragem contendo 10 mM de Tris/HCl pH 7,8, 1 mM de BME, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os géis foram então incubados por 48 horas adicionais a 37 °C em tampão de redobragem suplementado com CaCl<sub>2</sub> 3 mM e MnCl<sub>2</sub> 3 mM. A adição de Mn<sup>2+</sup> é necessária para permitir a degradação eficiente do DNA livre de proteínas pela DNase113 (11). O DNA foi marcado e imageado como descrito para DNase1.

#### **Deteção da atividade total da DNase pelo ensaio de difusão de enzima radial única (SRED)**

[184] Para medir a atividade total da DNase, dissolvemos 55 µg/ml de DNA dos testículos de salmão em um tampão contendo Mn<sup>2+</sup> (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM

CaCl<sub>2</sub>, e 2x SYBR Safe). A solução de DNA foi aquecida a 50 °C por 10 minutos e misturada com um volume igual de agarose ultrapura a 2% (Thermo Scientific). A mistura foi vertida em bandejas de plástico e armazenada à temperatura ambiente até à solidificação. Dois µl de soro de murino foram carregados em cavidades de 1,0 mm de diâmetro. Os géis foram incubados por 4 horas a 37 °C em uma câmara úmida. A fluorescência do DNA dos géis foi registrada com um escâner de fluorescência.

### **Ensaio de degradação de NET in vitro**

[185] A degradação da NET foi analisada como descrito anteriormente (19). Os neutrófilos humanos purificados em DMEM sem soro foram semeados em placas estéreis de 96 poços (Falcon, BD Technologies, Alemanha) revestidas com polisissina 0,001% (Sigma) a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço. Para induzir a formação de NET, os neutrófilos foram ativados com 100 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) por 4 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade. Adicionamos solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenamos as placas de 96 poços durante a noite a 4 °C. As NETs foram lavadas com PBS, tratadas por 5 minutos com PBS contendo Triton X-100 a 0,5% e lavadas com PBS novamente. As NETs foram incubadas com soro de murino a 10% ou plasma humano com citrato a 10% suplementado com PPACK 10 µM (Santa Cruz, Heidelberg, Alemanha) em HBSS com cátions divalentes (HBSS +; Thermo Scientific). As NETs foram degradadas por 3 horas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade. Descartamos os sobrenadantes e interrompemos a degradação da NET adicionando PFA a 2% em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. O PFA foi descartado e as NETs não degradadas foram marcadas fluorescentemente pela adição de 2 µM do corante de DNA fluorescente SytoxGreen (Thermo Scientific) em PBS. As imagens de NETs coradas com fluorescência foram adquiridas com um microscópio de fluorescência invertida (Axiovert 200M, Zeiss, Alemanha). Quantificamos as NETs não degradadas registrando a intensidade da fluorescência com um leitor de placas (Excitação: 485 nm; Emissão: 535 nm) ou medindo a cobertura da área das NETs em imagens de microscopia usando o software ImageJ (NIH, EUA).

### **Preparação de vetores de expressão in vivo**

[186] Utilizamos o plasmídeo pLIVE (Mirus Bio, EUA) para expressar proteínas em camundongos. O vetor permite uma expressão duradoura e específica para hepatócitos de proteínas. Geramos plasmídeos pLIVE com *DNase1*, *DNase1l3*, e *CSF3* de murino. Para

*DNase1* de murino, foi realizado um PCR do cDNA (Número de Acesso Genbank NM010061) usando o par de iniciadores DNase1-F 5'- GTCGACATGCGGTACACAGG (SEQ ID NO: 27) e DNase1-R 5'- CTCGAGTCAGATTTTCTGAGTGTCA (SEQ ID NO: 28) ) contendo sítios de restrição SalI e XhoI. Para *DNase113*, foi realizado um PCR do cDNA (Número de Acesso ao Genbank AF047355) usando o par de iniciadores DNase113-F 5'-GAAGTCCCAGGAATTCAAAGATGT (SEQ ID NO: 29) e DNase113-R 5'-GCGTGATACCCGGGAGCGATTG (SEQ ID NO: 30) contendo sítios de restrição BamHI e SacI. Ambos os cDNAs foram clonados usando a ligase T4 (New England Biolabs, Alemanha) no sítio de multiclonagem (MCS) do vetor pLIVE, que foi pré-digerido com as enzimas apropriadas. O vector contendo pLIVE DNase113 foi submetido a mutagênese dirigida no sítio com o par de iniciadores mutDNase113-F 5'-AGTCGACTCCCGGCCACCATGTCCCTGCA (SEQ ID NO: 31) e a sua complementar mutDNase113-R 5'-TGCAGGGACATGGTGGCCGGGAGTCGACT (SEQ ID NO: 32) para coincidir com a sequência consenso de Kozak e otimizar a expressão de proteínas. A geração do vetor pLIVE contendo o cDNA de *CSF3* foi terceirizada (Eurofins Genomics, Alemanha). O cDNA de *CSF3* (Número de Acesso Genbank BC120761) foi inserido no MCS entre os sítios de restrição SalI e XhoI. A sequência de todos os vetores gerados foi confirmada por sequenciamento de DNA de fita dupla. Como controle, usamos o plasmídeo de pLIVE original sem inserções adicionais. Todos os plasmídeos foram purificados usando o kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep e as contaminações em potencial da endotoxina foram removidas usando colunas de rotação de remoção de endotoxina de alta capacidade (ambas da Thermo Scientific).

#### Expressão *in vitro* de DNase1 e DNase113 de murino

[187] Os plasmídeos contendo o cDNA da DNase1 ou DNase113, descritos em outra parte, foram transfectados para células do Rim Embrionário Humano (HEK) com Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) em condições livres de soro com meio DMEM (Thermo Scientific) suplementado com 10% de reposição de soro nocaute (Thermo Scientific ) Após 72 horas, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 500 xg por 10 minutos, filtrados estéreis e concentrados por ultracentrifugação com colunas 3K (Amicon Ultra, Millipore, Darmstadt, Alemanha).

#### Expressão genética *in vivo*

[188] Os plasmídeos pLIVE contendo *DNase1*, *DNase1l3*, *CSF3* ou plasmídeos de controle vazios foram administrados a camundongos por injeção hidrodinâmica de veias da cauda. Em resumo, 50 µg de plasmídeo foram diluídos em solução salina a 0,9% em um volume equivalente a 10% da massa corporal do camundongo. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano e a solução de plasmídeo foi então injetada intravenosamente por 5 a 8 segundos através da veia da cauda. Em casos raros, os camundongos não se recuperaram completamente da injeção nas primeiras 24 horas e esses animais foram excluídos do estudo. Para estudos de coexpressão, 50 µg do plasmídeo *CSF3* foram misturados com 50 µg do plasmídeo controle vazio, ou os plasmídeos contendo *DNase1* e *DNase1l3*. A solução contendo ambos os plasmídeos foi administrada por injeção hidrodinâmica das veias da cauda.

#### **Neutrofilia crônica**

[189] Camundongos fêmeas com 4 semanas ou 8 a 12 semanas de idade foram injetados com 50 µg do plasmídeo pLIVE contendo *CSF3* para induzir superexpressão de G-CSF e neutrofilia. Os camundongos foram monitorados a cada 8 horas durante a primeira semana após a injeção e diariamente depois. A temperatura foi medida na área perianal por um termômetro infravermelho sem contato (Etekcity, Alemanha). Para estudos de sobrevivência, os camundongos foram sacrificados e classificados como "não sobreviventes" se os animais apresentassem sinais de angústia (sem movimento espontâneo, olhos fechados, ofegantes ocasionais). Em todos os casos, esses sinais de angústia foram acompanhados de uma hipotermia grave e de rápido progresso, definida como diminuição da temperatura corporal de  $\geq 4$  °C em comparação com a temperatura corporal antes da injeção do plasmídeo e com hematúria. Os camundongos não hipotérmicos não mostraram sinais de angústia e foram sacrificados no final do experimento. Para coleta de órgãos, sangue e urina, analisamos quatro grupos de três camundongos D1/D1L3-/- . Os camundongos de cada grupo foram injetados com uma mistura de *CSF3* com plasma vazio, *DNase1*, ou *DNase1l3*. Cada grupo de camundongos foi sacrificado para a coleta de bioamostras, quando o primeiro animal do grupo mostrou sinais de angústia, hipotermia grave e hematúria. Este ponto no tempo foi definido como "exitus" e ocorreu dentro de 3 a 6 dias após a injeção.

#### **Redução de plaquetas**

[190] Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de 2 µg/g de anticorpo que esgota plaquetas ou anticorpo de controle de isotipo (ambos Emfret, Alemanha). Este

tratamento esgota > 95% das plaquetas da circulação. O tratamento foi iniciado 24 horas após a injeção de *CSF3* e repetido a cada 48 horas até a conclusão do experimento.

### **Inibição da trombina**

[191] O etexilato de dabigatrano em pó (Pradaxa, Boehringer Ingelheim, Alemanha) foi misturado com pó de ração normal (Altromin, Alemanha) na dose de 40 mg/g. As pastilhas foram preparadas misturando o pó com água destilada e deixadas secar à temperatura ambiente. A alimentação do dabigatrano foi iniciada 24 horas após a injeção do *CSF3*. Os camundongos WT alimentados com a dieta de dabigatrano por 1 dia mostraram um aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada em  $6,48 \pm 1,19$  vezes (Média  $\pm$  SD, N = 4) quando comparados aos camundongos que receberam ração normal sem dabigatrano (teste t de Student;  $P < 0,001$ ).

### **Preparação de bactérias para septicemia**

[192] *Escherichia coli* (XEN 14, Perkin Elmer) foi cultivada durante a noite em meio de caldo de lisogenia contendo 50 µg/ml de canamicina. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4000 xg por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em PBS. Aliquotas de  $1,5 \times 10^9$  bactérias/ml foram incubadas a 70 °C por 15 minutos para matar as bactérias pelo calor. As aliquotas foram armazenadas a -20 °C até uso posterior.

### **Septicemia**

[193] Camundongos machos de 8 a 15 semanas de idade receberam três injeções intraperitoneais diárias de 1 µg/g de LPS do sorotipo *thyphimurium* de *Salmonella enterica* (Sigma-Aldrich) em solução salina a 0,9%. Juntamente com a terceira injeção de LPS, os camundongos receberam uma injeção intravenosa de  $1,5 \times 10^7$  *E.coli*/g mortas pelo calor. O tempo de sobrevivência mostrado indica o tempo após a injeção de *E.coli*. Sangue e órgãos foram coletados no momento da eutanásia. Foram obtidas bioamostras insuficientes de dois animais (1x D1/D1L3-/- + *Ctrl*, 1x D1/D1L3-/- + *D1L3*) para realizar a análise completa mostrada na FIG. 4A-FIG 4I. Os camundongos foram sacrificados e classificados como "não sobreviventes" se os animais apresentassem sinais de sofrimento grave (irresponsividade ao toque). Todos os camundongos não sobreviventes apresentaram hematuria e palidez das extremidades. Todos os camundongos sobreviventes foram sacrificados e classificados como "sobreviventes" 24 horas após a injeção intravenosa de *E.coli* morta pelo calor.

### **Coleta de sangue, plasma e tecidos de murinos**

[194] O sangue foi coletado por punção submandibular ou pelo seio retro-orbital. O sangue foi coletado em tubos de soro de 200 µl (Monovette; Sarstedt, Alemanha) e tubos de EDTA de 200 µl (GK 150, KABE labortechnik, Alemanha). O plasma foi obtido coletando o sobrenadante de sangue após centrifugação a 3.000 x g por 15 minutos. O soro foi obtido deixando o sangue coagular por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação por 15 minutos a 3.000 x g. As amostras de soro e plasma foram armazenadas em alíquotas a -20 °C até uso posterior. Para análise de órgãos, os camundongos foram perfundidos por infusão intracardíaca de PBS. Os órgãos foram coletados e fixados por 24 horas em PFA a 4% a 4 °C. Os órgãos fixos foram embebidos em parafina.

#### **Análise de sangue e plasma**

[195] LDH, AST, ALT, creatinina e BUN no plasma foram quantificados usando kits padronizados (Biotron Diagnostics, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O G-CSF de camundongo foi quantificado com um Quantikine ELISA Kit (R&D, Reino Unido). A hemoglobina no sangue com EDTA foi quantificada por um hemocitômetro automatizado (Idexx ProCyte Dx Hematology Analyzer, Holanda). Para quantificar neutrófilos por FACS, o sangue total foi incubado em gelo por 15 minutos com 0,2 µg de CD11b anti-camundongo marcado com fitoeritrina (M1/70, Biolegend, Alemanha) e 0,5 µg de Ly6G anticamundongo Alexa Fluor 488 (1AB, Biolegend Alemanha). O sangue foi então diluído com 0,5 ml de PBS e analisado com um FACSCalibur (BD Bioscience, EUA). Esfregaços de sangue de sangue anticoagulado com EDTA foram preparados em lâminas revestidas com polilisina (Hecht Assistant, Alemanha). Após a secagem ao ar, foram incubados por 1 minuto em metanol suplementado com 1 µM SytoxGreen em gelo seco ou corados com Giemsa usando kit comercial (In Vitro Diagnostikum, Alemanha).

#### **Coloração por imunofluorescência**

[196] As seções embebidas em parafina foram depiladas, reidratadas e submetidas a recuperação de antígeno por 25 minutos a 100 °C em tampão de citrato (citrato de sódio 10 mM, Tween 0,1%, pH 6). Posteriormente, as seções foram bloqueadas durante 30 minutos com soro normal de cabra a 2,5% (Vector, Reino Unido) seguido de incubação com um kit de bloqueio camundongo em camundongo (Vector) durante uma hora. As seções foram então incubadas durante a noite a 4 °C com 2 µg/ml do anticorpo primário contra MPO (A0398, Agilent, Alemanha), CRAMP (PA-CRLP-100, Innovagen, Suécia), histona citrulinada 3 (ab5103, Abcam, Reino Unido), fibrina [clone 59D8] ou o complexo de histona

H2A, H2B e DNA para detectar cromatina (2). As seções foram incubadas com anticorpos IgG anti-coelho e anti-camundongo conjugados com AlexaFluor488 ou AlexaFluor555 (todos Thermo Scientific) durante 1 hora. Após a lavagem, o DNA foi marcado com 1 µg/ml de DAPI por 2 minutos. A autofluorescência foi extinta por uma incubação de 25 minutos com Sudan Black (0,1% em etanol a 70%) e as seções foram montadas com Fluoromount G (Southern Biotech, EUA). As imagens de seções marcadas com fluorescência foram adquiridas com um microscópio de fluorescência invertida (Axiovert 200M, Zeiss, Alemanha) ou um microscópio confocal (TCS SP5, Leica, Alemanha). As imagens dos coágulos de NET foram quantificadas usando o software (ImageJ). Uma área de coloração de vWF ou fibrina inferior a 3% dos coágulos de NET foi considerada negativa.

### **Imuno-histoquímica**

[197] Após a recuperação do antígeno, as seções desparafinizadas foram bloqueadas por 30 minutos com soro de cavalo normal a 2,5% (Vector). As seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com 2 µg/ml do anticorpo primário contra a elastase de neutrófilos (ab68672, Abcam). Após a lavagem, as seções foram coradas utilizando o kit IgG-AP anti-coelho (ImmPRESS, Vector) de acordo com as instruções do fabricante. As seções foram contrastadas com hemalum (Merck, Alemanha) e montadas com meios Neo-Mount (Merck). Imagens de cortes corados foram obtidas com um microscópio invertido (Axiovert 200M, Zeiss).

### **Geração de coágulos de NET in vitro**

[198] Os neutrófilos humanos purificados foram semeados em placas de cultura de tecidos a  $3 \times 10^7$  células/ml em DMEM suplementado com 2% de BSA. As células foram ativadas com 0,1 µM de PMA por 4 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> com condições de umidade e rotação (300 rpm). Utilizamos neutrófilos não estimulados e neutrófilos ativados com PMA na presença de 10 U/ml de DNaseI humana recombinante (dornase alfa, Roche, Alemanha) como controle. Os coágulos de NET foram fixados com PFA a 2% durante a noite a 4 °C. Os coágulos de NET fixados foram incorporados em parafina e as seções foram coradas para NETs como descrito anteriormente.

### **Avaliação estatística**

[199] Os dados são mostrados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando o Prism Software (GraphPad, EUA) e incluiu o teste t de Student, ANOVA

unidirecional e bidirecional, seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni e pelo teste Log-rank. Os resultados foram considerados significativos com  $P < 0,05$ .

### **Movies**

[200] A neutrofilia crônica é tolerada em camundongos do tipo selvagem. Um filme gerado mostra os camundongos do tipo selvagem uma semana após a injeção de um plasmídeo de expressão CSF3 (CSF3) ou um plasmídeo de controle sem CSF3 (Ctrl). Ambos os animais mostram comportamento normal e sem sinais de angústia.

[201] A neutrofilia crônica causa angústia em camundongos sem DNase1 e DNase113. O filme mostra camundongos DNase1/DNase113 -/- coexpressando CSF3 com um plasmídeo de controle (CSF3/Ctrl), com DNase1 (CSF3/D1) ou DNase113 (CSF3/D1L3). Os camundongos que expressam DNases, DNase1 ou DNase113 circulatórias mostram comportamento normal. Camundongos sem DNases circulatórias (CSF3/Ctrl) mostram sinais de angústia (sem movimento espontâneo, olhos fechados, ofegantes ocasionais).

### **Referências**

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, Acute and chronic inflammation. In Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. (Elsevier Health Sciences, 2009), cap. 2
2. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535 (2004).
3. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. 207, 1853-1862 (2010).
4. V. Thammavongsa, D. M. Missiakas, O. Schneewind, Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. 342, 863-866 (2013).
5. S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. 13, 463-469 (2007).
6. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 15880-15885 (2010).

7. A. Warnatsch, M. Ioannou, Q. Wang, V. Papayannopoulos, Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349, 316-320 (2015).
8. B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34-45 (2013).
9. S. K. Jorch, P. Kubes, An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 23, 279-287 (2017).
10. A. Hakkim, B.G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U.A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R.E. Voll, A. Zychlinsky. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9813-9818 (2010).
11. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhah, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase113). *FEBS J.* 276, 1059-1073 (2009).
12. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem. J.* 380, 929-937 (2004).
13. V. Sisirak, B. Sally, V. D'Agati, W. Martinez-Ortiz, Z. B. Ozcakar, J. David, A. Rashidfarrokhi, A. Yeste, C. Panea, A. S. Chida, M. Bogunovic, Ivanov, II, F. J. Quintana, I. Sanz, K. B. Elkon, M. Tekin, F. Yalcinkaya, T. J. Cardozo, R. M. Clancy, J. P. Buyon, B. Reizis, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* 166, 88-101 (2016).
14. M. Demers, D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, D. D. Wagner, Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13076-13081 (2012).
15. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231-241 (2007).
16. C. Frank, D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Muller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, G. Krause, HUS Investigation Team,

Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 1771-1780 (2011).

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

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

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

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

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

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

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

24. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 28, 313- 314 (2001).
25. M. Napirei, H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, T. Moroy, Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat. Genet.* 25, 177-181 (2000).
26. S. Gupta, M. J. Kaplan, The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 402-413 (2016).
27. R. Mizuta, S. Araki, M. Furukawa, Y. Furukawa, S. Ebara, D. Shiokawa, K. Hayashi, S. Tanuma, D. Kitamura, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PloS one* 8, e80223 (2013).
28. J. Rossaint, J. M. Herter, H. Van Aken, M. Napirei, Y. Doring, C. Weber, O. Soehnlein, A. Zarbock, Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood* 123, 2573-2584 (2014).
29. A. Bradley, K. Anastassiadis, A. Ayadi, J. F. Battey, C. Bell, M. C. Birling, J. Bottomley, S. D. Brown, A. Burger, C. J. Bult, W. Bushell, F. S. Collins, C. Desaintes, B. Doe, A. Economides, J. T. Eppig, R. H. Finnell, C. Fletcher, M. Fray, D. Friendewey, R. H. Friedel, F. G. Grosveld, J. Hansen, Y. Herault, G. Hicks, A. Horlein, R. Houghton, M. Hrabe de Angelis, D. Huylebroeck, V. Iyer, P. J. de Jong, J. A. Kadin, C. Kaloff, K. Kennedy, M. Koutsourakis, K. C. Lloyd, S. Marschall, J. Mason, C. McKerlie, M. P. McLeod, H. von Melchner, M. Moore, A. O. Mujica, A. Nagy, M. Nefedov, L. M. Nutter, G. Pavlovic, J. L. Peterson, J. Pollock, R. Ramirez- Solis, D. E. Rancourt, M. Raspa, J. E. Remacle, M. Ringwald, B. Rosen, N. Rosenthal, J. Rossant, P. Ruiz Noppinger, E. Ryder, J. Z. Schick, F. Schnutgen, P. Schofield, C. Seisenberger, M. Selloum, E. M. Simpson, W. C. Skarnes, D. Smedley, W. L. Stanford, A. F. Stewart, K. Stone, K. Swan, H. Tadepally, L. Teboul, G. P. Tocchini- Valentini, D. Valenzuela, A. P. West, K. Yamamura, Y. Yoshinaga, W. Wurst, The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm. Genome* 23, 580-586 (2012).

## **Exemplo 2: Desenvolvimento e uso de DNase1L3 e variantes para terapia**

### **Introdução**

[202] A inflamação descontrolada causa uma infinidade de condições (1). As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são filamentos de DNA decorados com proteínas

tóxicas (2). As NETs protegem contra infecções microbianas, mas a formação excessiva de NET desencadeia e exacerba doenças inflamatórias e autoimunes (3). A DNase1 (D1), uma enzima de degradação do DNA encontrada no sangue, tem sido amplamente utilizada para desarmar as NETs in vitro e in vivo. De fato, a infusão de D1 humano recombinante, um medicamento aprovado pela FDA (dornase alfa) para fibrose cística (CF), impede os efeitos patológicos das NETs em vários modelos de doenças (3), apoiando o uso de D1 para terapia profilática.

*O DNase1 tipo 3 é um novo candidato a medicamentos para doenças associadas à NET*

[203] No Exemplo 1, descobrimos que, além de D1, o DNase1 tipo 3 (D1L3) também degrada NETs. Ambas as enzimas mantêm a homeostase do sangue e do tecido durante as respostas inflamatórias. Em resumo, mostramos que as NETs são geradas dentro dos vasos sanguíneos durante a neutrofilia, uma característica da inflamação, tanto em condições estéreis quanto em infecciosas. D1 e D1L3 clivam as NETs e, assim, impedem a agregação de filamentos de DNA de NETs aos coágulos vasculares. Na ausência de D1 e D1L3, os coágulos de NETs obstruem o fluxo sanguíneo e causam danos aos órgãos e morte. Os coágulos de NET são formados independentemente de plaquetas ou fibrina e, portanto, são resistentes à terapia antitrombótica convencional. Assim, descobrimos coágulos de NETs como um novo mecanismo para oclusão vascular e D1L3, uma nova terapia profilática contra NETs (ver **Exemplo 1**).

[204] D1 e D1L3 pertencem, junto com DNase1 tipo 1 (D1L1) e DNase1 tipo 2 (D1L2), à família de proteínas DNase1 (4). D1 e D1L3 são expressos em uma variedade de espécies, incluindo humanos, primatas e roedores. D1 é expresso predominantemente no trato gastrointestinal e nas glândulas exócrinas (5), enquanto as células hematopoiéticas, nomeadamente macrófagos e células dendríticas, produzem D1L3 (6, 7). Encontramos ambas as DNases em baixas concentrações no soro de camundongos e humanos (Exemplo 1, **FIG. 14**), mas a origem de D1 e D1L3 na circulação é desconhecida (7, 8). D1 preferivelmente cliva DNA livre de proteínas (por exemplo, DNA bacteriano, DNA de plasmídeo), enquanto D1L3 tem como alvo a cromatina, o complexo de DNA e histonas, que é comumente encontrado no núcleo das células eucarióticas (7, 9, 10). A atividade de D1 é inibida por ligação à actina monomérica e sensível a concentrações fisiológicas de sal (11-13). Além disso, D1 é glicosilado em N40 (corresponde a N18 na enzima madura sem

peptídeo sinal) e N128 (N106), que torna a enzima resistente à inativação por proteases séricas (9). Ao contrário, o D1L3 não tem sítios de glicosilação e de ligação à actina, o que causa sua suscetibilidade a várias proteases e resistência à actina, respectivamente (9).

[205] O D1 foi descoberto pela primeira vez em fluidos corporais do trato gastrointestinal e na urina, participando da digestão do DNA da ingestão de alimentos. Observamos no decorrer desta divulgação que a DNase1 administrada sistemicamente (por exemplo, por injeção intraperitoneal ou intravenosa) tem uma meia-vida relativamente curta na circulação e é secretada de forma enzimaticamente ativa na urina e, inesperadamente, na bile. Sua secreção no fluido biliar abre a oportunidade de direcionar DNA extracelular e/ou NETs no duto biliar através da terapia com DNase1 sistêmica.

[206] O D1L3 foi descrito pela primeira vez no contexto da morte celular programada (14). O D1L3 possui dois sítios de localização nuclear (NLS1, NLS2). O NLS2 é incorporado a uma cauda do C-terminal exclusiva de D1L3 e não presente em D1. Ambos os NLS direcionam a enzima para o núcleo durante a apoptose (14). De fato, o D1L3 intracelular é necessário para a fragmentação do DNA nuclear dentro das células apoptóticas e necróticas *in vivo* (15). O D1L3 exige que a cauda do C-terminal degrade o DNA extracelular, ou seja, o DNA encapsulado em lipídeos, como o encontrado nas transfecções, e a cromatina nos corpos apoptóticos (7, 10). Em transfecções, cDNA e lipídeos catiônicos formam um complexo que penetra através da membrana plasmática das células alvo. D1L3 interfere nas transfecções e a cauda do C-terminal é crítica para esta função (10). Corpos apoptóticos, vesículas de lipídeo preenchidas com cromatina de células apoptóticas, são substratos fisiológicos de D1L3 (7). Aqui, a cauda do C-terminal permite que o D1L3 penetre através das membranas lipídicas dos corpos apoptóticos e degrade a carga da cromatina. É importante ressaltar que a cauda do C-terminal também é necessária para a degradação da cromatina extracelular livre de lipídeos por D1L3 (7). Acredita-se que a cauda do C-terminal seja crítica para as funções de D1L3 no espaço extracelular.

[207] Embora o hD1 esteja efetivamente direcionando NETs em modelos animais, principalmente camundongos, ele mostrou efeito terapêutico limitado ou inexistente em ensaios clínicos de CF (16) e enfisema (17), respectivamente. As NETs são formadas em CF (18), indicando que o hD1 do tipo selvagem não é ideal para direcionar as NETs em pacientes. Variantes hiperativas foram geradas para contornar as limitações terapêuticas de D1, mas sua fabricação clínica é desafiadora (12). Notavelmente, o NET-DNA contém

histonas e é estruturalmente organizado como cromatina (2). Assim, especulamos que a degradação eficiente da cromatina é necessária para uma terapia ideal contra as NETs.

[208] Uma terapia combinada de hD1 e ativador do plasminogênio tecidual (tPA, alteplase) de pacientes com enfisema foi descrita (17). Os dados estão de acordo com nossa hipótese, porque o tPA permite que D1 degrade a cromatina *in vitro* (19). A US 9.642.822, que é aqui incorporada por referência, divulga ainda terapia de combinação com tPA e D1 para direcionamento terapêutico de NETs (20). No entanto, o tratamento com tPA é comumente associado a um risco aumentado de sangramento devido à sua atividade fibrinolítica (17). O D1L3 pode fornecer uma estratégia mais segura para direcionar as NETs sem colocar os pacientes em risco de sangramento, mas uma terapia com a proteína D1L3 não foi explorada.

*Projeto de variantes de DNase1 e DNase1 tipo 3 por transferência de aminoácidos*

[209] Neste exemplo, geramos variantes de D1 e D1L3 que são projetadas para terapia contra cromatina extracelular (incluindo NETs). Para projetar variantes, hipotetizamos que a capacidade do D1L3 humano de degradar a cromatina é codificada por aminoácidos individuais e/ou sequências de aminoácidos, que estão ausentes no D1 humano. Além disso, especulamos que a transferência desses aminoácidos individuais e/ou uma sequência de aminoácidos do D1L3 humano para o D1 gera variantes D1 hiperativas com maior atividade de degradação da cromatina. Da mesma forma, propriedades enzimáticas (por exemplo, glicosilação) podem ser transferidas de D1 para D1L3. Para testar nossa hipótese, empregamos mutações convencionais de aminoácidos e desenvolvemos uma nova tecnologia de blocos de construção (BB) para projetar variantes de DNases da família da proteína DNase1.

[210] Para produzir variantes de D1 e D1L3, usamos sistemas de expressão *in vitro* [por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim embrionário humano (HEK), *Pichia pastoris*]. A atividade enzimática foi caracterizada usando a degradação do DNA de alto peso molecular (HMW) como uma leitura (**FIG. 16**). Escolhemos dois tipos de HMW-DNA: (a) DNA de fita dupla (dsDNA) que foi isolado de testículos de salmão. A degradação do HMW-dsDNA foi analisada por zimografia; (b) cromatina de núcleos purificados de células HEK293. Para analisar sua degradação, a HMW-cromatina foi primeiro incubada com as variantes de DNase, seguida pelo isolamento e visualização do

DNA por meio de eletroforese em gel de agarose (AGE). A degradação da cromatina foi detectada pelo DNA de baixo peso molecular (LMW). Nesta configuração, o D1 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) possui aproximadamente 100 vezes mais atividade para degradar dsDNA que o D1L3 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2), enquanto o D1L3 do tipo selvagem degrada a cromatina com aproximadamente 100 vezes mais eficiência que o D1 tipo selvagem (**FIG. 16**). Encontramos efeitos sinérgicos de D1 e D1L3 na cromatina de degradação, mas não no dsDNA. Se D1 e D1L3 forem misturados na razão de 10: 1 ou 1: 1, observamos um aumento da degradação da cromatina, em comparação com cada D1 ou D1L3 sozinho (**FIG. 16**). Assim, examinamos as variantes D1 e/ou D1L3, que mostram aumento da atividade de degradação da cromatina e/ou dsDNA.

[211] As variantes D1 e D1L3 selecionadas foram ainda testadas para degradar NETs intravasculares, usando um sistema de expressão *in vivo* para membros da família de proteínas D1. Ver PCT/EP2018/051444, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. O sistema é baseado em dois componentes, (a) um plasmídeo de expressão que permite a transfecção estável *in vivo* de hepatócitos com cDNA de D1, D1L3, e variantes dos mesmos em camundongos receptores, e (b) camundongos deficientes de *Dnase1*<sup>-/-</sup> *Dnase1l3*<sup>-/-</sup>, caracterizados pela ausência de atividade da DNase no soro. Em resumo, o cDNA das DNases candidatas é clonado no vetor de expressão hepática. A seguir, o vetor é coexpresso em camundongos deficientes de *Dnase1*<sup>-/-</sup> *Dnase1l3*<sup>-/-</sup> junto com o cDNA do *Csf3* de murino, que codifica o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). A expressão de *Csf3* induz neutrofilia com formação intravascular de NET concomitante, que por sua vez causa a agregação de NETs não digeridas nos vasos sanguíneos e a morte em camundongos *Dnase1*<sup>-/-</sup> *Dnase1l3*<sup>-/-</sup>. Para identificar os candidatos a medicamentos, examinamos D1, D1L3 e suas variantes que degradam eficientemente as NETs e, assim, impedem a morbidade e mortalidade neste modelo.

## Resultados

### *Projeto de variantes da DNase1 através de substituições convencionais de aminoácidos*

[212] Nossa hipótese central é que a capacidade do D1L3 humano de degradar a cromatina é mediada por aminoácidos que não estão presentes no D1. O alinhamento da sequência mostrou que 44% dos aminoácidos em D1 humano e D1L3 humano são idênticos

(**FIG. 17**). Mutamos exclusivamente apenas aminoácidos variáveis (56% de aminoácidos não compartilhados) para gerar variantes D1 e DL3.

[213] D1L3 é uma proteína catiônica com um ponto isoelétrico de 9,35, enquanto D1 e os outros membros são proteínas mais básicas. Especulamos, portanto, que a natureza catiônica de D1L3 permite à enzima degradar a cromatina. Através do alinhamento de sequência, identificamos 37 resíduos de arginina ou lisina nos aminoácidos variáveis, ausentes no D1 (**FIG. 17**). Esses resíduos de aminoácidos estão localizados nas posições de aminoácidos 29 (posição 9 com o peptídeo sinal), 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) em relação à SEQ ID NO: 2.

[214] Vinte e seis desses resíduos de arginina ou lisina adicionais em D1L3 correspondem às seguintes posições de aminoácidos em D1 (SEQ ID NO: 1): 31 (posição 9 com o peptídeo sinal), 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) e 280 (260). Além disso, D1L3 apresenta 3 sítios de inserções de resíduos de arginina ou lisina: R80, K226 e uma cauda C-terminal (após a posição de aminoácido 282 na SEQ ID NO: 2), que apresenta 3 resíduos de arginina e 6 de lisina.

[215] Nosso objetivo foi transferir os resíduos de arginina e lisina que fazem parte do corpo central de D1L3 para D1, introduzindo as seguintes mutações no D1 tipo selvagem (**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, e K280M com relação à SEQ ID NO:1, gerando 28 variantes de D1.

[216] Neste exemplo, conseguimos gerar variantes D1 que contêm 23 das 28 substituições de aminoácidos. Expressamos o cDNA dessas variantes D1 nas células HEK293 e analisamos a atividade de degradação do dsDNA e da cromatina nos sobrenadantes da cultura. Observamos que as seguintes modificações de aminoácidos aumentaram parcialmente a atividade de degradação da cromatina, enquanto não foram observadas grandes diferenças na degradação do dsDNA (**FIG. 19**): Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R,

D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R. Curiosamente, D1 de camundongo e rato (SEQ ID NO: 4), que compartilham 79% e 78% dos aminoácidos de D1 humano, respectivamente, apresentam várias das substituições de aminoácidos analisadas, incluindo Q31R, Q49K e Q79K (**FIG. 20**). A análise de sobrenadantes das células HEK293 que expressam D1 murino e D1 humano mostrou que o D1 murino tem uma atividade aumentada para degradar a cromatina, quando comparado ao D1 humano (**FIG. 21**). Injetamos camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>* com uma mistura de *Csf3* e D1 murino (*mDnase1*, SEQ ID NO: 3), D1 humano (*hDnase1*, SEQ ID NO: 1) ou um plasmídeo de controle vazio (*Ctrl*). Os camundongos que receberam o plasmídeo de controle morreram dentro de 7 dias, enquanto a expressão de D1 murino forneceu uma proteção completa por pelo menos 28 dias (**FIG. 21**). Inesperadamente, a expressão de D1 humano mostrou apenas uma proteção parcial da morte e mais da metade dos animais morreu dentro de 14 dias (**FIG. 21**), indicando que o D1 humano é menos eficiente na degradação de NETs intravasculares que o D1 murino. Agora, mutamos Q31R, Q49K, Q79R e W209R em D1 humano para gerar uma variante D1 tipo murino (SEQ ID NO: 5). Um total de seis mutações (Q31R, Q49K, Q79R, Q177K, W209R, G262K) foram feitas para gerar uma variante D1 do tipo rato (SEQ ID NO: 6). Ambas as variantes D1 do tipo roedor foram clonadas no vetor de expressão de hepatócitos e administradas juntamente com *Csf3* em camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>*. Observamos que a terapia genética com a variante do tipo murino e rato de D1 forneceu uma proteção completa contra oclusões vasculares mediadas por NET e morte (**FIG. 22**). É importante ressaltar que a expressão in vitro das variantes de D1 humano do tipo roedor mostrou uma atividade aumentada para degradar a cromatina (**FIG. 22**). Coletivamente, os dados ilustram que (a) D1 humano tem uma capacidade limitada de degradar NETs in vivo; (b) a transferência de múltiplos aminoácidos catiônicos de D1L3 humano para D1 humano gera variantes hiperativas.

[217] Várias tentativas foram feitas para gerar variantes hiperativas de D1 (6, 12, 13, 21-29). Encontramos 184 mutações, que alteraram 82 dos 282 aminoácidos de D1 humano de tipo selvagem (**FIG. 23**). O alinhamento de sequências de aminoácidos de D1 humano de tipo selvagem e D1L3 humano revelou três mutações de ganho de função em D1 humano que já estão presentes em D1L3 humano de tipo selvagem (**FIG. 23**): Q31R (corresponde a Q9R em D1 sem sinal peptídeo), T227K (T205K) e A136F (A114F). Enquanto as mutações Q31R e T227K podem alterar as propriedades de ligação ao DNA de hD1 e, portanto, causar

hiperatividade, o A136F confere resistência à inibição pela actina monomérica (21-24, 26, 29).

[218] Projetamos uma nova variante D1 que carrega a combinação de Q31R/T227K/A136F (SEQ ID NO: 7) e comparamos sua atividade enzimática a D1 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1), bem como às variantes D1 que transportam mutações únicas em Q31R, T227K, A136F ou uma mutação combinada em Q31R e T227K (SEQ ID NO: 8). Caracterizamos a atividade de degradação do dsDNA e da cromatina nos sobrenadantes da cultura de células HEK293 transfectadas. Não observamos grandes diferenças na atividade de degradação do dsDNA com variantes D1 portadoras de mutações únicas ou combinatórias de Q31R e T227K (**FIG. 24**). Curiosamente, a cromatina foi parcial e totalmente degradada em mutantes A136F e a mutação combinatória de Q31R/T227K/A136F, respectivamente (**FIG. 24**). Em seguida, testamos se a variante Q31R/T227K/A136F de D1 é capaz de impedir oclusões vasculares letais mediadas por NET em *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>*. Todos os camundongos que receberam um plasmídeo de controle sem DNases morreram, enquanto todos os camundongos que expressam a variante D1 (SEQ ID NO: 7) sobreviveram até o final do experimento sem mostrar sinais de angústia (**FIG. 24**). Utilizando proteínas purificadas, observamos que a substituição tripla de aminoácidos aumenta a atividade de degradação da cromatina em aproximadamente 10 a 20 vezes em comparação com o tipo selvagem D1, sem diferenças detectáveis na atividade de degradação do dsDNA (**FIG. 25**). Cromatina de núcleos e NETs contém actina (30, 31). Os dados sugerem que a degradação da cromatina pelas variantes D1 requer substituições de aminoácidos catiônicos, bem como mutações que conferem resistência à actina - duas características que estão presentes no D1L3 do tipo selvagem. Para corroborar ainda mais essa noção, geramos uma variante D1 que apresenta a combinação das mutações A164K e A136F (SEQ ID NO: 9). De fato, observamos um forte aumento na atividade de degradação da cromatina na variante D1 com ambas as mutações (**FIG. 26**), apoiando nossa hipótese.

#### *Desenvolvimento do projeto de blocos de construção dos membros da família da proteína DNase1*

[219] D1L3 apresenta três sítios que contêm aminoácidos adicionais: a cauda do C-terminal começando após Q282 (NH<sub>2</sub>-SSRAFTBSKKSVTLRKKTKSKRS-COOH) (SEQ ID NO: 33) e em dois sítios dentro da enzima em S79/R80 e em K226 (**FIG. 17**). Os 23 aminoácidos

da cauda C-terminal de D1L3 foram ligados ao C-terminal de D1 (10, 28). Observamos que a inserção de um resíduo de arginina na posição 226 da DNase1 (A226\_T227insK) gerou uma variante D1 com atividade enzimática reduzida para degradar dsDNA, enquanto esse efeito não foi observado com a substituição T227K (**FIG. 27**). Assim, a inserção de um resíduo K/R acarreta um risco de redução da função de D1. A inserção de um aminoácido carregado pode influenciar a estrutura da proteína local. Dado que D1 é uma enzima globular que compreende uma cadeia de aminoácidos [**FIG. 28**, (27)], é concebível que essa alteração sítio possa inativar toda a enzima. De fato, inúmeras mutações não conservativas ao longo da sequência de aminoácidos D1 inativam a enzima (12, 25, 26). Nossa hipótese foi de que a transferência de estruturas proteicas locais, implantando não apenas resíduos de arginina e lisina, mas também as sequências de aminoácidos vizinhas, reduz o risco de inativação. Pesquisamos dentro de D1 e D1L3 por aminoácidos conservados nas proximidades de A226\_T227insK que podem ser usados como âncoras para a inserção. Identificamos um motivo D223/T224/T225 e um T229 conservado em D1 como âncoras nos N-terminal e C-terminal, respectivamente (**FIG. 27**). Substituímos 3 aminoácidos dentro de D1 (ATP) por 4 aminoácidos, incluindo K226, de D1L3 (VKKS) em silico. A expressão do cDNA da nova variante D1 (A226\_P228delinsVKKS) nas células HEK239 revelou uma enzima funcionalmente ativa com uma atividade de degradação do dsDNA semelhante, quando comparada com D1 tipo selvagem (**FIG. 27**). Os dados sugerem que os aminoácidos variáveis entre os aminoácidos conservados são intercambiáveis entre D1 e D1L3.

[220] Concebemos uma tecnologia de blocos de construção para transferir propriedades enzimáticas de um membro da família das proteínas D1 para outro. As seguintes etapas cardinais caracterizam a tecnologia (**FIG. 29**):

- (1) Fornecer alinhamento proteína-proteína da DNase doadora e receptora
- (2) Identificar a sequência variável de aminoácidos ou de aminoácidos para transferência (bloco de construção)
- (3) Identificar aminoácidos conservados na DNase doadora e receptora que estão localizadas a montante e a jusante do bloco de construção (âncoras), respectivamente.
- (4) Substituir a codificação de cDNA pelo bloco de construção entre as âncoras C e N na DNase receptora, com cDNA entre as âncoras na DNase doadora.

(5) Sintetizar o cDNA da DNase quimérica, seguido pela expressão *in vitro/in vivo* em um organismo receptor que é preferivelmente deficiente em DNase doadora e receptora (por exemplo, células CHO ou camundongos *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>*).

*Projeto de variantes de DNase1 através da tecnologia de blocos de construção*

[221] Um alinhamento de várias espécies de D1 e D1L3 de humanos, camundongos, ratos e chimpanzés (**FIG. 30**) mostrou que as âncoras nos N- e C-terminais são conservadas entre essas espécies. Esses aminoácidos âncora ou sequências de aminoácidos ladeiam 62 blocos de aminoácidos variáveis e sequências de aminoácidos, que incluem a sequência de aminoácidos em D1 (ATP) e D1L3 (VKKS) das experiências mencionadas anteriormente como blocos de construção nº 49 (**FIG 31**).

[222] A transferência desses blocos de construção de D1L3 em D1 gera variantes D1 com as seguintes mutações (**FIG. 31**): 1M\_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA, L23\_A27delinsMRICS, I30\_T32delinsVRS, E35\_T36delinsES, M38\_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49\_S52delinsKVIK, Y54C, I56\_Q60delinsIILVM, V62\_R63delinsIK, S65\_K72delinsSNNRICPI, L74\_N76delinsMEK, Q79\_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88\_V89delinsVI, E91\_P92delinsSR, N96\_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107\_Q110delinsKEKL, A113\_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122\_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136\_I137delinsFV, R139W, F141\_F144delinsQSPH, E146\_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157\_A158delinsTT, G160\_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170\_D171delinsVE, L174T, Q177\_K179delinsKHR, G181\_L182delinsKA, D184\_L187delinsNFIF, R199\_Q202delinsPKKA, S204\_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221\_A222delinsQE, A226\_P228delinsVKKS, H230N, V238\_A239delinsLR, M241\_A246delinsQEIVSS, D250K, A252\_P254delinsNSV, N256D, A259\_A260delinsKA, G262K, S264\_L267delinsTEEE, Q269\_I271delinsLDV, Y275F, V279\_M280delinsFK e K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS.

[223] As seguintes variantes D1L3 são geradas, se os blocos de construção forem transferidos de D1 para D1L3 (**FIG. 31**): M1\_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21\_S25delinsLKIAA, V28\_S30delinsIQT, E33\_S34delinsET, Q36\_I45delinsMSNATLVSYI, K47\_K50delinsQILS, C52Y, I54\_M58delinsIALVQ, I60\_K61delinsVR,

S63\_I70delinsSHLTAVGK, M72\_K74delinsLDN, R77\_T84delinsQDAPDT, N86H, V88\_I89delinsVV, S91\_R92delinsEP, N96\_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107\_L110delinsRPDQ, V113\_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122\_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, I35F\_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\_V271delins QAI, F275Y, F279\_K280delinsVM e Q282\_S305delinsK.

[224] Em seguida, conceituamos uma abordagem sequencial para projetar variantes D1 com atividade D1L3 que começa com a transferência de vários blocos de construção adjacentes (grupos), continua com a transferência de blocos de construção individuais e termina com a transferência de aminoácidos individuais ou a combinação de múltiplos blocos de construção em novas enzimas quiméricas (**FIG. 32**). Essa abordagem reduz o número de quimeras D1-D1L3 na triagem inicial.

[225] Para testar nosso método, projetamos um total de 19 variantes de D1, compreendendo seja blocos de construção individuais ou conjuntos de aglomerados de blocos de construção de D1L3 (**FIG. 31**). Estas variantes de D1 apresentam as seguintes mutações de aminoácido:

1M\_S22delinsMSRELAPLLLLLSIHSALA,  
 L23\_A27delinsMRICS/I30\_T32delinsVRS/E35\_T36delinsES,  
 M38\_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49\_S52delinsKVIK/Y54C/I56\_Q60delinsIILVM,  
 V62\_R63delinsIK/S65\_K72delinsSNNRICPI/L74\_N76delinsMEK,  
 Q79\_T84delinsRNSRRGIT, H86N/V88\_V89delinsVI/E91\_P92delinsSR,  
 N96\_S97delinsNT/R101Q/L103A/V105L,  
 R107\_Q110delinsKEKL/A113\_S116delinsVKRS/Y118H/D120H,  
 G122\_N128delinsYQDGDA/T130S/N132S, A136\_I137delinsFV,  
 R139W/F141\_F144delinsQSPH/E146\_E149delinsAVKD/A151V/V153I/A157\_A158delinsTT/G160\_A162delinsETS/A164K, A168E/Y170\_D171delinsVE/L174T,  
 Q177\_K179delinsKHR/G181\_L182delinsKA/D184\_L187delinsNFIF,

R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE, A226\_P228delinsVKKS, H230N/V238\_A239delinsLR/M241\_A246delinsQEIVSS/D250K/A252\_P254delinsNSV, N256D/A259\_A260delinsKA/G262K/S264\_L267delinsTEEE/Q269\_I271delinsLDV, e Y275F/V279\_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS SVTLRKKTKSKRS.

[226] Em seguida, clonamos o cDNA em um vetor de expressão, que foi transfectado para células HEK293. A análise dos sobrenadantes celulares mostrou degradação do dsDNA para todas as amostras (**FIG. 33**). Além disso, observamos que a transferência de blocos de construção (BB) 11 (ver SEQ ID NO: 10), BB 12-14 (ver SEQ ID NO: 11), BB 26 (ver SEQ ID NO: 12), BB 41- 48 (ver SEQ ID NO: 13) e BB 49 (ver SEQ ID NO: 14) de D1L3 a D1 resultou em enzimas com maior atividade de degradação da cromatina. Todas essas enzimas quiméricas exibiram a mesma ou mais atividade para degradar substratos de dsDNA que D1 do tipo selvagem. Os blocos de construção 11 (RNSRRGI na SEQ ID NO: 2) e 49 (VKKS na SEQ ID NO: 2) de D1L3 contêm R80/R81 e K227, respectivamente, que não estão presentes em D1. O grupo D1L3-BB 41-48 (PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQE da SEQ ID NO: 2) apresenta 5 resíduos de arginina e lisina adicionais que o seu equivalente em D1 (RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA da SEQ ID NO: 1). Esses aminoácidos catiônicos adicionais podem ser responsáveis pela hiperatividade. Os blocos de construção de D1 12-14 e 26 contêm as sequências de aminoácidos H86 a R95 e A136 a V138 na SEQ ID NO: 1, que inclui resíduos de aminoácidos necessários para a ligação da actina inibidora de D1. Assim, a substituição dessas sequências de aminoácidos pelos respectivos blocos de construção de D1L3, que não interagem com a actina, provavelmente gera variantes de D1 resistentes à actina. Agora combinamos BB 11, 14, 26, 41-19 em uma nova variante D1 (SEQ ID NO: 15). Observamos que a combinação desses BBs de ganho de função aumentou a degradação da cromatina da variante D1 para níveis de D1L3 do tipo selvagem (**FIG. 33**). Assim, a tecnologia BB fornece um método robusto para gerar variantes D1 hiperativas.

#### *Projeto de variantes de DNase1 tipo 3 através da tecnologia de blocos de construção*

[227] O grupo BB 60 a 62 de D1L3 inclui o aminoácido de sua cauda C-terminal (**FIG. 33**). A cauda começa após L281 (**FIG. 34**) e compreende a sequência de aminoácidos QSSRAFTBSKKS SVTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 33), que inclui um NLS bipartido. D1L3 requer que a cauda C-terminal degrade o DNA nas vesículas de lipídeo, incluindo

reagentes de transfecção e corpos apoptóticos (7, 10, 28). Além disso, a cauda do C-terminal é necessária para a degradação da cromatina livre de lipídeos e células por D1L3 (7). Ambas as descobertas são baseadas em uma variante D1L3 que não possui os aminoácidos após o Q282 e, portanto, é inativa na degradação desses substratos. Wilbert et al. anexou a extensão C-terminal de D1L3 ao C-terminal de D1 e assim transferiu a capacidade de degradar o DNA dentro das vesículas de lipídeo para D1 (10, 28). Aqui, empregamos nossa tecnologia BB para transferir o C-terminal de D1L3 para D1 e vice-versa. Utilizamos o motivo S272/D273/H274 conservado, localizado na frente da folha beta do terminal em D1 (**FIG. 28**), como âncora em N e trocamos os blocos de construção do terminal 3 entre D1 e D1L3 (**FIG. 34**). Essa abordagem gerou uma variante D1 que apresenta a extensão C-terminal de D1L3 devido às mutações Y275F/V279\_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS (SEQ ID NO: 16) e uma variante D1L3 truncada devido às mutações F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK (SEQ ID NO: 17). Expressamos tanto as variantes quanto as enzimas do tipo selvagem nas células HEK293 e caracterizamos a atividade da DNase no sobrenadante. Inesperadamente, observamos que a variante D1 com o C-terminal de D1L3 não degradou a cromatina, enquanto a variante D1L3 sem o C-terminal da enzima do tipo selvagem ainda foi capaz de clivar a cromatina (**FIG. 34**). De fato, observamos um aumento da atividade de degradação da cromatina com essa variante D1L3. Para corroborar essa descoberta, testamos se a variante truncada de D1L3 in vivo e observamos que sua expressão protegida da mortalidade mediada por NET de camundongos neutrofílicos *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>* (**FIG. 34**). Em conclusão, a deleção do C-terminal inibe, mas aumenta a função de D1L3 para degradar a cromatina livre de lipídeos e livre de células.

[228] As proteases séricas, em particular a plasmina, degradam D1L3, mas não D1 (9). A sensibilidade do D1L3 à atividade da protease limitaria seu uso na prática clínica. As proteínas glicosiladas apresentam uma proteção aumentada contra as proteases (32). Usando análise de software, não foi possível identificar uma sequência de consenso conhecida para glicosilação em D1L3 humano e murino. A análise de software do D1 humano revelou 2 sítios de glicosilação, como observado tanto em silico quanto in vitro (9). Nossa hipótese foi de que as variantes glicosiladas de D1L3 podem aumentar a meia-vida na circulação devido a uma resistência melhorada às proteases séricas. Um sítio de glicosilação requer uma

sequência de consenso mínima de N-X-T/S. D1 contém dois sítios conhecidos de N-glicosilação, N40 (N18 sem peptídeo sinal) e N128 [(N106 sem peptídeo sinal, (9)]. Os aminoácidos dos sítios de glicosilação D1 N40-X-T42 e N128-X-T130 correspondem aos D38-X-N40 e A127-X-V129 em D1L3. Assim, uma versão glicosilada de D1L3 precisa apresentar as mutações de aminoácidos D38N, N40T, A127N e V129T (ver SEQ ID NO: 18). Em vez de usar mutações pontuais convencionais para inserir essas substituições de aminoácidos, usamos a tecnologia BB para transferir os sítios de glicosilação de D1 N40-X-T42, que ficam dentro de BB4 (MSNATLVSY na SEQ ID NO: 1) e N128-X-T130, que se encontra no grupo BB 23-25 (GCEPCGNDTFN na SEQ ID NO: 1), de D1 a D1L3 (**FIG. 35**). Assim, geramos duas novas variantes de D1L3, que apresentam as mutações Q36\_I45delinsMSNATLVSYI (SEQ ID NO: 19) e Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N (SEQ ID NO: 20), respectivamente. Expressamos essas variantes de D1L3 juntamente com a enzima WT nas células HEK293. Em seguida, analisamos o sobrenadante por Western Blot usando um anticorpo policlonal direcionado a um epítipo na cauda C-terminal da enzima WT para detectar a enzima WT, bem como as variantes de D1L3. Como esperado, as variantes de D1L3 mostraram bandas de maior peso molecular presumivelmente à glicosilação, quando comparadas à enzima WT (**FIG. 35**). A variante de D1L3 com glicosilação em N40 ou N128 reteve sua atividade de degradação da cromatina (**FIG. 35**). Em conclusão, os dados sugerem que a tecnologia BB pode ser usada para transferir os sítios de glicosilação de D1 para D1L3, o que pode gerar variantes de D1L3 com maior resistência e meia-vida da protease em pacientes.

#### *Terapia com DNase1 tipo 3 e uma variante do mesmo*

[229] Finalmente, testamos os efeitos terapêuticos de D1L3 in vivo. A análise histológica de coágulos vasculares de NETs mostra agregados densos de cromatina (**FIG. 36A**), indicando que os sítios de clivagem sem histona para D1 são raros in vivo. Assim, levantamos a hipótese de que uma terapia aguda com D1L3 do tipo selvagem é mais eficaz na degradação de NETs intravasculares que D1 do tipo selvagem. Para testar nossa hipótese, expressamos *Csf3* em camundongos com deficiência *Dnase1<sup>-/-</sup>Dnase1l3<sup>-/-</sup>* para induzir coágulos vasculares de NETs. É importante ressaltar que, antes do exitus, os camundongos com oclusão vascular por NETs desenvolvem hematúria e hipotermia, que podem ser detectadas de forma não invasiva. Portanto, o modelo animal permite identificar e, portanto,

selecionar camundongos, que formaram NETs, para testar candidatos a medicamentos para uma terapia aguda contra NETs (**FIG. 36B**). Aqui, testamos o D1 humano purificado do tipo selvagem (dornase alfa; SEQ ID NO: 1), o D1L3 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2) e uma variante hiperativa do D1L3 [D1L3<sup>V</sup>; (SEQ ID NO: 17)] para uma terapia aguda contra NETs. Injetamos *Csf3* em camundongos com deficiência de *Dnase1*<sup>-/-</sup>*Dnase1l3*<sup>-/-</sup>. Após 72 horas, os primeiros animais individuais começaram a desenvolver hipotermia e hematúria. Utilizamos uma queda na temperatura corporal de 4 °C ou mais e a presença de urina vermelha como critério de inclusão. Os camundongos, que desenvolveram esses fenótipos, foram randomizados nos diferentes grupos de tratamento. Os animais receberam uma dose única, injeção intravenosa através da veia da cauda de 1 mg/kg de D1, D1L3 ou veículo. Após 30 minutos, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de bioamostras (sangue e órgãos). A quantificação de coágulos de NETs na vasculatura dos pulmões mostrou que NETs ocluíam vasos sanguíneos em camundongos que receberam terapia com veículo ou D1 (**FIG. 36D**). É importante ressaltar que os camundongos injetados com D1L3 e D1L3<sup>V</sup> mostraram pouco ou nenhum coágulo de NETs (**FIG. 36D**). Em pacientes, o DNA circulante tem o tamanho do DNA em mono-nucleossomos [180 pares de bases (33)], indicando que é um produto de degradação do DNA de alto peso molecular na cromatina. O DNA circulante é comumente usado como marcador substituto da formação intravascular de NET, mas também pode derivar de tecido necrótico e danificado (34). Quantificamos o DNA no soro usando uma sonda de DNA fluorescente. Observamos que a injeção de D1L3 e D1L3<sup>V</sup>, mas não D1 ou veículo, causou um forte aumento nos níveis de DNA circulante (**FIG. 36E**). O isolamento e a visualização do DNA circulante mostraram fragmentos de 180 pares de bases de múltímeros, indicando a presença de mono- e oligo-nucleossomos no soro de camundongos que receberam a terapia com D1L3 (**FIG. 36F**). Os camundongos que recebem D1L3<sup>V</sup> mostraram somente mono- e di-nucleossomos. Os dados confirmam a hiperatividade do D1L3<sup>V</sup> in vivo. Os isolados de DNA do soro de camundongos que receberam terapia D1 mostraram leves manchas de DNA de vários tamanhos, enquanto nenhum DNA pôde ser isolado do soro de camundongos injetados com veículo (**FIG. 36F**). Assim, o D1L3 pode ser utilizado não apenas na profilaxia, mas também na terapia aguda de doenças associadas a NETs.

[230] Exploramos ainda a aplicação terapêutica de D1L3<sup>V</sup> em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão (**FIG. 37A**). Em resumo, um testículo de ratos machos do tipo selvagem

foi submetido a torção testicular, conforme descrito anteriormente por nós (35). O procedimento causa uma lesão no tecido isquêmico. Após a randomização e destorção do testículo, os ratos receberam três injeções diárias de veículo dornase alfa (D1, 1mg/kg) ou uma variante DNase1L3 purificada (SEQ ID NO: 17, D1L3<sup>V</sup>, 1mg/kg). Após 7 dias, o testículo isquêmico e o testículo não tratado foram coletados. A terapia com o D1L3<sup>V</sup>, mas não com solução salina ou D1, reduziu significativamente a atrofia testicular (**FIG. 37B**). Além disso, a terapia com o D1L3<sup>V</sup>, mas não com solução salina ou D1, reduziu substancialmente a lesão no tecido e a maioria dos animais não apresenta sinais de lesão (**FIG. 37C**). Coletivamente, os dados identificam D1L3 como uma terapia potente contra lesão de isquemia-reperfusão.

*Desenvolvimento de medicamentos de variantes DNase1, DNase1 tipo 3 e variantes*

[231] Quase 70% de todas as terapêuticas proteicas são produzidas usando o Ovário de Hamster Chinês (CHO) (36). De fato, a DNase1 do tipo selvagem (dornase alfa) é produzida nas células CHO. Apesar das vantagens significativas, o desenvolvimento da linha celular e a produção em larga escala de CHO ainda permanece um grande desafio devido a um grau considerável de variabilidade e a inexistência de métodos confiáveis para prever ou modelar as características do crescimento celular (36). É importante ressaltar que as células CHO não foram capazes de produzir de forma estável variantes hiperativas de D1, o que impediu sua fabricação clínica (12). As propriedades de fabricação do D1L3 são desconhecidas. Assim, desenvolvemos linhas celulares CHO estáveis produzindo D1 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1), uma variante D1 hiperativa (SEQ ID NO: 7), D1L3 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2) e uma variante D1L3 hiperativa (SEQ ID NO: 17). Cultivamos as linhas celulares em biorreatores e observamos uma expressão estável de proteína com o tipo selvagem D1 e a variante de D1, com a última tendo níveis de expressão fortemente aumentados (**FIG. 38**), ilustrando a viabilidade de produzir uma variante de D1 hiperativa em CHO. Inesperadamente, observamos apenas níveis menores de proteína de D1L3 tipo selvagem e da variante de D1L3 (**FIG. 38**), apontando para um grande desafio para a fabricação clínica de D1L3 e suas variantes.

[232] Devido à alta densidade celular em biorreatores em larga escala, as células competem por recursos e sofrem tensão celular, levando ao aumento da morte celular, chamado apoptose, um programa de morte celular usado por organismos multicelulares, incluindo

mamíferos (37). D1L3 tem como alvo o DNA em corpos apoptóticos (7). Especulamos que os baixos níveis de D1L3 são devidos à eliminação da enzima por essas vesículas apoptóticas. Para superar essas limitações, testamos a produção de D1, D1L3 e suas variantes usando o sistema de expressão microbiana *Pichia pastoris*, um organismo estabelecido, aprovado pela FDA e organismo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) com capacidade de secretar proteínas (38, 39). Uma limitação importante dessa abordagem é que as proteínas produzidas por *P. pastoris* geralmente são hiperglicosiladas e podem resultar em maior imunogenicidade (40). A composição de D1L3 e sua variante não é glicosilada e é ideal para expressão em *P. pastoris*. Mutamos os sítios de glicosilação em D1 e sua variante em N40S e N128S, respectivamente, para gerar proteínas desglicosiladas (SEQ ID NO: 21, 23). A expressão de proteínas em *P. pastoris* é geralmente alcançada acoplando proteínas de interesse a peptídeos sinal secretores de várias origens. Omitimos essa etapa para evitar a geração de proteínas quiméricas imunogênicas. Especulamos que o peptídeo sinal nativo de D1 e/ou D1L3 seja reconhecido por *P. pastoris*. Depois da otimização do códon, expressamos o cDNA em *P. pastoris* (SEQ ID NO: 22, 24-26). Atingimos a expressão de D1 e a variante D1 (não mostrada). É importante ressaltar que essa abordagem também permitiu a expressão de D1L3 e a variante de D1L3, com a última mostrando níveis de expressão aumentados (**FIG. 38**). Purificamos as proteínas e confirmamos que o D1L3 tem atividade aumentada (**FIG. 38**). Em conclusão, os dados sugerem que o uso de sistemas de expressão não mamíferos, como *P. pastoris*, permite a fabricação clínica de D1L3 e suas variantes.

## Discussão

[233] Duas enzimas de degradação de DNA foram amplamente utilizadas terapeuticamente em modelos e pacientes experimentais. A estreptodornase, uma DNase secretada de *Streptococcus spp.*, foi testada em modelos de doenças de homoenxerto de pele, coágulos de bexiga, desbridamento de feridas, meningite. A DNase1 (incluindo a DNase1 pancreática) foi utilizada terapeuticamente em modelos experimentais de câncer, fibrose cística, lúpus, trombose, acidente vascular cerebral, sepse, lesão pulmonar, aterosclerose, infecção viral, doença falciforme, infarto do miocárdio, infecção no ouvido, cicatrização de feridas, lesão hepática, endocardite, infecção hepática, pancreatite, disfunção primária do enxerto, reperfusão de isquemia e membros, lesão renal, coagulação sanguínea, asma,

inflamação induzida por alume, lesão hepatorenal. A estreptodornase também foi usada para tratar pacientes com exsudações pleurais, hemotórax, coágulos sanguíneos intrabiliários, anemia pós-pneumática, úlceras, condições otorrinolaringológicas, infecções orais, lesões menores, sinusite, rinoplastias pós-operatórias, infertilidade, cateter da bexiga, limpeza de feridas, teste de reação da pele. É importante ressaltar que a DNaseI foi testada terapêuticamente em pacientes com meningite pneumocócica, gota, úlcera de perna, fibrose cística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquite crônica, bronquiectasia, lúpus, discinesia ciliar primária, bronquiolite, empiema, infecções pleurais, câncer, seca doença ocular, infecções do trato respiratório inferior, hematomas crônicos, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva. Neste exemplo, identificamos D1L3, suas variantes, bem como variantes de D1 como novos candidatos a uma terapia com DNase (FIG. 39).

## Métodos

### *Detecção de atividade de degradação da cromatina*

[234] Para medir a atividade de degradação da cromatina, misturamos amostras com núcleos isolados de HEK293 (1.500.000 - 3.000.000 por reação), Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl e inibidores de protease. Após incubar as amostras por 1 hora a 37 °C, elas foram aquecidas a 65 °C por 10 minutos. Prosseguimos com o isolamento do DNA usando o Mini Kit QIAamp DNA Blood (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O eluente foi então carregado sobre um gel de agarose e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel. A fluorescência do DNA dos géis foi registrada com um escâner de fluorescência.

[235] Métodos adicionais são descritos no Exemplo 1.

## Referências

1. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. C. Aster, in *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. (Elsevier Health Sciences, 2009), cap. 2.
2. V. Brinkmann *et al.*, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1532-1535 (2004).

3. T. A. Fuchs, A. Hakkim, C. F. Urban, in *Inflammation: Fundamental Mechanisms*, K. Ley, Ed. (World Scientific, 2018), cap. 6
4. D. Shiokawa, S. Tanuma, Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* **40**, 143-152 (2001).
5. M. Napirei, A. Ricken, D. Eulitz, H. Knoop, H. G. Mannherz, Expression pattern of the deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse. *Biochem J* **380**, 929-937 (2004).
6. W. F. Baron *et al.*, Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. *Gene* **215**, 291-301 (1998).
7. V. Sisirak *et al.*, Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* **166**, 88-101 (2016).
8. M. Jimenez-Alcazar *et al.*, Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **13**, 732-742 (2015).
9. M. Napirei, S. Ludwig, J. Mezrhab, T. Klockl, H. G. Mannherz, Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). *FEBS J* **276**, 1059-1073 (2009).
10. A. Wilber, M. Lu, M. C. Schneider, Deoxyribonuclease I-like III is an inducible macrophage barrier to liposomal transfection. *Mol Ther* **6**, 35-42 (2002).
11. W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, K. C. Holmes, Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44 (1990).
12. C. Lam *et al.*, Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt- and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells. *Biotechnol Prog* **33**, 523-533 (2017).
13. C. Q. Pan *et al.*, Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *J. Biol Chem* **273**, 18374-18381 (1998).
14. D. Shiokawa, Y. Shika, S. Tanuma, Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. *Biochem J* **376**, 377-381 (2003).
15. R. Mizuta *et al.*, DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* **8**, e80223 (2013).

16. H. J. Fuchs *et al.*, Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N. Engl J. Med.* **331**, 637-642 (1994).
17. N. M. Rahman *et al.*, Intrapleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection. *N Engl J Med* **365**, 518-526 (2011).
18. V. Papayannopoulos, D. Staab, A. Zychlinsky, Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One* **6**, e28526 (2011).
19. M. Napirei, S. Wulf, H. G. Mannherz, Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* **50**, 1873-1883 (2004).
20. D. D. Wagner *et al.* (Children's Medical Center Corporation, Boston, MA (EUA), Estados Unidos, 2017), vol. US 9.642.822 B2.
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.
24. C. Q. Pan, R. A. Lazarus, Hyperactivity of human DNase I variants. Dependence on the number of positively charged residues and concentration, length, and environment of DNA. *J. Biol Chem* **273**, 11701-11708 (1998).
25. C. Q. Pan, D. V. Sinicropi, R. A. Lazarus, Engineered properties and assays for human DNase I mutants. *Methods Mol Biol* **160**, 309-321 (2001).
26. C. Q. Pan, J. S. Ulmer, A. Herzka, R. A. Lazarus, Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* **7**, 628-636 (1998).
27. G. Parsiegla, C. Noguere, L. Santell, R. A. Lazarus, Y. Bourne, The structure of human DNase I bound to magnesium and phosphate ions points to a catalytic mechanism common to members of the DNase I-like superfamily. *Biochemistry* **51**, 10250-10258 (2012).
28. M. C. Schneider, A. Wilber. (Estados Unidos, 2004), vol. US 2004/0138156.

29. J. S. Ulmer *et al.*, Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8225-8229 (1996).
30. B. T. Bettinger, D. M. Gilbert, D. C. Amberg, Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 410-415 (2004).
31. C. F. Urban *et al.*, Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000639 (2009).
32. D. Russell, N. J. Oldham, B. G. Davis, Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydr Res* **344**, 1508-1514 (2009).
33. T. A. Fuchs, J. A. Kremer Hovinga, D. Schatzberg, D. D. Wagner, B. Lammle, Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **120**, 1157-1164 (2012).
34. M. Jimenez-Alcazar, N. Kim, T. A. Fuchs, Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost* **43**, 553-561 (2017).
35. M. Boettcher *et al.*, Degradation of Extracellular DNA by DNase1 Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urology* **109**, 223 e221-223 e227 (2017).
36. A. D. Bandaranayake, S. C. Almo, Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters* **588**, 253-260 (2014).
37. Y. K. Han, Y. G. Kim, J. Y. Kim, G. M. Lee, Hyperosmotic stress induces autophagy and apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering* **105**, 1187-1192 (2010).
38. J. L. Cereghino, J. M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* **24**, 45-66 (2000).
39. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 5301-5317 (2014).
40. R. Daly, M. T. Hearn, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR* **18**, 119-138 (2005).

### Sequências de DNases do tipo selvagem

**SEQ ID NO: 1**

DNase1 humana (P24855), sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYI  
 ALVQEVDRDShLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
 VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEI  
 DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
 SADTTATPTHCAyDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
 PVEVMLK

**SEQ ID NO: 2**

DNase1L3 humana (Q13609), sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELAPLLLLLLLSIHSALAMRICSFNVR SFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILV  
 MEIKDSNNRICPILMEKLN RNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFlyKEKLVSV  
 KRSYHYHDYQDGDADVFSREP FVWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELV  
 EVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYV PKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDT  
 TVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSV FDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEF  
 KLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

**SEQ ID NO: 3**

DNase1 murino (P49183): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRYTGLMGTLTLVNLLQLAGTLRIA AFNIRTFGETKMSNATLSVYFVKILSRDYI  
 AVIQEVDRDShLVAVGKLLDELNRDKPDTYRYVVSEPLGRKSYKEQYLFVYRPDQ  
 VSILDSYQYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVQEFAIVPLHAAPTEAVSEIDA  
 LYDVYLDVWQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSAD  
 TTVTSTHCAyDRIVVAGALLQAAVVPNSAVP FDFQAEYGLSNQLAEAI SDHYPVE  
 VTLRKI

**SEQ ID NO: 4**

DNase1 de rato (P21704), sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRYTGLMGILLTLVNLLQLAATLRIAAFNIRTFGDTKMSNATLSSYIVKILSRDYIA  
VVQEVRDTHLVAVGKLLDELNRDIPDNYRYIISEPLGRKSYKEQYLFVYRPSQVSV  
LDSYHYDDGCEPCGNDTFSREPAIVKFFSPYTEVREFAIVPLHSAPTEAVSEIDALY  
DVYLDVRQKWGLEDIMFMGDFNAGCSYVTSSQWSSIRLRTSPIFQWLIPDSADTT  
ATSTHCAYDRIVVAGALLQAAVVPSSAVPFDQAEYRLTNQMAEAISDHYPVEVT  
LRKT

#### SEQ ID NO: 34

DNase1L3 murino (O55070): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSLHPASPRLASLLLFILALHDTLALRRLCSFNVRSFSGASKKENHEAMDIIVKIIKRC  
DLILLMEIKDSSNNICPMLMEKLNNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKE  
KLVSVKTKYHYHDYQDGD TDVFSREPFVWVWFHSPFTA VKDFVIVPLHTTPETSVK  
EIDELVDVYTDVRSQWK TENFIFMGDFNAGCSYV PPKAWQNIRLRTDPKFVWLIG  
DQEDTTVKKSTSCAYDRIVLCGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYDLSEEEALDVSDH  
FPVEFKLQSSRAFTNNRKS VSLKKRKKGNRS

#### SEQ ID NO: 35

DNase1L3 de rato (O89107): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSLYPASPYLASLLLFILALHGALSRLCSFNVRSFSGESKKENHNAMDIIVKIIKRC  
DLILLMEIKDSNNNICPMLMEKLNNGNSRRSTTYNYVISSRLGRNTYKEQYAFVYKE  
KLVSVKAKYLYHDYQDGD TDVFSREPFVWVWFQAPFTA AKDFVIVPLHTTPETSVK  
EIDELADVYTDVRRRWKAENFIFMGDFNAGCSYV PPKAWKNIRLRTDPNFVWLIG  
DQEDTTVKKSTSCAYDRIVLRGQEIVNSV VPRSSGVDFDQKAYELSEEEALDVSDH  
FPVEFKLQSSRAFTNSRKS VSLKKKKKGSRS

#### SEQ ID NO: 36

DNase1 do chimpanzé (H2QAH1): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRSMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDI  
ALVQEVDRDHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEI  
DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPAFAQWLIPD  
SADTTATPTHCAVDRIVVAGMLLQGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
PVEVMLK

**SEQ ID NO: 37**

DNase1L3 do chimpanzé (H2QMU7): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELTPLLLLLSIHSTLALRICSFNVRSGESKQEDQNAMDVIVKVIKRCDIILVM  
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKR  
SYHYHDYQDGDADVFSREPFVWFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEV  
YTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTV  
KKSTNCAYDRIVLRGQEI VSSVPPKSNSVDFDQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKL  
QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

**SEQ ID NO: 38**

DNase1 tipo 1 humano (NM\_006730): Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVL  
QEVVDSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVL  
SSYVYNDEDDVFAREPFVAQFSLPSNVLP SLVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLE  
VSQHWQSKDVILLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRAS  
T HCTYDRVVLHGERCRSL LHTAAAFDFPTS FQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAH  
SVQPLSLTVLLLLSLLSPQLCPAA

**SEQ ID NO: 39**

**DNase1 tipo 2 humano (NM\_001374):** Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLA  
LVQEVDPDLASVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYL FVYRKDAVS  
VVDTYLYPDPELVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIP  
LHAAPHQAVAEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIR  
LRSSEVFKWLIPDSADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRSLKPQSATVHDFQEEFGL  
DQTQALAI SDHFPVEVTLKFHR

### **Cauda C-terminal da DNase1L3 humano**

#### **SEQ ID NO: 33**

Sequência de aminoácidos:

SSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

### **Sequências de variantes da DNase1**

#### **SEQ ID NO: 5**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDYI  
ALVQEVDRDHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYL FVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAE  
DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPD  
SADTTATPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
PVEVMLK

#### **SEQ ID NO: 6**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVKILSRDYI  
ALVQEVDRDHLTAVGKLLDNLNRDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYL FVYRPDQ

VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEI  
DALYDVYLDVKEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLRTSPTFQWLIPD  
SADTTATPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYKLSQDLAQAI SDHY  
PVEVMLK

**SEQ ID NO: 7**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEI  
ALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDS  
ADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
VEVMLK

**SEQ ID NO: 8**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEI  
DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
SADTTAKPTHCAVDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
PVEVMLK

**SEQ ID NO:9**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRDYI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVKEID  
ALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDS

ADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYP  
VEVMLK

**SEQ ID NO: 10**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPD  
QVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAE  
IDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIP  
DSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDH  
YPVEVMLK

**SEQ ID NO: 11**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAEI  
DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
SADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
PVEVMLK

**SEQ ID NO: 12**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAEI  
DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
SADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHY  
PVEVMLK

**SEQ ID NO: 13**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRydi  
 ALVQEVrDShLTAVGKLLDNLNqDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
 VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAEI  
 DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWLIG  
 DQEDTTATPTHCAyDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDH  
 YPVEVMLK

**SEQ ID NO: 14**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRydi  
 ALVQEVrDShLTAVGKLLDNLNqDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
 VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAEI  
 DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
 SADTTVKKSTHCAyDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDH  
 YPVEVMLK

**SEQ ID NO: 15**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRydi  
 ALVQEVrDShLTAVGKLLDNLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNSYKERYLFVYRPD  
 QVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPFFVVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAE  
 IDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVPPKAWKNIRLRTDPRFVWL  
 IGDQEDTTVKKSTHCAyDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI  
 SDHYPVEVMLK

**SEQ ID NO: 16**

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRydi  
 ALVQEVDRDShLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
 VSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDVAEI  
 DALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPD  
 SADTTATPTHCAyDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQaISDHF  
 PVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

### Sequências de variantes de DNase1L3

#### SEQ ID NO: 17

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELAPLLLLLLLSIHsALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCdIILV  
 MEIKDSNNRICPILMEKLNrNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFlyKEKLVSv  
 KRSYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELV  
 EVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKA WKNIrLRDPRFVWLIGDQEDT  
 TVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDHYPVEV  
 MLK

#### SEQ ID NO: 18

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELAPLLLLLLLSIHsALAMRICSFNVRSFGESKQENKTAMDVIVKVIKRCdIILV  
 MEIKDSNNRICPILMEKLNrNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFlyKEKLVSv  
 KRSYHYHDYQDGDNDTFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELV  
 EVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKA WKNIrLRDPRFVWLIGDQEDT  
 TVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSNSVDFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEF  
 KLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

#### SEQ ID NO: 19

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKMSNATLVSYIVKVIKRCDIILVM  
EIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKR  
SYHYHDYQDGDADVFSREPFVWVFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDELVEV  
YTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNI RLRTDPRFVWLIGDQEDTTV  
KKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKL  
QSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

#### SEQ ID NO: 20

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILV  
MEIKDSNNRICPILMEKLNRRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSV  
KRSYHYHDGCEPCGNDTFNREPFVWVFQSPHTAVKDFVIPLHTTPETSVKEIDEL  
VEVYTDVKHRWKAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNI RLRTDPRFVWLIGDQED  
TTVKKSTNCAYDRIVLRGQEIVSSVVPKSN SVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVE  
FKLQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS

#### Sequências usadas em *Pichia pastoris*

#### SEQ ID NO: 21

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

M RGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIQTTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDYI  
ALVQEV RDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
VSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEID  
ALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDS  
ADTTATPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYP  
VEVMLK

#### SEQ ID NO: 22

cDNA otimizado para códon de SEQ ID NO: 21 (**códon de partida**, peptídeo de sinal):

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAA  
GGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTCAAACCTTTGGCGAGACT  
 AAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTTCAGATCCTTTCTCGTTAC  
 GACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCCTTGACTGCCGTCGGTAA  
 GCTGCTAGACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTA  
 GTGAGCCTCTCGGTAGAACTCCTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGT  
 CCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCT  
 TGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCAGCTATCGTTAGATTTTTCTCCAGA  
 TTCACCGAGGTCAGAGAGTTCGCCATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGA  
 TGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTGGACGTTTCAGGAAA  
 AATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCT  
 TACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTT  
 CAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCACTCCCCTCATTGTGCA  
 TATGACAGAATTGTTGTCGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGAT  
 TCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCT  
 CAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

### SEQ ID NO: 23

Sequência de aminoácidos (peptídeo de sinal; proteína madura):

MRGMKLLGALLALAALLQGAVSLKIAAFNIRTFGETKMSSATLVSYIVQILSRDYDI  
 ALVQEVDRDShLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQ  
 VSAVDSYYYDDGCEPCGSDTFNREPFIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEID  
 ALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDS  
 ADTTAKPTHCA YDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYP  
 VEVMLK

### SEQ ID NO: 24

cDNA otimizado para códon de SEQ ID NO: 23 (**códon de partida**, peptídeo de sinal):

ATGAGAGGTATGAAGCTCCTTGGTGCCCTCCTGGCTCTCGCTGCTCTCCTCCAA  
GGAGCAGTTTCTCTAAAGATTGCTGCTTTCAATATTAGAACCTTTGGCGAGACT  
 AAAATGTCCTCGGCAACATTAGTATCTTACATTGTTTCAGATCCTTTCTCGTTAC  
 GACATAGCTTTGGTCCAGGAGGTTAGAGACTCCCACTTGACTGCCGTCGGTAA  
 GCTGCTAGACAATCTTAACCAAGACGCACCTGACACCTACCACTACGTTGTTA  
 GTGAGCCTCTCGGTAGAACTCCTACAAGGAGAGATACCTATTTGTCTACCGT  
 CCAGATCAGGTGTCTGCTGTGGACTCTTACTACTATGACGACGGTTGTGAACCT  
 TGTGGTTCAGACACCTTCAACAGAGAACCATTTCATCGTTAGATTTTTCTCCAGA  
 TTCACCGAGGTCAGAGAGTTTCGCCATCGTTCCATTGCACGCTGCGCCTGGAGA  
 TGCAGTGGCCGAAATTGACGCTCTCTATGATGTCTACCTGGACGTTTCAGGAAA  
 AATGGGGTCTAGAAGATGTTATGCTGATGGGAGACTTCAACGCTGGTTGCTCT  
 TACGTTAGGCCATCTCAATGGTCAAGCATCAGACTATGGACTTCCCCAACGTTT  
 CAATGGCTTATTCCTGACTCCGCTGATACTACCGCCAAGCCCACTCATTGTGCA  
 TATGACAGAATTGTTGTCGCTGGTATGCTACTGCGTGGAGCTGTCGTACCAGAT  
 TCTGCTCTGCCATTTAACTTCCAAGCCGCATATGGTCTTTCTGACCAACTGGCT  
 CAAGCCATCTCTGATCACTACCCTGTGGAAGTTATGCTTAAG

#### SEQ ID NO: 25

cDNA otimizado para códon de SEQ ID NO: 2 (códon de partida, peptídeo de sinal):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCA  
CTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAG  
 GAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATAT  
 CATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTAT  
 GGAAAAGCTGAATAGAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACACTACGTTATCT  
 CTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAG  
 GAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGG  
 CGATGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCA  
 CACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTC  
 TGTCAAGGAAATAGATGAACTTGTTGAAGTTTACACCGACGTGAAGCACAGAT  
 GGAAGGCCGAGAATTTTCATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGATGCTCATAT  
 GTCCCTAAAAAGGCTTGAAAAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGT

CTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTG  
CTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAA  
AGTCCAACCTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACTGAGGAGGAA  
GCTTTAGACGTGTCCGACCACTTCCCTGTAGAGTTTAAGCTGCAATCCTCCAGA  
GCATTCACTAACTCTAAAAAGTCAGTCACTTTGCGTAAAAAGACTAAGTCTAA  
GAGATCG

**SEQ ID NO: 26**

cDNA otimizado para códon de SEQ ID NO: 17 (**códon de partida, peptídeo de sinal**):

ATGTCTAGAGAGCTTGCTCCACTCCTCCTACTCCTTCTTAGTATCCACTCTGCA  
CTCGCCATGAGAATTTGTAGCTTCAATGTAAGATCCTTCGGTGAATCTAAGCAG  
GAGGACAAAAACGCTATGGACGTTATTGTGAAGGTCATTAAGAGATGTGATAT  
CATTCTAGTTATGGAGATCAAGGACTCTAACAACAGAATTTGCCCCATCCTTAT  
GGAAAAGCTGAATAGAACTCTAGAAGAGGAATTACTTACAACACTACGTTATCT  
CTTCTAGGCTGGGTAGAAACACTTACAAGGAGCAATATGCATTTCTATACAAG  
GAAAAGCTAGTTTCCGTTAAGCGTTCTTACCACTATCATGACTACCAAGACGG  
CGATGCTGACGTTTTCTCCAGAGAACCATTTCGTTGTTTGGTTTCAGTCTCCTCA  
CACCGCTGTTAAGGACTTCGTGATTATCCCACTACACACTACGCCAGAAACCTC  
TGTC AAGGAAATAGATGAACTTGTTGAAGTTTACACCGACGTGAAGCACAGAT  
GGAAGGCCGAGAATTTCAATTTTCATGGGTGATTTCAACGCCGGATGCTCATAT  
GTCCCTAAAAAGGCTTGGA AAAACATCCGTTTGAGAACCGATCCTAGATTTGT  
CTGGCTCATCGGTGACCAAGAGGACACCACAGTCAAAAAGTCTACCAACTGTG  
CTTACGACAGAATTGTTCTGCGTGGTCAGGAGATTGTTTCATCTGTTGTCCCAA  
AGTCCAACCTCCGTCTTTGATTTCCAAAAGGCTTACAAACTGACTGAGGAGGAA  
GCTTTAGACGTGTCCGACCACTACCCTGTAGAGGTCATGTTGAAG

## REIVINDICAÇÕES

1. Variante de DNase 1 do tipo 3 (D1L3), caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima definida pela SEQ ID NO:2, com uma ou mais modificações em comparação com a SEQ ID NO:2 selecionada de: um sítio de ligação ao DNA mutado ou um sítio de ligação à cromatina mutado, um sítio de glicosilação, inativação de um sinal de localização nuclear e exclusão de toda ou parte de uma cauda C-terminal.

2. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a variante de proteína D1L3 possui estabilidade proteica aumentada, resistência à protease aumentada, biodisponibilidade aumentada, meia-vida na circulação aumentada, níveis mais altos de produção com sistemas de expressão in vitro e / ou substancialmente a mesma ou melhor atividade de degradação de DNA e / ou cromatina e / ou NET em comparação com a proteína D1L3 de tipo selvagem da SEQ ID NO:2.

3. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a variante é fundida ou conjugada com uma fração de proteína ou transportador.

4. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a variante compreende uma ou mais sequências de consenso de glicosilação de NX(T/S).

5. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a sequência de consenso de glicosilação inclui uma substituição D38N e uma substituição N40T ou N40S e / ou uma substituição A127N e uma substituição V129T ou V129S, com posições de aminoácidos correspondentes à SEQ ID NO:2.

6. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a variante compreende um sinal de localização nuclear (NLS) inativado.

7. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que um NLS é inativado pela exclusão de todo ou parte de NLS1 e / ou NLS2 da SEQ ID NO:2.

8. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que um NLS é inativado por substituição e / ou exclusão de aminoácidos dentro de NLS1 e / ou NLS2.

9. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o NLS2 da SEQ ID NO:2 é excluído.

10. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende a deleção total ou parcial da cauda C-terminal definida pela SEQ ID NO: 33 e / ou substituição de aminoácidos na cauda C-terminal.

11. Variante D1L3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a variante possui pelo menos uma substituição de blocos de construção da DNase1 (D1).

12. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a variante tem uma ou mais substituições de blocos de construção selecionadas de: M1\_A20delinsMRGMKLLGALLALAALLQGAVS, M21\_S25delinsLKIAA, V28\_S30delinsIQT, E33\_S34delinsET, Q36\_I45delinsMSNATLVSYI, K47\_K50delinsQILS, C52Y, I54\_M58delinsIALVQ, I60\_K61delinsVR, S63\_I70delinsSHLTAVGK, M72\_K74delinsLDN, R77\_T84delinsQDAPDT, N86H, V88\_I89delinsVV, S91\_R92delinsEP, N96\_T97delinsNS, Q101R, A103L, L105V, K107\_L110delinsRPDQ, V113\_S116delinsAVDS, H118Y, H120D, Y122\_A127delinsGCEPCGN, V129T, S131N, 135F\_136VdelinsAI, W138R, Q140\_H143delinsFSRF, A145\_D148delinsAVKD, V150A, I152A, T156\_T157delinsAA, E159\_S161delinsGDA, K163A, E167A, V169\_E170delinsYD, T173L, K176\_R178delinsQEK, K180\_A181delinsGL, N183\_F186delinsDVML, P198\_A201delinsRPSQ, K203\_N204delinsSS, R208W, D210S, R212T, V214Q, G218P, Q220\_E221delinsSA, V225\_S228delinsATP, N230H, L238\_R239delinsVA, Q241\_S246delinsMLLRGA, K250D, N252\_V254delinsALP, D256N,

K259\_A260delinsAA, K262G, T264\_E267delinsSDQL, L269\_V271delinsQAI, F275Y, F279\_K280delinsVM, e Q282\_S305delinsK na SEQ ID NO:2.

13. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO:2: F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK.

14. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO:2: Q36\_I45delinsMSNATLVSYI.

15. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO:2: Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N.

16. Variante D1L3, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende 2 ou 3 modificações em relação à SEQ ID NO:2 selecionadas de: F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK, Q36\_I45delinsMSNATLVSYI, e Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N.

17. Enzima DNase, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 e compreendendo pelo menos uma substituição de blocos de construção da DNase1 humana.

18. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende substituições de blocos de construção F275Y/F279\_K280delinsVM/Q282\_S305delinsK e que opcionalmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

19. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:2:

Q36\_I45delinsMSNATLVSYI/ Y122\_A127delinsGCEPCGN/V129T/S131N e, opcionalmente, tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO:20

20. Enzima DNase, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima da SEQ ID NO:2, em que a enzima tem uma substituição de asparagina na posição correspondente à posição 38 e / ou 127 da SEQ ID NO:2, e a asparagina N38 e / ou N127 é glicosilada.

21. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a variante D1L3 como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20.

22. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 21.

23. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 22.

24. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a variante D1L3 como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, o polinucleotídeo como definido na reivindicação 21, ou o vetor como definido na reivindicação 22, e um transportador farmaceuticamente aceitável.

25. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que compreende a variante D1L3 formulada para administração tópica, parenteral ou pulmonar.

26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 24, formulada para intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular, intravenosa, subcutânea, intra-arterial, oral, sublingual, pulmonar ou transdérmica.

27. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante D1L3 produzida em um sistema de expressão não mamífero.

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o sistema de expressão não mamífero é *Pichia pastoris*.

29. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que *Pichia pastoris* codifica uma variante D1L3 que compreende o peptídeo sinal de D1L3 humano de tipo selvagem da SEQ ID NO:2.

30. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 29, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma proteína DNase1 ou variante da mesma, um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína DNase1 ou variante da mesma, ou um vetor compreendendo o referido polinucleotídeo isolado.

31. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que compreende a variante D1L3 e a proteína DNase1 ou variante da mesma, a uma razão (m/m) de 100:1 a 1:100.

32. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que a razão é de 10:1 a 1:10 e é opcionalmente de cerca de 1:1.

33. Variante DNase1 (D1), caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1 e com uma ou mais modificações em relação à SEQ ID NO:1 que são selecionadas de: uma ou mais sítios de ligação ao DNA mutados ou sítios de ligação à cromatina, um sítio de ligação à actina mutado, um sítio de glicosilação mutado, adição de um sinal de localização nuclear, adição de uma cauda C-terminal com pelo menos 50% de identidade de sequência à cauda C-terminal da proteína D1L3 de tipo selvagem da SEQ ID NO:2; e/ou uma fusão N-terminal ou C-terminal com uma fração que se estende à meia-vida.

34. Variante D1, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais substituições de blocos de construção selecionadas de: 1M\_S22delinsMSRELAPLLLLLLSIHSALA, L23\_A27delinsMRICS, I30\_T32delinsVRS, E35\_T36delinsES, M38\_I47delinsQEDKNAMDVI, Q49\_S52delinsKVIK, Y54C, I56\_Q60delinsIILVM, V62\_R63delinsIK, S65\_K72delinsSNNRICPI, L74\_N76delinsMEK, Q79\_T84delinsRNSRRGIT, H86N, V88\_V89delinsVI, E91\_P92delinsSR, N96\_S97delinsNT, R101Q, L103A, V105L, R107\_Q110delinsKEKL, A113\_S116delinsVKRS, Y118H, D120H, G122\_N128delinsYQDGDA, T130S, N132S, A136\_I137delinsFV, R139W, F141\_F144delinsQSPH, E146\_E149delinsAVKD, A151V, V153I, A157\_A158delinsTT, G160\_A162delinsETS, A164K, A168E, Y170\_D171delinsVE, L174T, Q177\_K179delinsKHR, G181\_L182delinsKA, D184\_L187delinsNFIF, R199\_Q202delinsPKKA, S204\_S205delinsKN, W209R, S211D, T213R, Q215V, P219G, S221\_A222delinsQE, A226\_P228delinsVKKS, H230N, V238\_A239delinsLR, M241\_A246delinsQEIVSS, D250K, A252\_P254delinsNSV, N256D, A259\_A260delinsKA, G262K, S264\_L267delinsTEEE, Q269\_I271delinsLDV, Y275F, V279\_M280delinsFK, e K282delinsQSSRAFTNSKKS VTLRKKTKSKRS na SEQ ID NO:1.

35. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1: Q79\_T84delinsRNSRRGIT.

36. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1: H86N/V88\_V89delinsVI/E91\_P92delinsSR.

37. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1: A136\_I137delinsFV.

38. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1:

R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE.

39. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1: A226\_P228delinsVKKS.

40. Variante D1, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes modificações em relação à SEQ ID NO:1:

Y275F/V279\_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

41. Enzima DNase, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1 e compreendendo a substituição, inserção ou adição de um ou mais resíduos de arginina e / ou lisina, em que a enzima DNase tem atividade de degradação da cromatina aumentada em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1.

42. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que o um ou mais resíduos de arginina e / ou lisina são substituições de aminoácidos selecionadas de substituições nas posições correspondentes às posições 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 e 280 da SEQ ID NO: 1.

43. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que compreende a substituição e / ou inserção de dois ou mais resíduos de arginina e / ou lisina.

44. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que compreende a substituição e / ou inserção de três ou mais resíduos de arginina e / ou lisina.

45. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 44, caracterizada pelo fato de que compreende uma arginina ou lisina em uma ou mais posições

correspondentes às posições 31, 49, 76, 92, 109, 164, 177, 201, 204 e 213 da SEQ ID NO: 1.

46. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que compreende uma arginina ou lisina nas posições correspondentes às posições 31, 49, 79 e 209 da SEQ ID NO: 1.

47. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que compreende uma arginina ou lisina nas posições correspondentes às posições 31, 49, 79, 177, 209, 262 da SEQ ID NO: 1.

48. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que compreende um resíduo de lisina ou arginina nas posições correspondentes às posições 31 e 227 da SEQ ID NO: 1.

49. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que a enzima possui uma lisina ou arginina na posição correspondente à posição 164 da SEQ ID NO: 1.

50. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 49, caracterizada pelo fato de que compreende uma substituição de aminoácidos na posição 136 em relação à SEQ ID NO: 1, e que é opcionalmente A136F.

51. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas 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 e K280M e, opcionalmente, com uma modificação que resulta em resistência à actina, em que a modificação que resulta em resistência à actina é opcionalmente A136F SEQ ID NO: 1.

52. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que, se a enzima compreender uma substituição de Q31R ou T227K, a enzima compreenderá pelo menos duas modificações de aminoácidos selecionadas 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 e K280M.

53. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que compreende as substituições de aminoácidos Q31R e T227K em relação à SEQ ID NO:1.

54. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que compreende a substituição de aminoácidos A164K em relação à SEQ ID NO: 1.

55. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais substituições de aminoácidos selecionadas de Q31R, Q49K, N76K, Q79R, P92R, D109K, A164K, Q177K, P200K, S201K, S204R, T213R, e G262K.

56. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes substituições de aminoácidos: Q31R, Q49K, Q79R, A164K e W209R.

57. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes substituições de aminoácidos: Q31R, Q49K, Q79R, A136F, Q177K, W209R, G262K.

58. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes substituições de aminoácidos: Q31R, T227K e A136F.

59. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que compreende as seguintes substituições de aminoácidos: A164K e A136F.

60. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 59, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende uma sequência de consenso de glicosilação que compreende uma substituição N40S e / ou uma substituição N128S em relação à SEQ ID NO: 1.

61. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que compreende as substituições de aminoácidos Q31R, N40S, A136F, N128S, e T227K em relação à SEQ ID NO:1.

62. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 61, caracterizada pelo fato de que a enzima é pelo menos 90% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1 ou pelo menos cerca de 95% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1, ou pelo menos cerca de 97% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1.

63. Enzima DNase, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à enzima da SEQ ID NO: 1 e compreendendo pelo menos uma substituição de blocos de construção da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, em que a DNase enzima tem atividade de degradação da cromatina aumentada em comparação com a enzima DNase da SEQ ID NO: 1.

64. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende pelo menos duas substituições de blocos de construção adjacentes da SEQ ID NO:2.

65. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende a substituição de blocos de construção Q79\_T84delinsRNSRRGIT, e opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

66. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 64, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende substituições de blocos de construção H86N / V88\_V89delinsVI / E91\_P92delinsSR, e opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

67. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende a substituição de blocos de construção A136\_I137delinsFV, e opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

68. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 64, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende substituições de blocos de construção R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE, e opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13.

69. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que a enzima compreende a substituição de blocos de construção A226\_P228delinsVKKS, e opcionalmente, compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

70. Enzima DNase, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que compreendendo substituições de blocos de construção Q79\_T84delinsRNSRRGIT, H86N/V88\_V89delinsVI/E91\_P92delinsSR, A136\_I137delinsFV, R199\_Q202delinsPKKA/S204\_S205delinsKN/W209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221\_A222delinsQE, A226\_P228delinsVKKS, e opcionalmente compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

71. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 70, caracterizada pelo fato de que compreende as substituições de blocos de construção Y275F/V279\_M280delinsFK/K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS.

72. Enzima DNase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 71, caracterizada pelo fato de que a enzima exibe uma ou mais propriedades selecionadas de: afinidade semelhante ou superior ao DNA livre de proteínas em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1, uma atividade de degradação da cromatina mais alta em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1, uma atividade enzimática que é resistente à inibição pela actina em comparação com a enzima da SEQ ID NO: 1 e uma combinação das mesmas.

73. Enzima DNase, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à SEQ ID NO: 15.

74. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a enzima DNase como definida em qualquer uma das reivindicações 41 a 73.

75. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 74.

76. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor da reivindicação 75.

77. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a enzima como definida em qualquer uma das reivindicações 41 a 73, o polinucleotídeo isolado como definido na reivindicação 74, ou o vetor como definido na reivindicação 75, e um transportador farmacêuticamente aceitável.

78. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que compreende a enzima DNase formulada para administração parenteral ou pulmonar.

79. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 77, formulada para administração intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular, intravenosa, subcutânea, intra-arterial, oral, sublingual, pulmonar, tópica ou transdérmica.

80. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que a enzima é produzida em células de ovário de hamster chinês.

81. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que a enzima não é glicosilada e produzida em um sistema de expressão não mamífero.

82. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 81, caracterizada pelo fato de que o sistema de expressão não mamífero é *Pichia pastoris*.

83. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 82, caracterizada pelo fato de que *Pichia pastoris* codifica a enzima, juntamente com o peptídeo sinal de SEQ ID NO:1.

84. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 83, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma proteína DNase 1 tipo 3 (D1L3) ou uma variante da mesma.

85. Método para tratar um sujeito em necessidade de degradação extracelular de DNA, degradação extracelular de cromatina, degradação de armadilha extracelular (ET) e / ou degradação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET), o método, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante D1L3 como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou a enzima DNase como definida em qualquer uma das reivindicações 17 a 20, ou a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 24 a 32, ou a variante D1 como definida em qualquer uma das reivindicações 33 a 40, ou a enzima DNase como definida em qualquer uma das reivindicações 41 a 73, ou a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 77 a 84.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que, mediante tratamento, o sujeito exibe degradação extracelular do DNA, degradação extracelular da cromatina, degradação da armadilha extracelular (ET) e / ou degradação da armadilha extracelular de neutrófilos (NET).

87. Método, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem um distúrbio inflamatório crônico ou agudo.

88. Método, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem uma infecção aguda ou crônica.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 88, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou está em risco de uma oclusão vascular compreendendo NETs.

90. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem neutrofilia crônica (por exemplo, um aumento no número de neutrófilos), agregação e leucostase de neutrófilos, trombose e oclusão vascular (por exemplo, doença das células falciformes), lesão de isquemia-reperfusão (por exemplo, vólculo do intestino médio, torção testicular, reperfusão de isquemia e reperfusão de órgãos vitais, transplante de órgãos), lesão de tecido cirúrgico e traumático, reação ou doença inflamatória aguda ou crônica, doença autoimune (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), nefrite lúpica, artrite reumatoide, vasculite, esclerose sistêmica), doença cardiovascular (por exemplo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose, tromboembolismo venoso, incluindo terapia trombolítica), doença metabólica (por exemplo, diabetes), inflamação sistêmica (por exemplo, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, choque séptico, coagulação intravascular disseminada (DIC) e microangiopatia trombótica (TMA)), doenças inflamatórias do trato respiratório (por exemplo, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), lesão pulmonar aguda (ALI), lesão pulmonar induzida por fumaça, lesão pulmonar induzida por transfusão (TRALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e asma, atelectasia, bronquite, empiema), doenças inflamatórias renais (doenças renais agudas e crônicas, incluindo lesão renal aguda (AKI) e doença renal crônica (CKD), doenças inflamatórias relacionadas ao tecido transplantado (por exemplo, doença do enxerto contra o hospedeiro) e câncer (por exemplo, leucemia, metástase de tumor e tumores sólidos).

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 90, caracterizado pelo fato de que a proteína ou composição é administrada por via intravenosa, intra-arterial, intra-articular, intramuscular, subcutânea, tópica ou por administração pulmonar.

92. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou está em risco de uma oclusão ductal em um sistema ductal.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que o sistema ductal é ducto biliar, ducto lacrimal, ducto lactífero, ducto cístico, ducto hepático, ducto ejaculatório, ducto parótido, ducto submandicular, ducto sublingual principal, ducto de Bartholin, aqueduto cerebral, pâncreas, glândula mamária, ducto deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, uma obstrução do ducto deferente ou doença renal.

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 90 a 94, caracterizado pelo fato de que a enzima DNase é administrada por administração intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal.

96. Método, de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem colangite esclerosante primária.

97. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou corre o risco de acumular NETs nas superfícies endoteliais (por exemplo, aderências cirúrgicas), na pele (por exemplo, feridas/cicatrizes, úlceras) ou nas articulações sinoviais (por exemplo, gota, artrite).

98. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que o sujeito teve ou está tendo um procedimento médico invasivo e está em risco de aderências cirúrgicas.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada durante a cirurgia para prevenir ou inibir a formação de aderências cirúrgicas.

100. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada topicamente à pele para prevenir ou tratar feridas e/ou cicatrizes.

101. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada às articulações sinoviais para prevenir ou tratar a gota e a artrite.

102. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem trombose, acidente vascular cerebral, sepse, lesão pulmonar, aterosclerose, infecção viral, doença falciforme, infarto do miocárdio, infecção no ouvido, cicatrização de feridas, lesão hepática, endocardite, infecção hepática, pancreatite, disfunção primária do enxerto, reperfusão de isquemia de membros, lesão renal, coagulação sanguínea, inflamação induzida por alume, lesão hepatorenal, exsudações pleurais, hemotórax, coágulos sanguíneos, anemia pós-pneumática, úlceras, condições otorrinolaringológicas, infecções orais, lesões leves, sinusite, rinoplastias pós-operatórias, infertilidade, cateter da bexiga, limpeza de feridas, teste de reação cutânea, meningite pneumocócica, gota, úlceras de perna, fibrose cística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquite crônica, bronquiectasia, lúpus, discinesia ciliar primária, bronquiólite, empiema, infecções pleurais, câncer, doença dos olhos secos, infecções do trato respiratório inferior, hematomas crônicos, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva.

103. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 102, caracterizado pelo fato de que o sujeito ainda exibe uma doença arterial coronariana.

104. Método, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem fibrose cística.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 104, caracterizado pelo fato de que compreende monitorar a atividade degradadora de NET de sangue, plasma ou soro do sujeito.

106. Método para tratar um sujeito exibindo ou em risco de oclusão intravascular envolvendo NETs, o método, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1L3 ou uma variante da mesma e / ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1 ou uma variante da mesma.

107. Método, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que é administrado ao sujeito uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO:2.

108. Método, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a enzima compreende a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO:2.

109. Método para tratar um sujeito que tem ou está em risco de uma oclusão ductal em um sistema ductal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1L3 ou uma variante da mesma e / ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1 ou uma variante da mesma.

110. Método, de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que o sujeito é administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO:2 e / ou uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80 % ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

111. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a enzima compreende a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO:2 e / ou compreende a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

112. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 109 a 111, caracterizado pelo fato de que o sistema ductal é ducto biliar, ducto lacrimal, ducto lactífero, ducto cístico, ducto hepático, ducto ejaculatório, ducto parótido, ducto submandibular, ducto

sublingual principal, ducto de Bartholin, aqueduto cerebral, pâncreas, glândula mamária, ducto deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado.

113. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 109 a 112, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, uma obstrução do ducto deferente ou doença renal.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 109 a 113, caracterizado pelo fato de que a enzima DNase é administrada por administração intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal.

115. Método, de acordo com a reivindicação 114, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem colangite esclerosante primária.

116. Método para tratar um sujeito em necessidade de degradação extracelular de DNA, degradação extracelular de cromatina, degradação de armadilha extracelular (ET) e / ou degradação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET), o método, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1L3 ou de uma variante da mesma e uma D1 ou uma variante da mesma.

117. Método, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que a D1L3 ou uma variante da mesma, e a D1 ou variante da mesma, são administradas em uma única composição farmacêutica ou composições farmacêuticas separadas, e em que a razão de D1L3 ou variante da mesma para D1 ou variante da mesma está opcionalmente na faixa de 100:1 a 1:100 em massa, 10:1 a 1:10 em massa e, opcionalmente, cerca de 1:1.

118. Método, de acordo com a reivindicação 117, caracterizado pelo fato de que, mediante tratamento, o sujeito exibe degradação extracelular do DNA, degradação extracelular da cromatina, degradação da armadilha extracelular (ET) e / ou degradação da armadilha extracelular de neutrófilos (NET).

119. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 118, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem um distúrbio inflamatório crônico ou agudo.

120. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 118, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem uma infecção aguda ou crônica.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 120, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou está em risco de uma oclusão vascular compreendendo NETs.

122. Método, de acordo com a reivindicação 116 ou 117, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem neutrofilia crônica (por exemplo, um aumento no número de neutrófilos), agregação e leucostase de neutrófilos, trombose e oclusão vascular (por exemplo, doença das células falciformes), lesão de isquemia-reperfusão (por exemplo, vólvulo do intestino médio, torção testicular, reperfusão de isquemia e reperfusão de órgãos vitais, transplante de órgãos), lesão de tecido cirúrgico e traumático, reação ou doença inflamatória aguda ou crônica, doença autoimune (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), nefrite lúpica, artrite reumatoide, vasculite, esclerose sistêmica), doença cardiovascular (por exemplo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose, tromboembolismo venoso, incluindo terapia trombolítica), doença metabólica (por exemplo, diabetes), inflamação sistêmica (por exemplo, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, choque séptico, coagulação intravascular disseminada (DIC) e microangiopatia trombótica (TMA)), doenças inflamatórias do trato respiratório (por exemplo, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), lesão pulmonar aguda (ALI), lesão pulmonar induzida por fumaça, lesão pulmonar induzida por transfusão (TRALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) e asma, atelectasia, bronquite, empiema), doenças inflamatórias renais (doenças renais agudas e crônicas, incluindo lesão renal aguda (AKI) e doença renal crônica (CKD), doenças inflamatórias relacionadas ao tecido transplantado (por exemplo, doença do enxerto contra o hospedeiro) e câncer (por exemplo, leucemia, metástase de tumor e tumores sólidos).

123. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 122, caracterizado pelo fato de que cada uma das D1L3 ou variante da mesma e D1 ou variante da mesma é administrada por uma via selecionada independentemente de administração intravenosa, intra-arterial, intra-articular, intramuscular, subcutânea, tópica e pulmonar.

124. Método, de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou está em risco de uma oclusão ductal em um sistema ductal.

125. Método, de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo fato de que o sistema ductal é ducto biliar, ducto lacrimal, ducto lactífero, ducto cístico, ducto hepático, ducto ejaculatório, ducto parótido, ducto submandicular, ducto sublingual principal, ducto de Bartholin, aqueduto cerebral, pâncreas, glândula mamária, ducto deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado.

126. Método, de acordo com a reivindicação 125, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, uma obstrução do ducto deferente ou doença renal.

127. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 124 a 126, caracterizado pelo fato de que as enzimas DNase são administradas como uma composição única administrada por administração intravenosa, intra-arterial, ou intraperitoneal.

128. Método, de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem colangite esclerosante primária.

129. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 118, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ou corre o risco de acumular NETs nas superfícies endoteliais, na pele ou nas articulações sinoviais.

130. Método, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que o sujeito teve ou está tendo um procedimento médico invasivo e está em risco de aderências cirúrgicas.

131. Método, de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada durante a cirurgia para prevenir ou inibir a formação de aderências cirúrgicas.

132. Método, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada topicamente à pele para prevenir ou tratar feridas e / ou cicatrizes.

133. Método, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que a terapia com DNase é administrada às articulações sinoviais para prevenir ou tratar a gota e a artrite.

134. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 118, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem trombose, acidente vascular cerebral, sepse, lesão pulmonar, aterosclerose, infecção viral, doença falciforme, infarto do miocárdio, infecção no ouvido, cicatrização de feridas, lesão hepática, endocardite, infecção hepática, pancreatite, disfunção primária do enxerto, reperfusão de isquemia de membros, lesão renal, coagulação sanguínea, inflamação induzida por alume, lesão hepatorenal, exsudações pleurais, hemotórax, coágulos sanguíneos, anemia pós-pneumática, úlceras, condições otorrinolaringológicas, infecções orais, lesões leves, sinusite, rinoplastias pós-operatórias, infertilidade, cateter da bexiga, limpeza de feridas, teste de reação cutânea, meningite pneumocócica, gota, úlceras de perna, fibrose cística, síndrome de Kartegener, asma, atelectasia lobar, bronquite crônica, bronquiectasia, lúpus, discinesia ciliar primária, bronquiolite, empiema, infecções pleurais, câncer, doença dos olhos secos, infecções do trato respiratório inferior, hematomas crônicos, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva.

135. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 134, caracterizado pelo fato de que o sujeito ainda exibe uma doença arterial coronariana.

136. Método, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem fibrose cística.

137. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 116 a 136, caracterizado pelo fato de que compreende monitorar a atividade degradadora de NET de sangue, plasma ou soro do sujeito.

138. Método para tratar um sujeito exibindo ou em risco de oclusão intravascular envolvendo NETs, o método, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1L3 ou uma variante da mesma e / ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1 ou uma variante da mesma.

139. Método, de acordo com a reivindicação 138, caracterizado pelo fato de que o sujeito é administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO:2.

140. Método, de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que a enzima compreende a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO:2.

141. Método para tratar um sujeito que tem ou está em risco de uma oclusão ductal em um sistema ductal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma D1L3 ou uma variante da mesma e / ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de D1 ou uma variante da mesma.

142. Método, de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que o sujeito é administrado com uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80% ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO:2 e / ou uma enzima compreendendo uma sequência de aminoácidos com 80 % ou mais de identidade de sequência com a enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

143. Método, de acordo com a reivindicação 142, caracterizado pelo fato de que as enzimas compreendem a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO:2 e / ou a sequência de aminoácidos da enzima definida pela SEQ ID NO: 1.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141 a 143, caracterizado pelo fato de que o sistema ductal é ducto biliar, ducto lacrimal, ducto lactífero, ducto cístico, ducto hepático, ducto ejaculatório, ducto parótido, ducto submandibular, ducto sublingual principal, ducto de Bartholin, aqueduto cerebral, pâncreas, glândula mamária, ducto deferente, ureter, bexiga urinária, vesícula biliar e fígado.

145. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141 a 143, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem pancreatite, colangite, conjuntivite, mastite, doença do olho seco, uma obstrução do ducto deferente ou doença renal.

146. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 141 a 145, caracterizado pelo fato de que a enzima DNase é administrada por administração intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal.

147. Método, de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem colangite esclerosante primária.

148. Método para fazer uma composição farmacêutica para reduzir a acumulação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET), caracterizado pelo fato de que compreende: fornecer um camundongo geneticamente modificado com deficiência na atividade DNase1 e DNase1 tipo 3 e expressar um polinucleotídeo GCSF heterólogo ou é repetidamente estimulado com compostos microbianos, em que o referido camundongo geneticamente modificado acumula NETs; administrar um inibidor de NET candidato ou enzima DNase candidata; selecionar um inibidor de NET ou enzima DNase que reduz a acumulação de NETs; e formulação do inibidor de NET ou enzima DNase para administração a um paciente humano.

149. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que a composição é formulada para administração parenteral ou pulmonar.

150. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que é formulado para administração intravenosa, intra-arterial, intra-articular, intramuscular, subcutânea, tópica ou pulmonar.

151. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que o camundongo geneticamente modificado expressa um polinucleotídeo G-CSF heterólogo em hepatócitos.

152. Método para produção recombinante de uma enzima DNase selecionada de D1 humana, D1L3 humana ou uma variante da mesma, caracterizado pelo fato de que compreende: cultivar uma célula hospedeira de *Pichia pastoris* que codifica a enzima DNase com o peptídeo sinal nativo; e recuperar a DNase dos meios de cultura.

153. Método, de acordo com a reivindicação 152, caracterizado pelo fato de que a enzima DNase é D1L3 humana ou uma variante da mesma com pelo menos 80% de identidade de sequência com a enzima da SEQ ID NO:2.

154. Método, de acordo com a reivindicação 153, caracterizado pelo fato de que a enzima DNase é D1L3 humana.

155. Método para engenharia de enzimas DNase, caracterizado pelo fato de que compreende:

proporcionar um alinhamento proteína-proteína das enzimas DNase doadora e receptora; identificar sequências variáveis de aminoácidos para transferência, sendo os aminoácidos variáveis flanqueados por um ou mais aminoácidos conservados nas enzimas DNase doadora e receptora; substituir os aminoácidos variáveis da DNase receptora pelos aminoácidos variáveis da DNase doadora para criar uma DNase quimérica; produção recombinante da DNase quimérica.

156. Método, de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que as enzimas DNase são selecionadas de D1 humana, DNase1 tipo 1 humana (D1L1) definida por SEQ ID NO: 38, DNase1 tipo 2 humana (D1L2) definida por SEQ ID NO: 39, e D1L3 humana.

157. Método, de acordo com a reivindicação 155 ou 156, caracterizado pelo fato de que a substituição de blocos de construção tem pelo menos dois aminoácidos, ou pelo menos três aminoácidos, ou pelo menos quatro aminoácidos, ou pelo menos cinco aminoácidos.

FIG. 1A- FIG. 1F

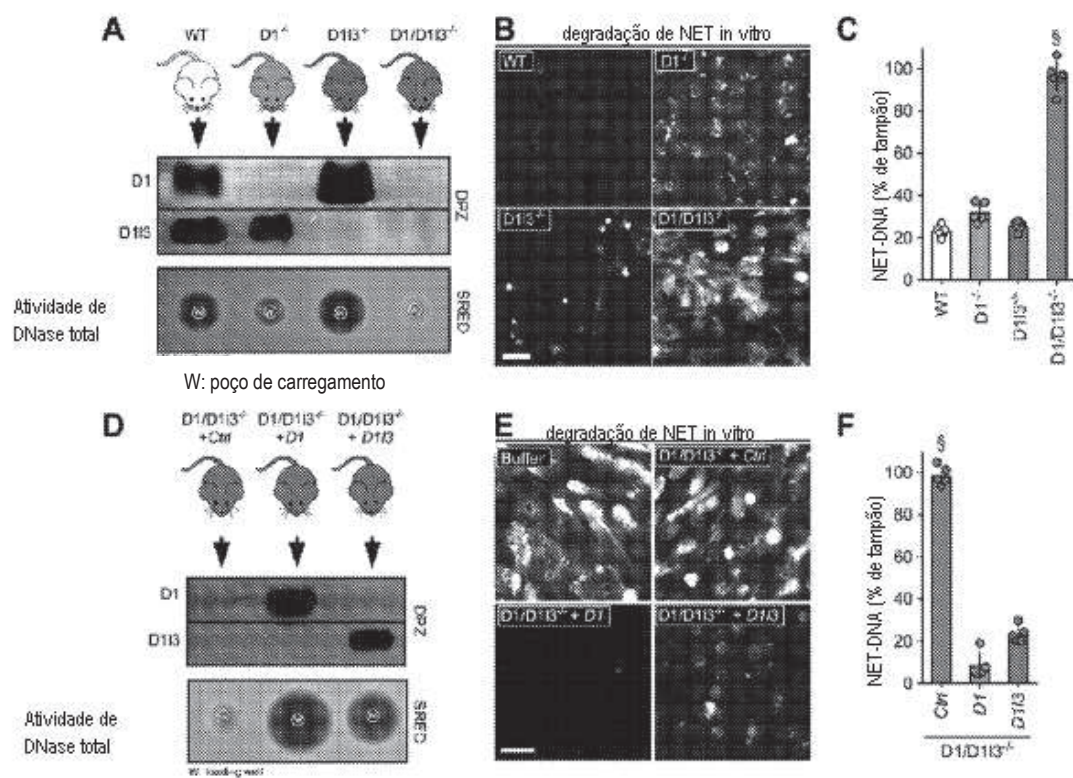


FIG. 2A- FIG. 2I

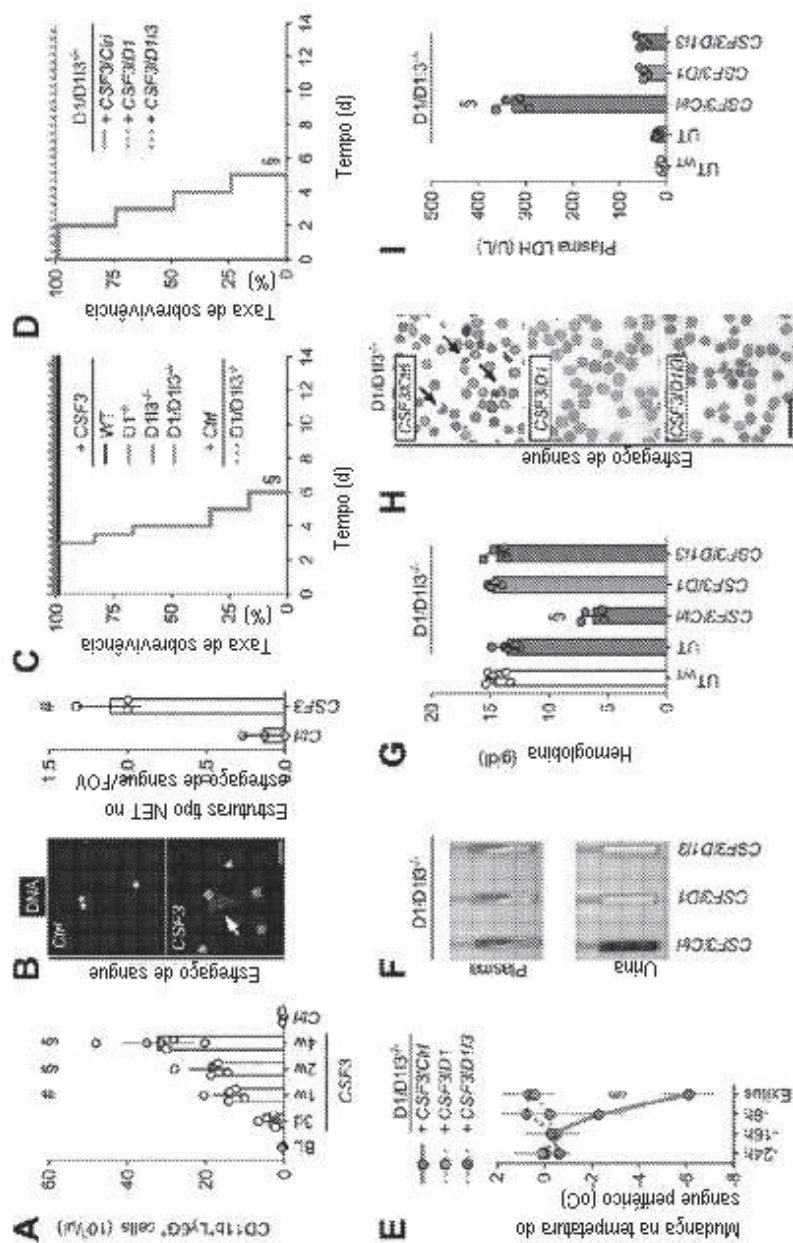


FIG. 3A- FIG. 3G

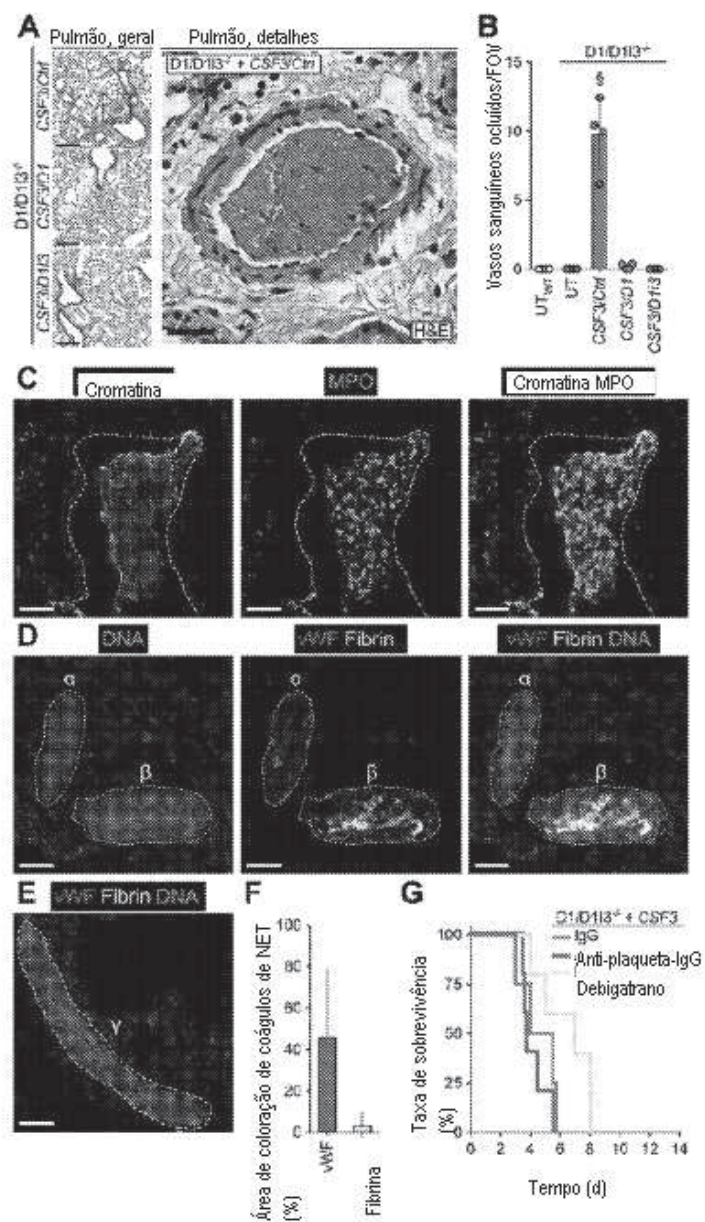


FIG. 4A-FIG.4I

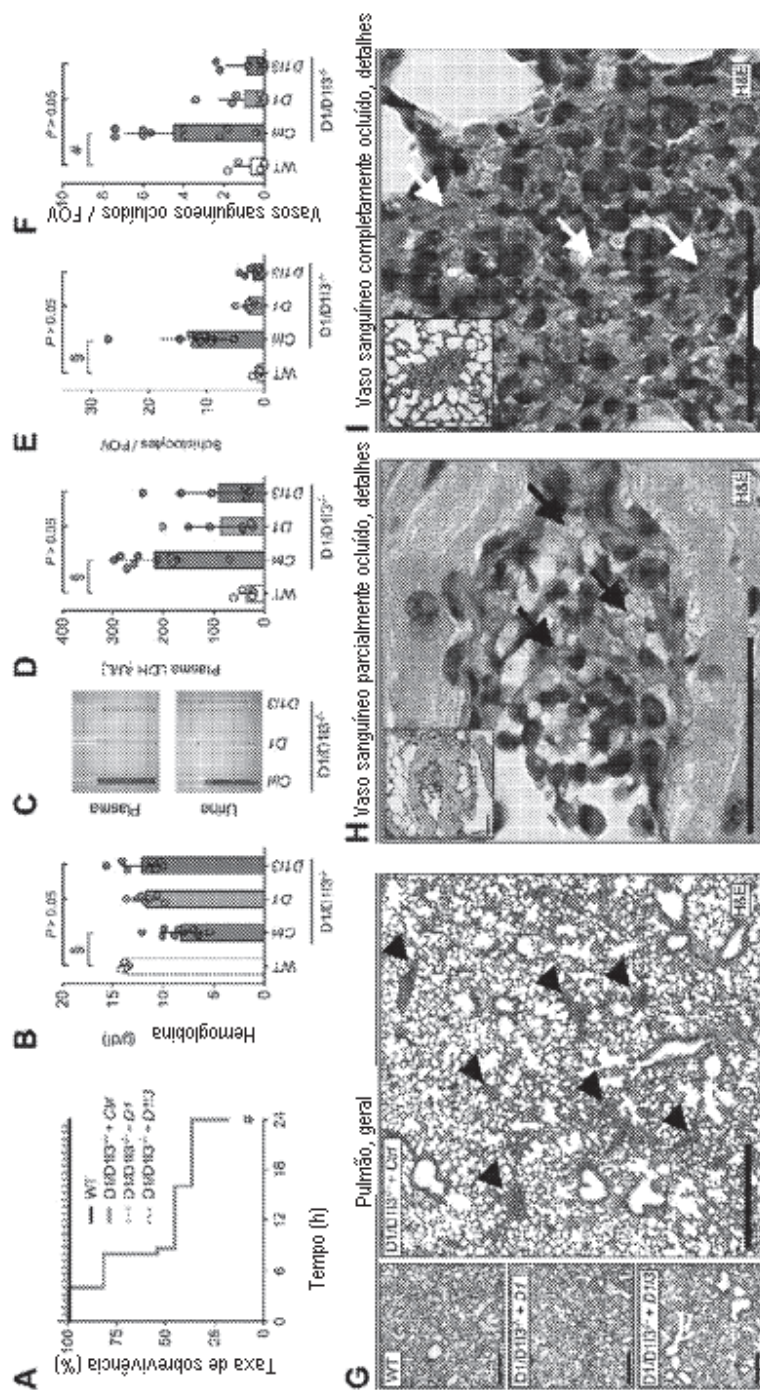


FIG. 5A-FIG. 5E

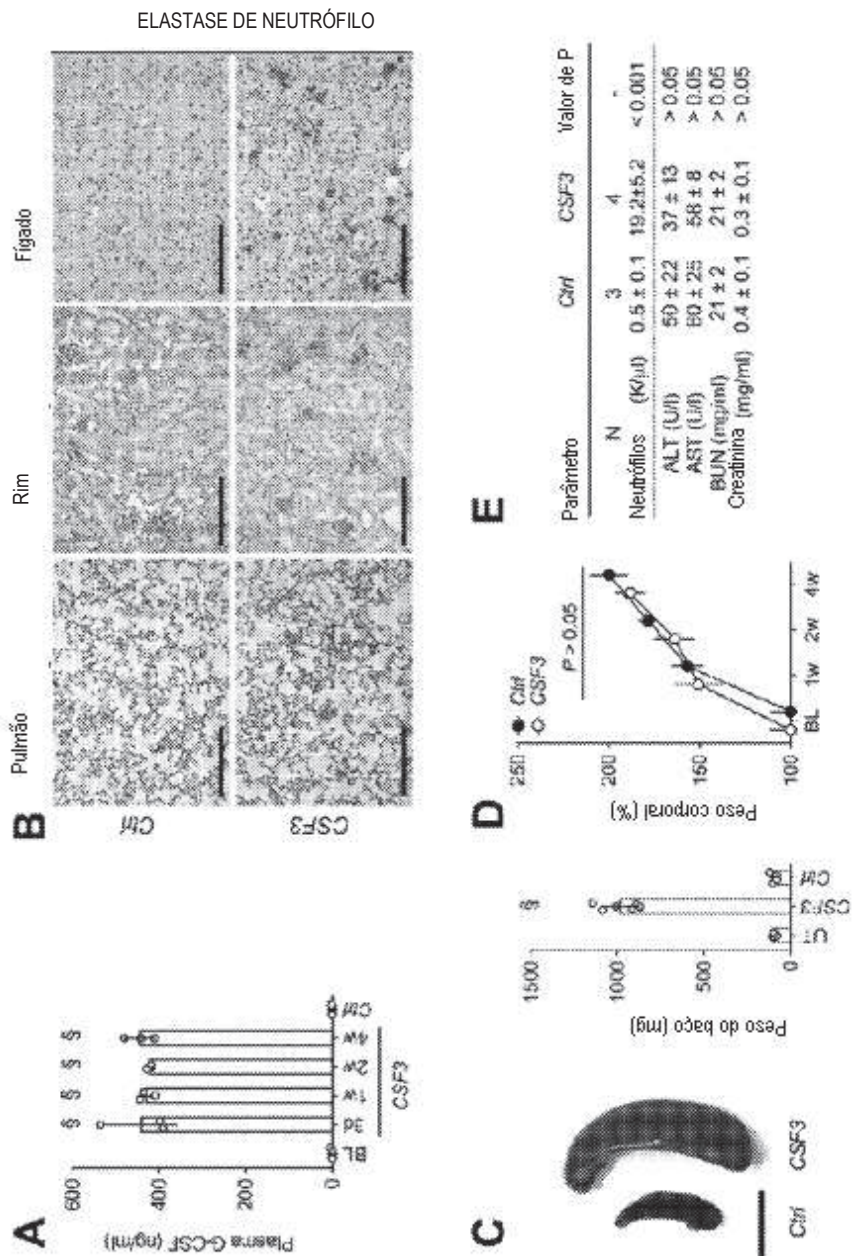




FIG. 7A-FIG. 7C

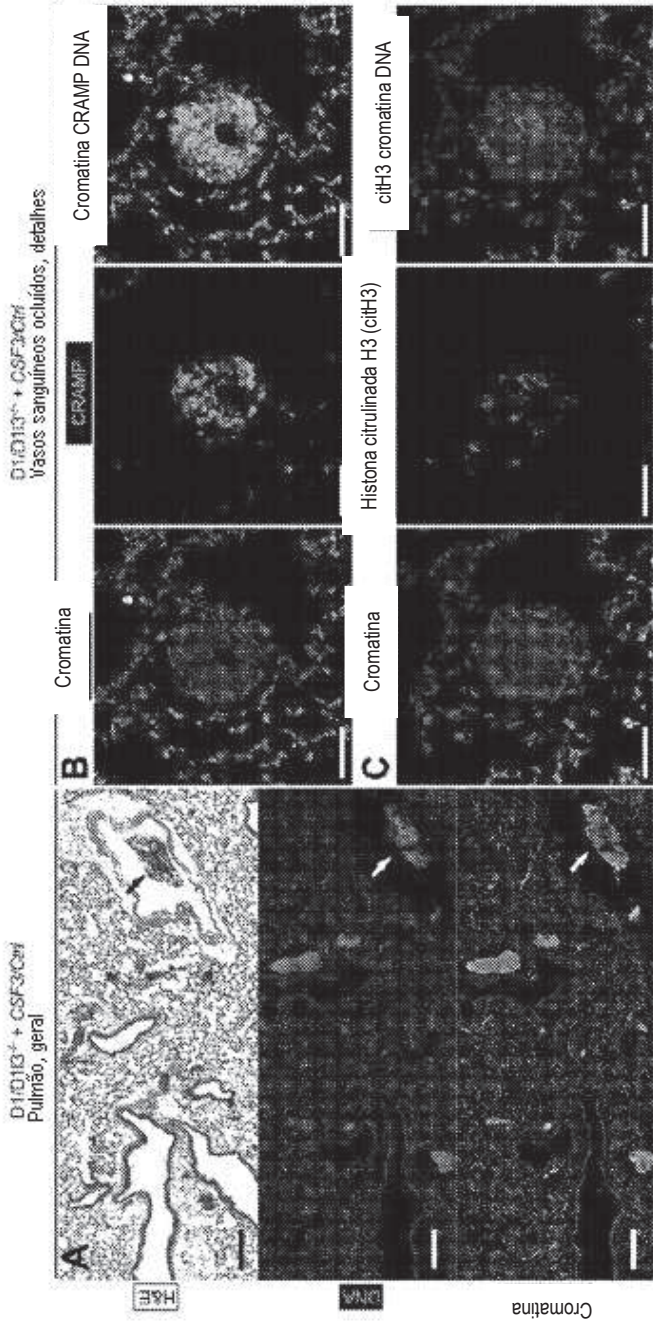


FIG. 8A E FIG. 8B

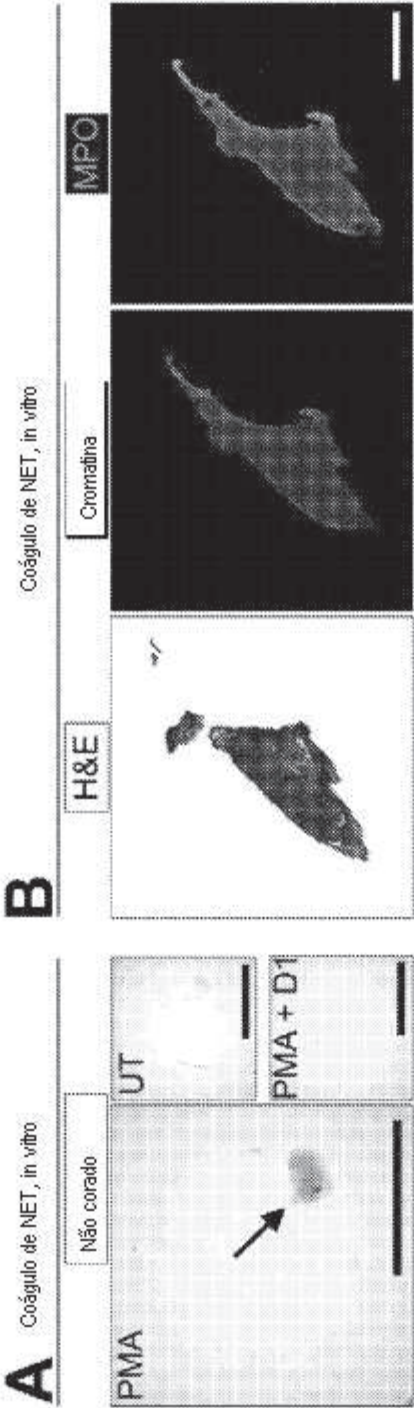


FIG. 9A E FIG. 9B

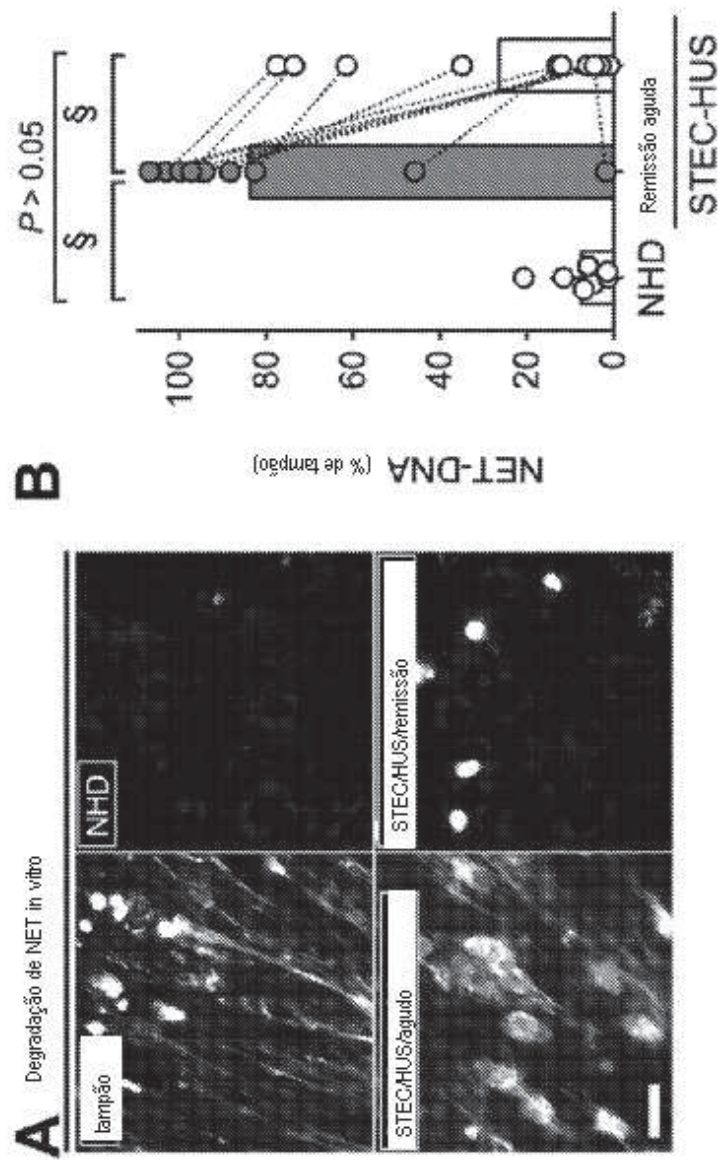


FIG. 10

| # | Causa da morte                            | sexo | idade | Tecido | Coágulos ricos em hematoxilina | Positivo para Cromatina e MPO | Localização    |
|---|-------------------------------------------|------|-------|--------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|
| 1 | ARDS                                      | M    | 84    | Pulmão | Sim                            | Sim                           | Brônquio       |
| 2 | Falha cardiovascular séptica + ARDS       | F    | 63    | Pulmão | Não                            | Não aplicável                 | Não aplicável  |
| 3 | ARDS                                      | F    | 67    | Pulmão | Não                            | Não aplicável                 | Não aplicável  |
| 4 | Falha de múltiplos órgãos sépticos + ARDS | M    | 72    | Pulmão | Sim                            | Sim                           | Brônquio       |
| 5 | Falha séptica cardiovascular + ARDS       | F    | 75    | Pulmão | Não                            | Não aplicável                 | Não aplicável  |
| 6 | Falha séptica de múltiplos órgãos         | M    | 60    | Pulmão | Sim                            | Sim                           | Vaso sanguíneo |
| 7 | Falha séptica cardiovascular              | F    | 76    | Pulmão | Sim                            | Sim                           | Vaso sanguíneo |
| 8 | ARDS                                      | F    | 68    | Pulmão | Não                            | Não aplicável                 | Não aplicável  |

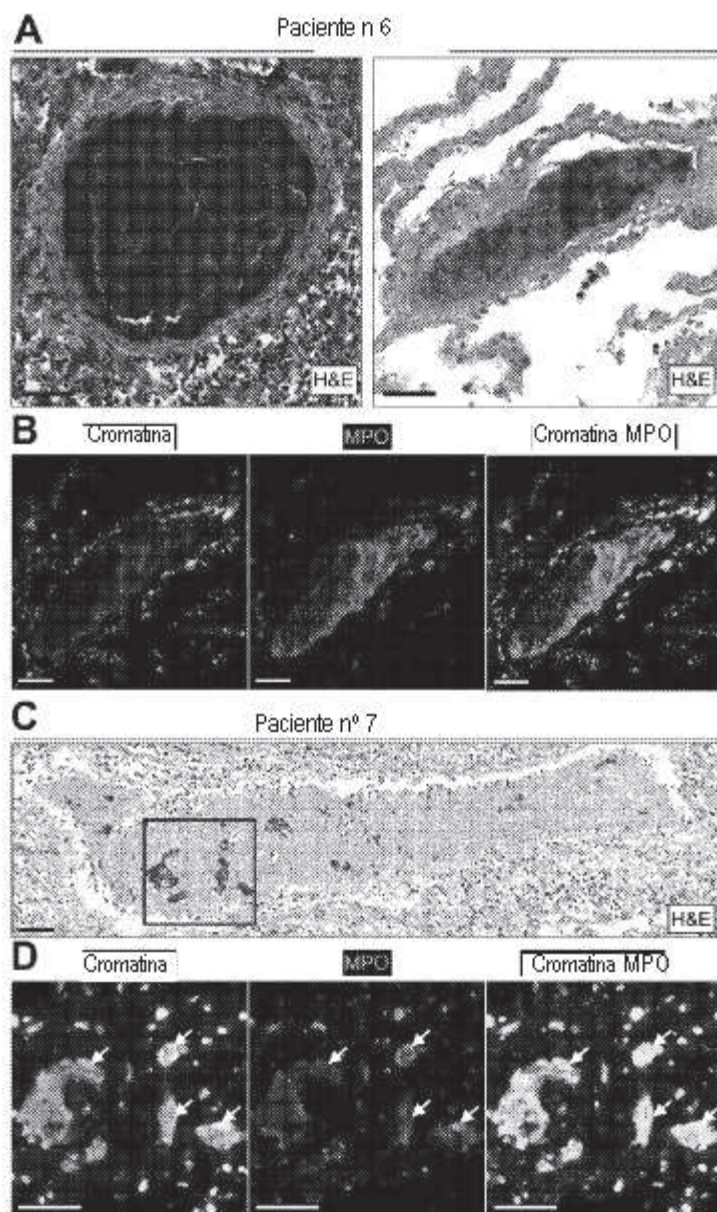
**FIG. 11A-FIG. 11D**

FIG. 12

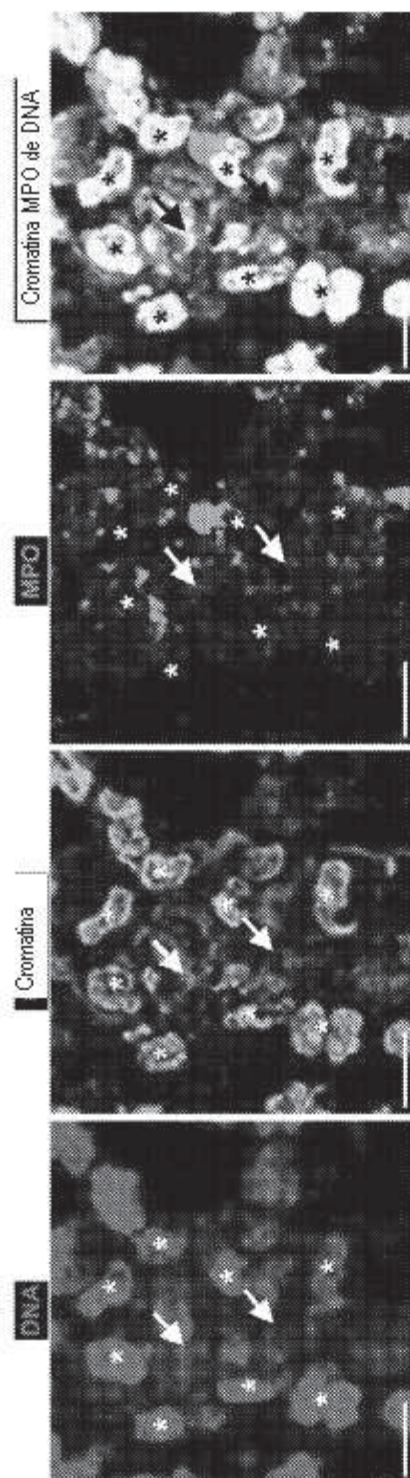


FIG. 13A-FIG. 13C

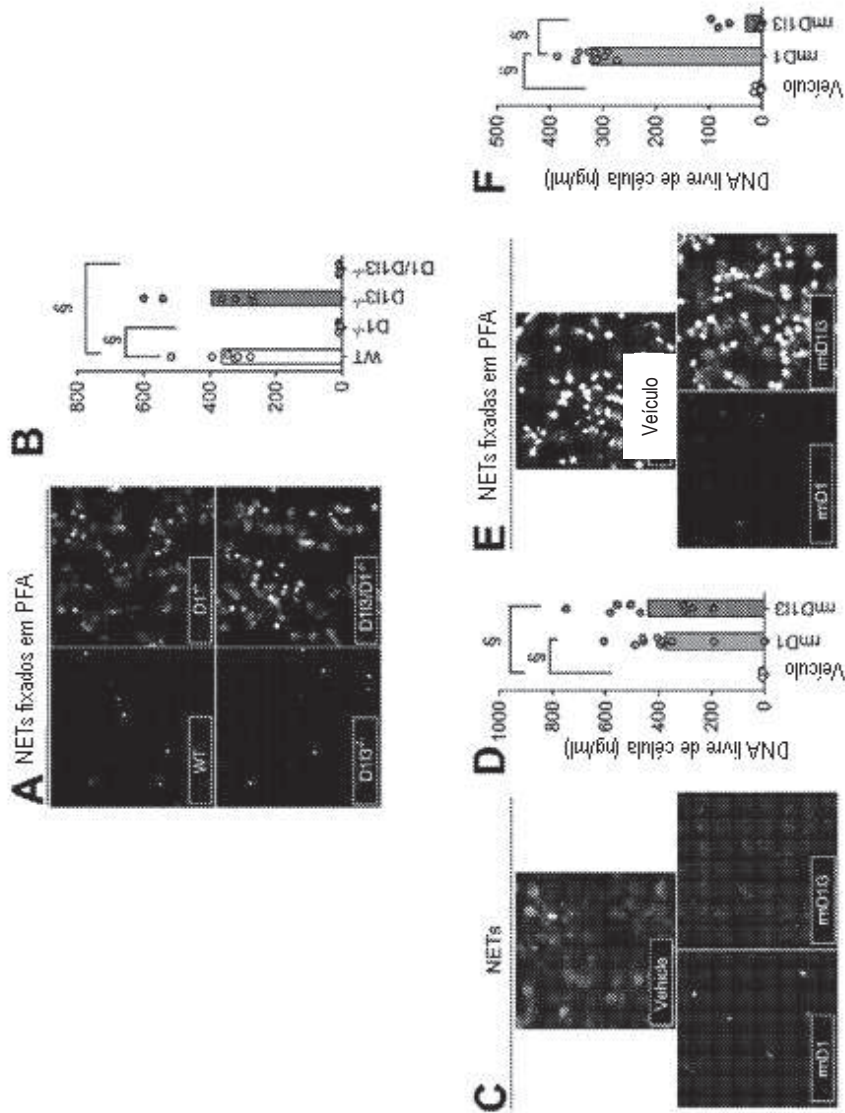


FIG. 14A-FIG. 14G

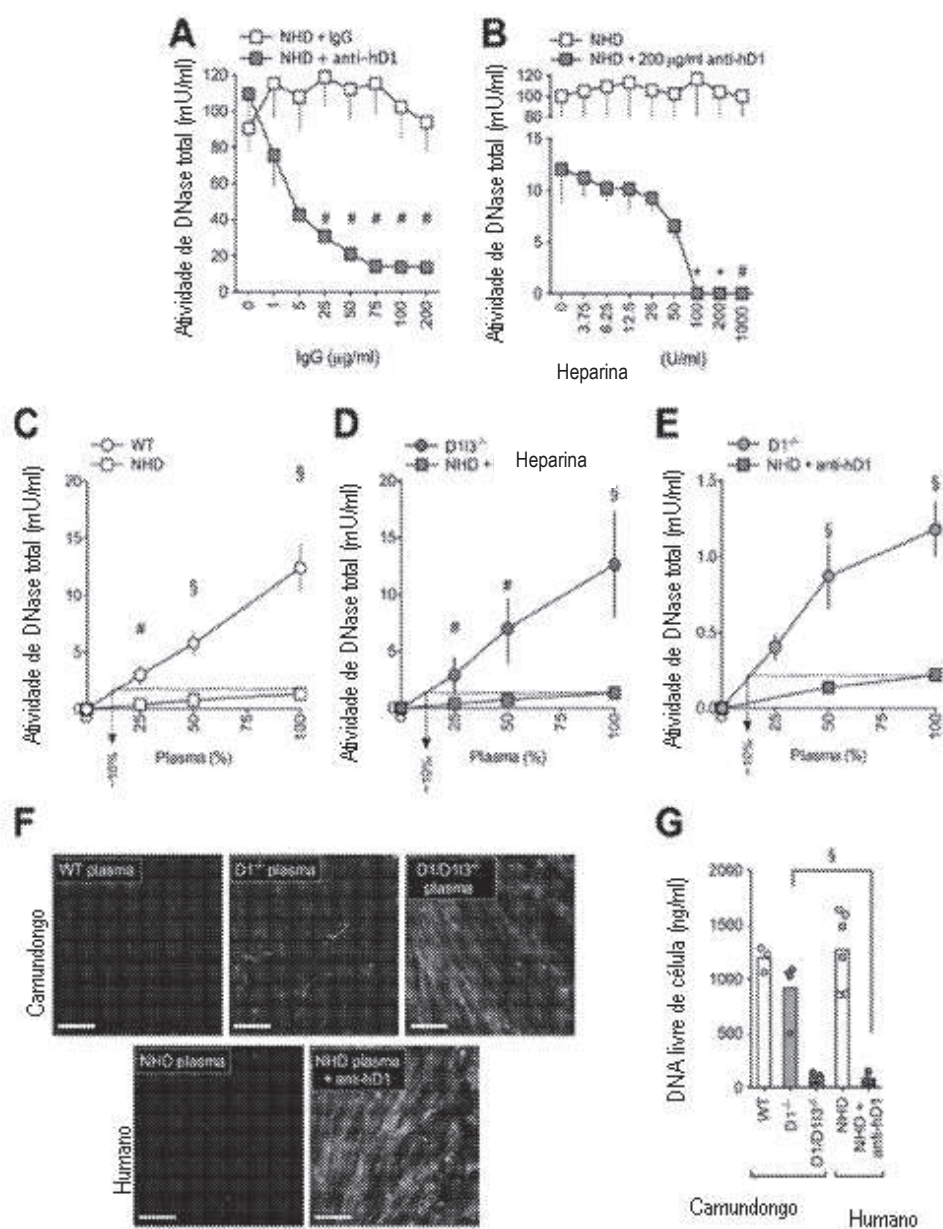
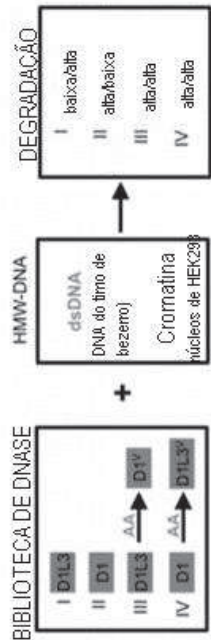


FIG. 15A-FIG. 15C



Abordagem de seleção in vitro para variantes de D1 e D1L3 hiperativas

A



Sistema mostrador: degradação de dsDNA e cromatina

B

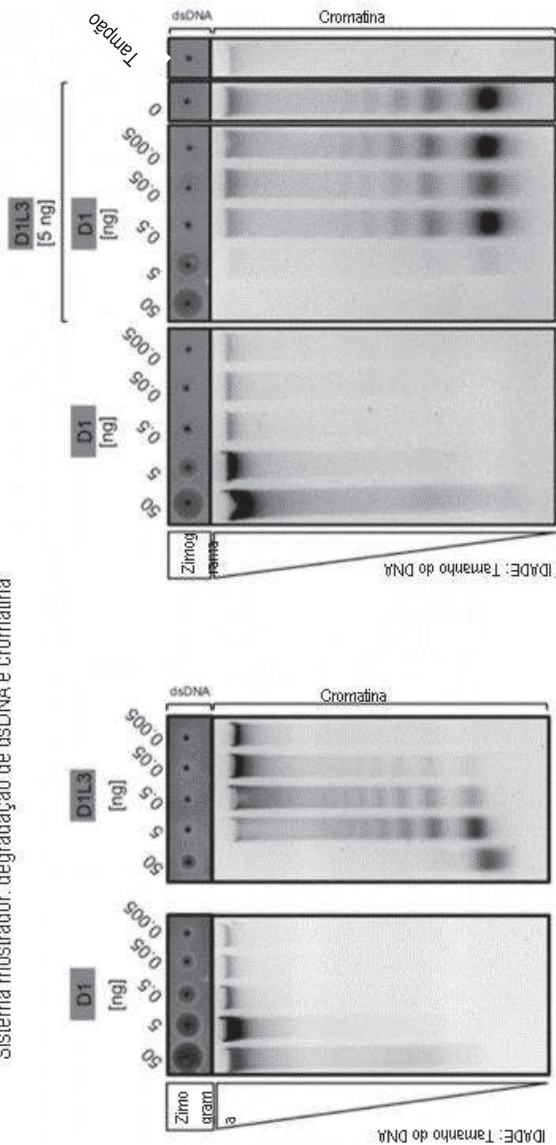


FIG. 16

FIG. 17



FIG. 18

| #  | DNase1L3    | DNase1      | Mutação na DNase                 | Analisado nesta aplicação |
|----|-------------|-------------|----------------------------------|---------------------------|
| 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<br>(D60_A61insR)     | +                         |
| 9  | R81 (R61)   | A81 (A59)   | A81R (A61R)                      | +                         |
| 10 | R92 (R72)   | P92 (P70)   | P92R (P70R)                      | +                         |
| 11 | K109 (K89)  | D109 (D87)  | D109K (D87K)                     | +                         |
| 12 | K114 (K94)  | V114 (V92)  | V114K (V92)                      | +                         |
| 13 | R115 (K95)  | D115 (D93)  | D115R (D92R)                     | +                         |
| 14 | K163 (K143) | A164 (A142) | A164K (A142K)                    | +                         |
| 15 | K176 (K156) | Q177 (Q155) | Q177K (Q115K)                    | +                         |
| 16 | K180 (K160) | G181 (G159) | G181K (G159K)                    | +                         |
| 17 | K199 (K179) | P200 (P178) | P200K (P178K)                    | -                         |
| 18 | K200 (K180) | S201 (S179) | S201K (S179K)                    | +                         |
| 19 | K203 (K183) | S204 (S182) | S204K (S182K)                    | +                         |
| 20 | R208 (R188) | W209 (W187) | W209R (W187R)                    | +                         |
| 21 | R212 (R192) | T213 (T191) | T213R (T191R)                    | +                         |
| 22 | K226 (K206) | -           | A226_T227insK<br>(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) | -           | -                                | -                         |

FIG. 19

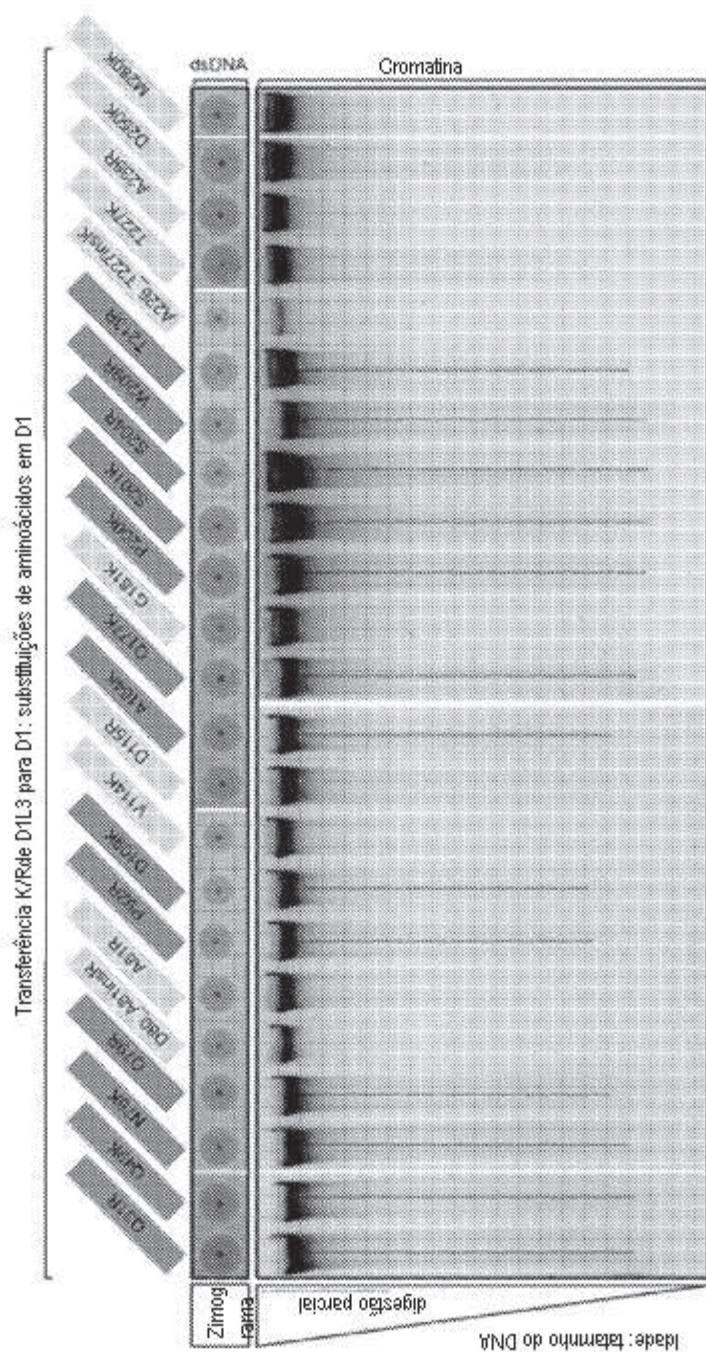


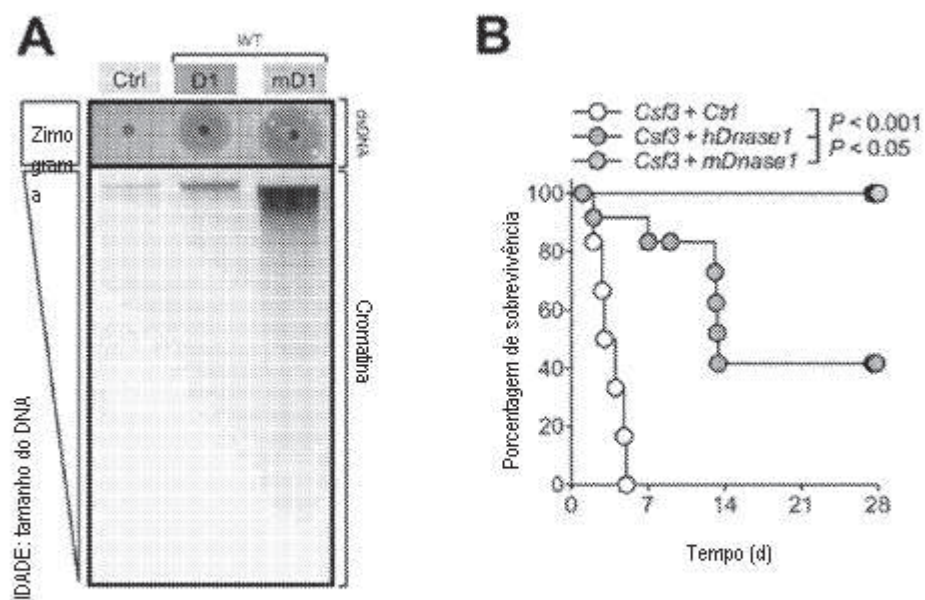
FIG. 20

|                      |                                 |       |      |
|----------------------|---------------------------------|-------|------|
| DNase1L3 humana      | Q31R                            | Q49K  | Q79R |
| Régua de sequência   | 1 10 20 30 40 50 60 70          |       |      |
| DNase1 de rato       | 1 10 20 30 40 50 60 70          |       |      |
| DNase1 de camundongo | 1 10 20 30 40 50 60 70          |       |      |
| DNase1 humana        | 1 10 20 30 40 50 60 70          |       |      |
| Régua de sequência   | 1 10 20 30 40 50 60 70          |       |      |
| DNase1L3 humana      | Q177K                           | W209R |      |
| Régua de sequência   | 80 90 100 110 120 130 140 150   |       |      |
| DNase1 de rato       | 80 90 100 110 120 130 140 150   |       |      |
| DNase1 de camundongo | 80 90 100 110 120 130 140 150   |       |      |
| DNase1 humana        | 80 90 100 110 120 130 140 150   |       |      |
| Régua de sequência   | 80 90 100 110 120 130 140 150   |       |      |
| DNase1L3 humana      | Q177K                           | W209R |      |
| Régua de sequência   | 160 170 180 190 200 210 220 230 |       |      |
| DNase1 de rato       | 160 170 180 190 200 210 220 230 |       |      |
| DNase1 de camundongo | 160 170 180 190 200 210 220 230 |       |      |
| DNase1 humana        | 160 170 180 190 200 210 220 230 |       |      |
| Régua de sequência   | 160 170 180 190 200 210 220 230 |       |      |
| DNase1L3 humana      | G262K                           |       |      |
| Régua de sequência   | 240 250 260 270 280 290 300     |       |      |
| DNase1 de rato       | 240 250 260 270 280 290 300     |       |      |
| DNase1 de camundongo | 240 250 260 270 280 290 300     |       |      |
| DNase1 humana        | 240 250 260 270 280 290 300     |       |      |
| Régua de sequência   | 240 250 260 270 280 290 300     |       |      |

Peptídeo sinal

Resíduo de K/R em D1L3, presente em D1 de murino ou rato, ausente em D1 de humano

FIG. 21



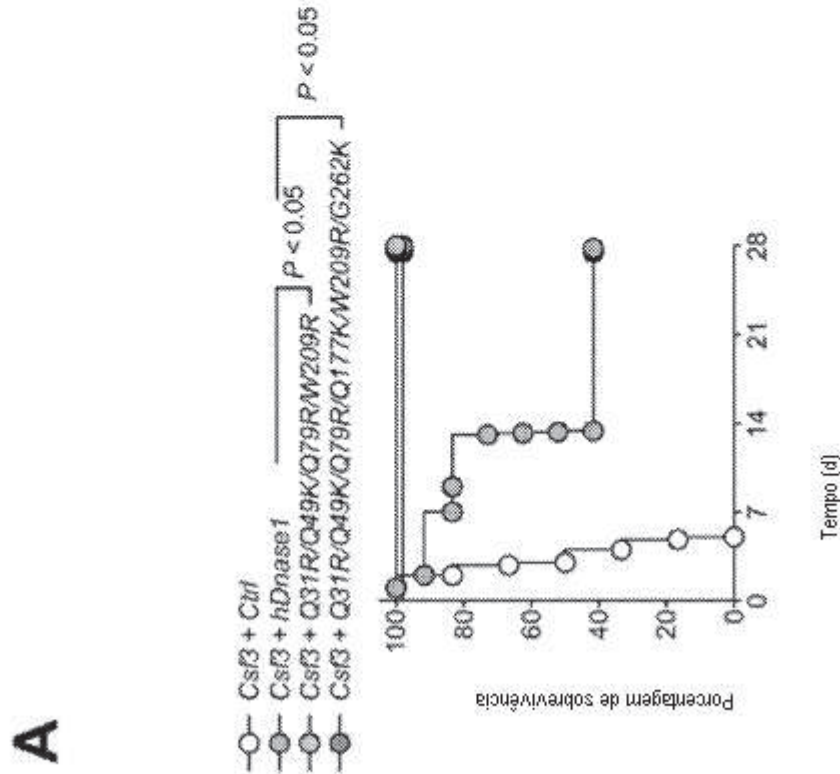
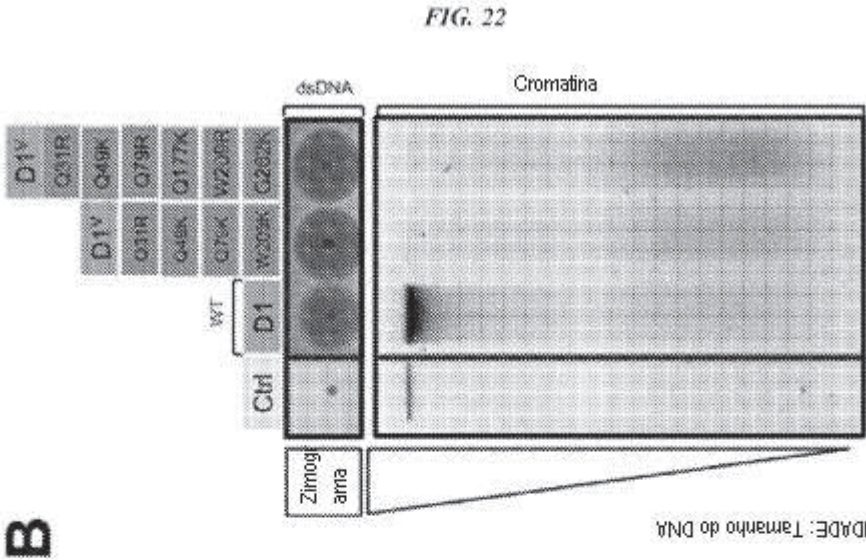


FIG. 23

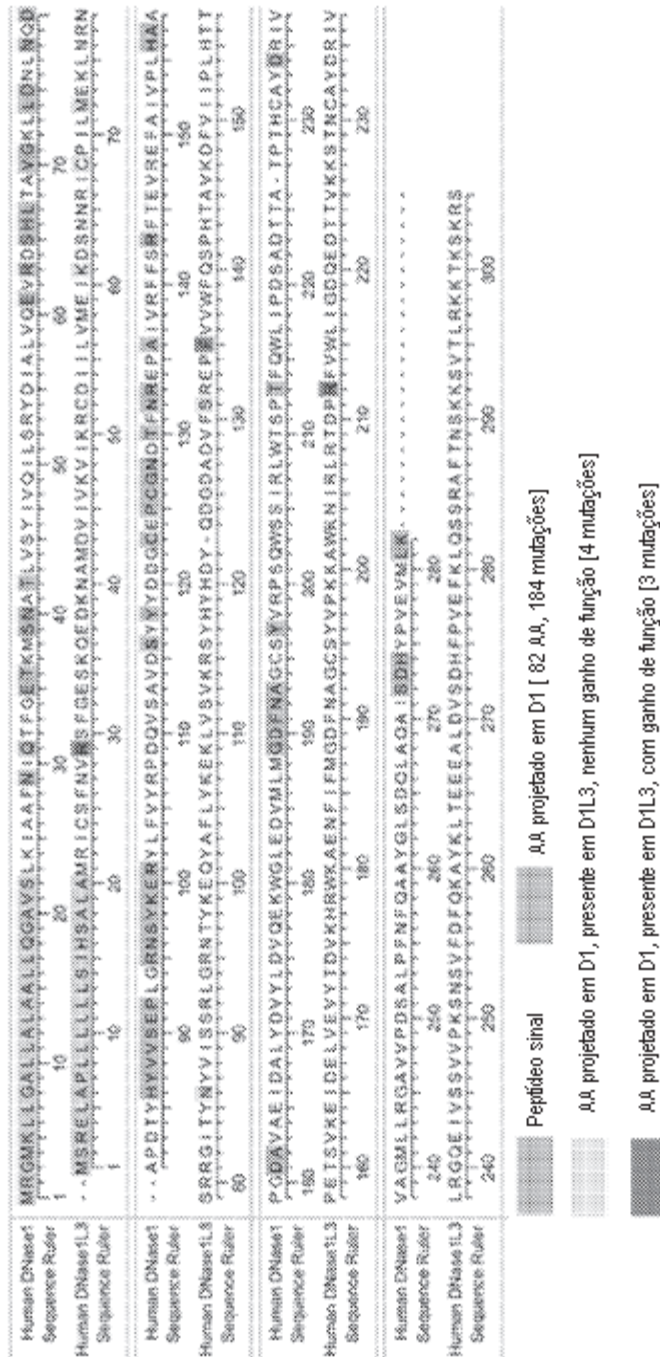


FIG. 24

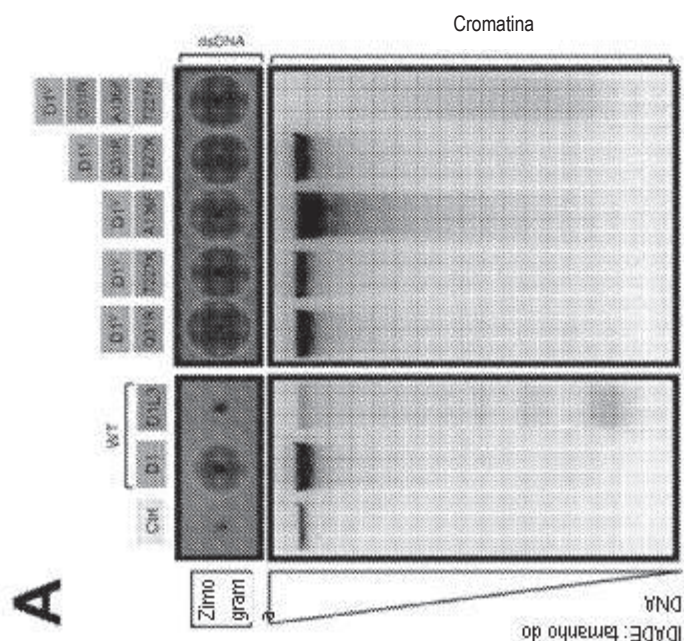
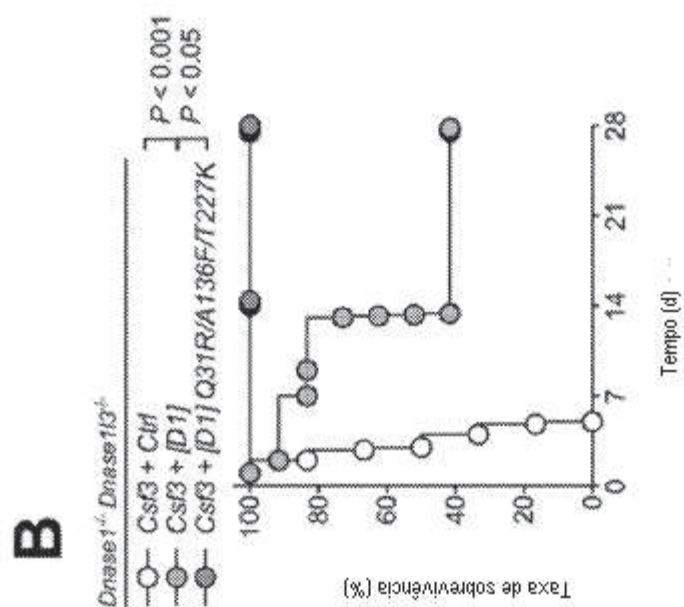


FIG. 25

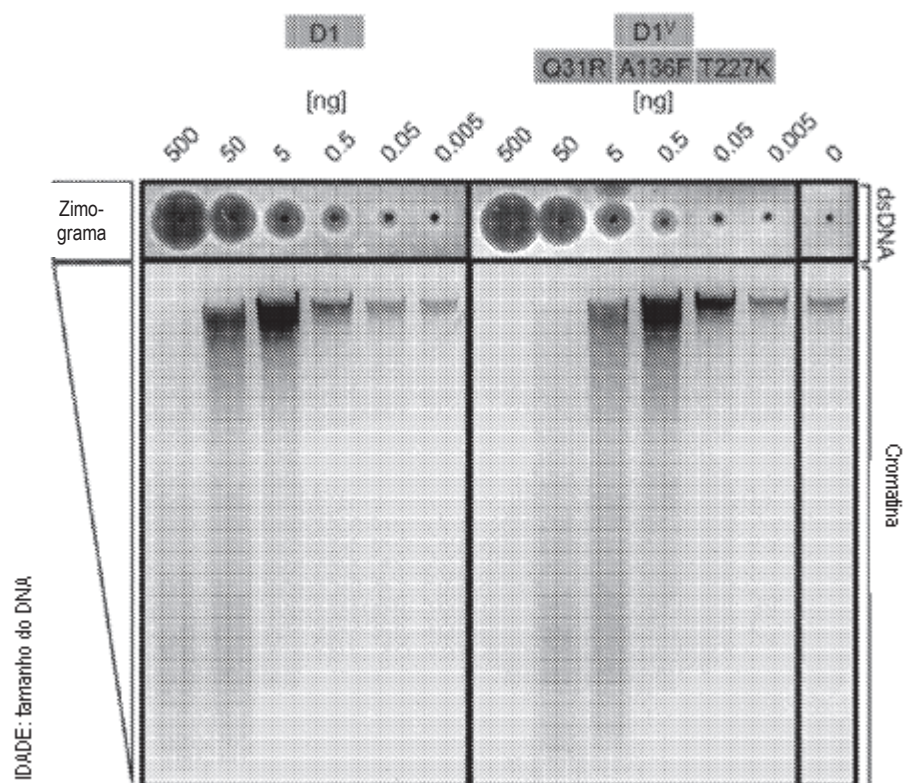


FIG. 26

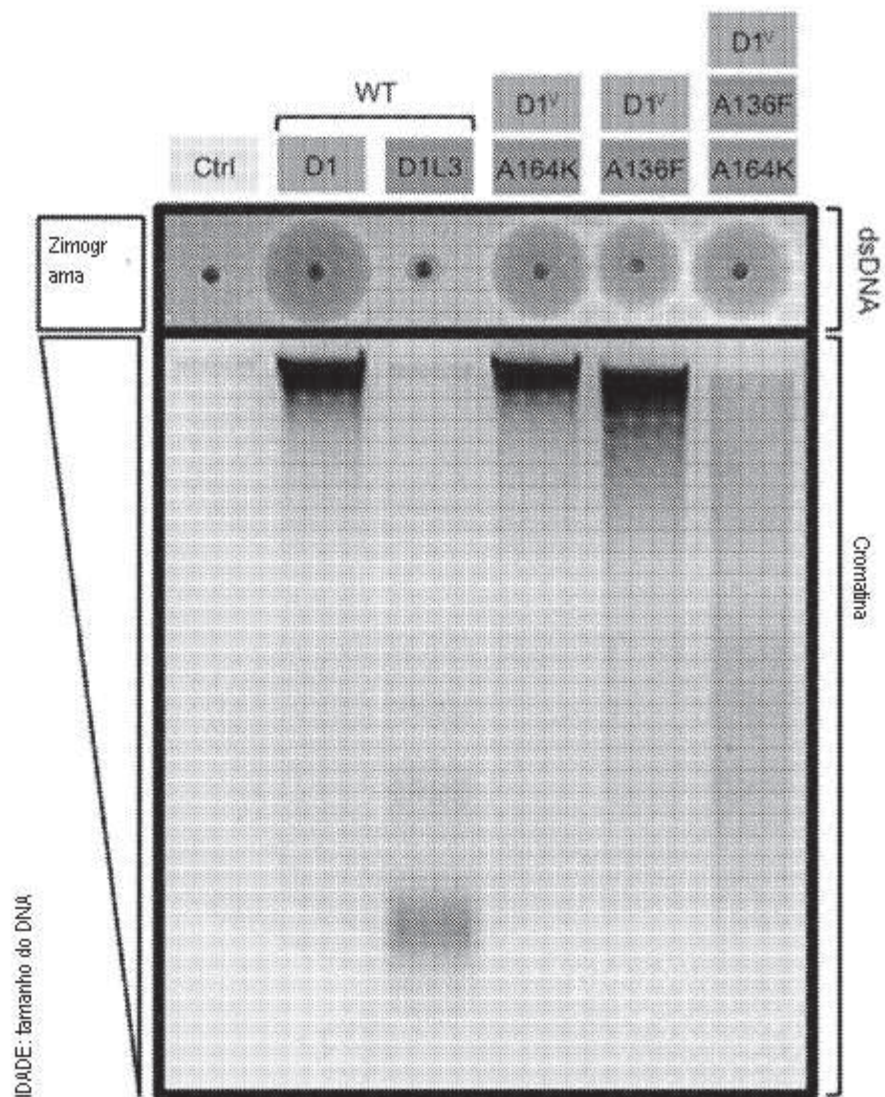


FIG. 27

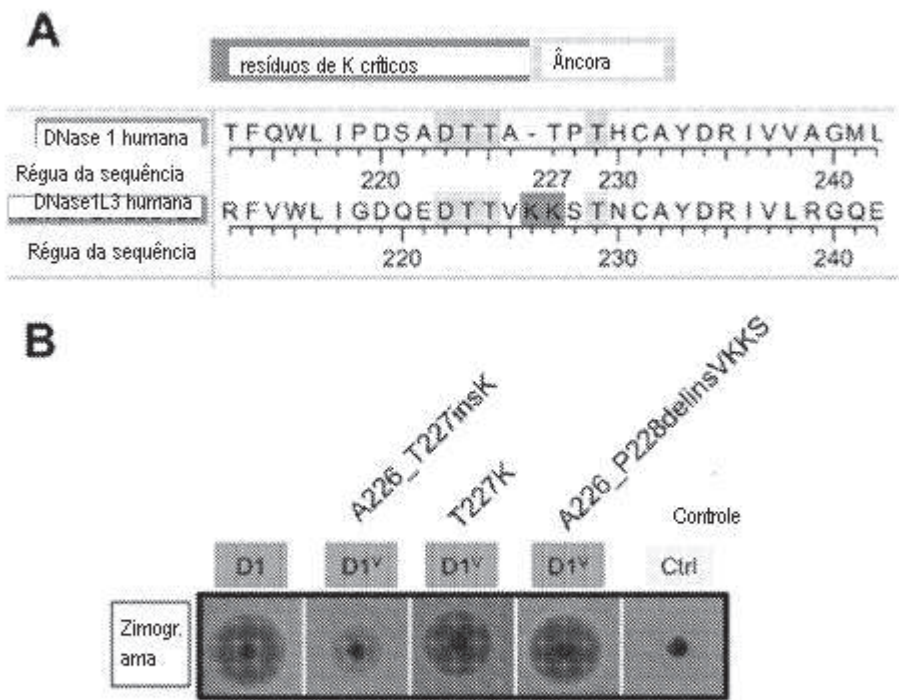


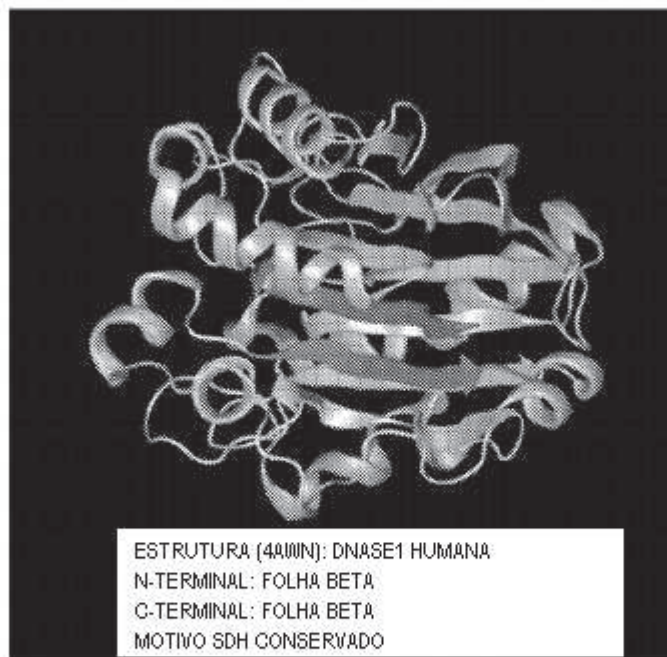
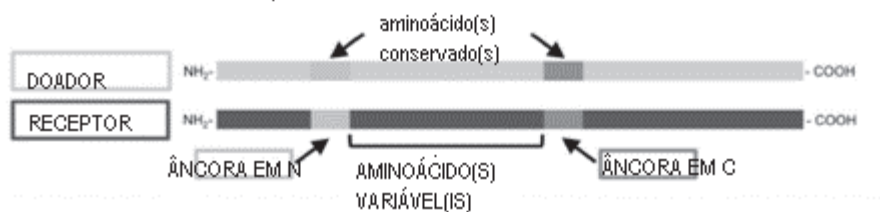
*FIG. 28*

FIG. 29

## PROJETO DE BLOCOS DE CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

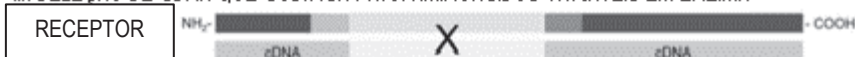
## I. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS HOMÓLOGAS



## II. EXCISÃO DE CDNA QUE CODIFICA PARA AMINOÁCIDOS VARIÁVEIS EM ENZIMA DOADORA



## III. DELEÇÃO DE CDNA QUE CODIFICA PARA AMINOÁCIDOS VARIÁVEIS EM ENZIMA



## IV. TRANSFERÊNCIA DE CDNA DA ENZIMA DOADORA PARA A RECEPTORA



FIG. 30

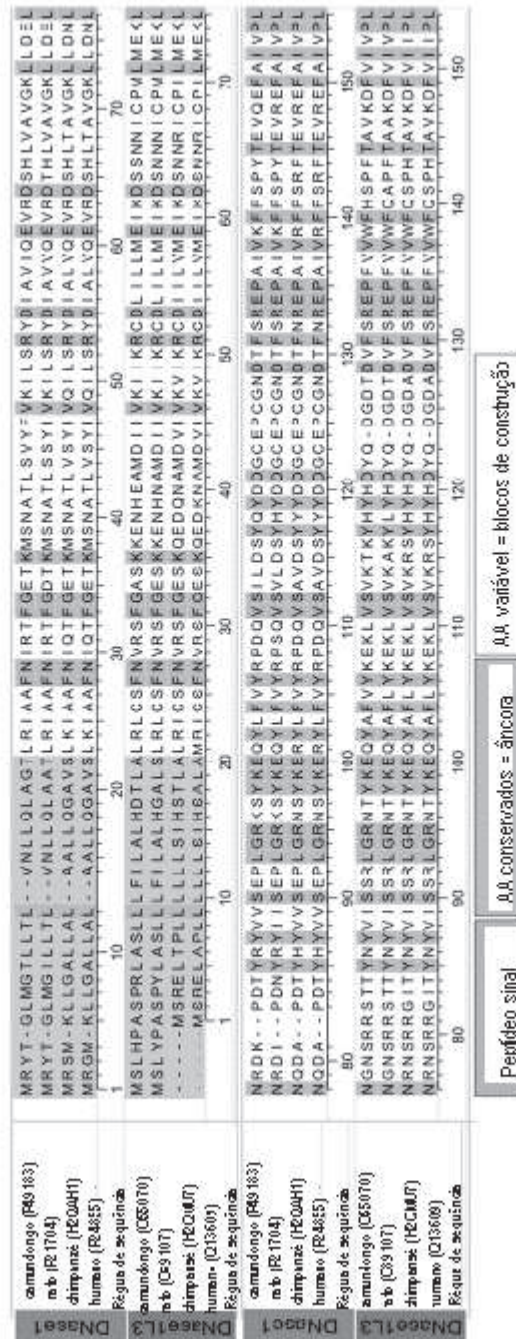


FIG. 30, continuação

|                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| amandongo (P49183)<br>n.b. (R21704)<br>chimpanzé (H004H1)<br>humano (R24815)                       | HAAPTEAVSEIDALYDVYLDVWCKWGLEIMFMGDFNAGCSYVTSQWSSRLRTSPFQWLPDSADTTVT-STHCAYD<br>HSAPTEAVSEIDALYDVYLDVWCKWGLEIMFMGDFNAGCSYVTSQWSSRLRTSPFQWLPDSADTTAT-STHCAYD<br>HAAPGDVAEIDALYDVYLDVWCKWGLEIMFMGDFNAGCSYVTSQWSSRLRTSPFQWLPDSADTTAT-PTHCAYD<br>HAAPGDVAEIDALYDVYLDVWCKWGLEIMFMGDFNAGCSYVTSQWSSRLRTSPFQWLPDSADTTAT-PTHCAYD    | 160 170 180 190 200 210 220 230    |
| Régua de sequência<br>amandongo (C53070)<br>n.b. (C59107)<br>chimpanzé (H004H1)<br>humano (Q13609) | HTTPETSVKEIDELVDVYTDVRSQWKTFNFMGDFNAGCSYVPPKAWKNRLRTDPEFVWLGGQEDTIVKKSTSCAYD<br>HTTPETSVKEIDELVDVYTDVRRWKAENFMGDFNAGCSYVPPKAWKNRLRTDPEFVWLGGQEDTIVKKSTSCAYD<br>HTTPETSVKEIDELVEVYTDVHRWKAENFMGDFNAGCSYVPPKAWKNRLRTDPEFVWLGGQEDTIVKKSTSCAYD<br>HTTPETSVKEIDELVEVYTDVHRWKAENFMGDFNAGCSYVPPKAWKNRLRTDPEFVWLGGQEDTIVKKSTSCAYD | 160 170 180 190 200 210 220 230    |
| Régua de sequência<br>amandongo (P49183)<br>n.b. (R21704)<br>chimpanzé (H004H1)<br>humano (R24815) | RIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDQAEYGLSNQLAEALSDHYPVEVTLRKI-<br>RIVVAGALLQAAVVPNSAVPFDQAEYRLTNMAEALSDHYPVEVTLRKI-<br>RIVVAGMLLQGAVVPDPSALPFNFQAAAYGSDQLAQALSDHYPVEVMLK-<br>RIVVAGMLLQGAVVPDPSALPFNFQAAAYGSDQLAQALSDHYPVEVMLK-                                                                                                       | 240 250 260 270 280                |
| Régua de sequência<br>amandongo (C53070)<br>n.b. (C59107)<br>chimpanzé (H004H1)<br>humano (Q13609) | RIVLCGQELVNSVVPNSVGVFDQKAYDSEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNRRKSVSLKRRKKGNRS<br>RIVLRGQELVNSVVPNSVGVFDQKAYEISEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNRRKSVSLKRRKKGNRS<br>RIVLRGQELVSSVVPNSVGVFDQKAYKITEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNRRKSVTLRKKTKSRS<br>RIVLRGQELVSSVVPNSVGVFDQKAYKITEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNRRKSVTLRKKTKSRS                         | 240 250 260 270 280 290 300        |
| Peptídeo sinal                                                                                     | AA conservados = âncora                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | AA variável = blocos de construção |

FIG. 31

**A Exemplo de projeto de blocos de construção:** variantes de DNase1 humana (D1) com blocos de construção de DNase1 L3 humana (D1 L3)

| BB # | Âncora em N de D1:AA conservado em D1 | Âncoras em C de D1:AA conservados em D1 | Blocos de construção de D1:AA variável em D1 | Blocos de construção de D1 L3:AA variável em D1 L3 | Misturas de blocos de construção de variantes de D1 | Grupo                 |
|------|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|
| 0    | N/A                                   | N/A                                     | 1-22 (MRGNKLL GALLAALLOGAVS)                 | 1-20 (MSRELAPILLLLSHSALA)                          | M1_S22delinsMSRELAPLLL LLLSHSALA                    | BB <sub>0</sub>       |
| 1    | peptidocical F28/N29                  | F28/N29                                 | 23-27 (LKIAA)                                | 21-25 (MRICS)                                      | L23_A27delinsMRICS                                  | BB <sub>1-3</sub>     |
| 2    | F33/G34                               | F33/G34                                 | 30-32 (IQIT)                                 | 26-30 (VRS)                                        | I30_T32delinsVRS                                    | BB <sub>4</sub>       |
| 3    | F33/G34                               | K37                                     | 35-36 (ET)                                   | 33-34 (ES)                                         | E35_T36delinsES                                     | BB <sub>5-7</sub>     |
| 4    | K37                                   | V48                                     | 38-47 (MSNATLVSYI)                           | 36-45 (QEDKNAMDI)                                  | M38_I47delinsQEDKNAMDI                              | BB <sub>8-10</sub>    |
| 5    | V48                                   | R53                                     | 49-52 (QILS)                                 | 47-50 (KVIK)                                       | Q49_S52delinsKVIK                                   | BB <sub>11</sub>      |
| 6    | R53                                   | D55                                     | 54 (Y)                                       | 52 (C)                                             | Y54C                                                | BB <sub>12-14</sub>   |
| 7    | D55                                   | E61                                     | 56-60 (IALVQ)                                | 54-58 (ILLVM)                                      | I56_Q60delinsILLVM                                  | BB <sub>15-18</sub>   |
| 8    | E61                                   | D64                                     | 62-63 (VR)                                   | 60-61 (IK)                                         | V62_R63delinsIK                                     | BB <sub>19-22</sub>   |
| 9    | D64                                   | L73                                     | 65-72 (SHLTAVGK)                             | 63-70 (SNNRICPI)                                   | S65_K72delinsSNNRICPI                               | BB <sub>23-26</sub>   |
| 10   | L73                                   | L77/N78                                 | 74-76 (LDN)                                  | 72-74 (MEK)                                        | L74_N76delinsMEK                                    | BB <sub>27-34</sub>   |
| 11   | L77/N78                               | Y85                                     | 79-84 (QDAPDI)                               | 77-84 (RNSRRGIT)                                   | Q79_T84delinsRNSRRGIT                               | BB <sub>35-38</sub>   |
| 12   | Y85                                   | Y87                                     | 86 (H)                                       | 86 (N)                                             | H86N                                                | BB <sub>39-42</sub>   |
| 13   | Y87                                   | S90                                     | 88-89 (VW)                                   | 88-89 (VI)                                         | V88_Y89delinsVI                                     | BB <sub>43-46</sub>   |
| 14   | S90                                   | L93/G94/R95                             | 91-92 (EP)                                   | 91-92 (SR)                                         | E91_P92delinsSR                                     | BB <sub>47-50</sub>   |
| 15   | L93/G94/R95                           | Y98/K99/E100                            | 96-97 (NS)                                   | 96-97 (NT)                                         | N96_S97delinsNT                                     | BB <sub>51-54</sub>   |
| 16   | Y98/K99/E100                          | Y102                                    | 101 (R)                                      | 101 (Q)                                            | R101Q                                               | BB <sub>55-58</sub>   |
| 17   | Y102                                  | F104                                    | 103 (L)                                      | 103 (A)                                            | L103A                                               | BB <sub>59-62</sub>   |
| 18   | F104                                  | Y106                                    | 105 (V)                                      | 105 (L)                                            | V105L                                               | BB <sub>63-66</sub>   |
| 19   | Y106                                  | V111/S112                               | 107-110 (RFDO)                               | 107-110 (KEKL)                                     | R107_Q110delinsKEKL                                 | BB <sub>67-70</sub>   |
| 20   | Y111/S112                             | Y117                                    | 113-116 (ANDS)                               | 113-116 (VKRS)                                     | A113_S116delinsVKRS                                 | BB <sub>71-74</sub>   |
| 21   | Y117                                  | Y119                                    | 118 (Y)                                      | 118 (H)                                            | Y118H                                               | BB <sub>75-78</sub>   |
| 22   | Y119                                  | D121                                    | 120 (D)                                      | 120 (H)                                            | D120H                                               | BB <sub>79-82</sub>   |
| 23   | D121                                  | D129                                    | 122-128 (GCE>CGN)                            | 122-127 (YODGDA)                                   | G122_N128delinsYODGDA                               | BB <sub>83-86</sub>   |
| 24   | D129                                  | F131                                    | 130 (T)                                      | 129 (V)                                            | T130S                                               | BB <sub>87-90</sub>   |
| 25   | F131                                  | R133/E134/P135                          | 132 (N)                                      | 131 (S)                                            | N132S                                               | BB <sub>91-94</sub>   |
| 26   | R133/E134/P135                        | V138                                    | 136-137 (AI)                                 | 135-136 (FV)                                       | A136_I137delinsFV                                   | BB <sub>95-98</sub>   |
| 27   | V138                                  | F140                                    | 139 (R)                                      | 138 (W)                                            | R139W                                               | BB <sub>99-102</sub>  |
| 28   | F140                                  | T145                                    | 141-144 (FSRF)                               | 140-143 (QSPH)                                     | F141_F144delinsQSPH                                 | BB <sub>103-106</sub> |
| 29   | T145                                  | F150                                    | 146-149 (EVRE)                               | 145-148 (AVKD)                                     | E146_E149delinsAVKD                                 | BB <sub>107-110</sub> |
| 30   | F150                                  | I152                                    | 151 (A)                                      | 150 (V)                                            | A151V                                               | BB <sub>111-114</sub> |
| 31   | I152                                  | P154/L155/H156                          | 153 (V)                                      | 152 (I)                                            | V153I                                               | BB <sub>115-118</sub> |
| 32   | P154/L155/H156                        | P159                                    | 157-158 (AA)                                 | 156-157 (TT)                                       | A157_A158delinsTT                                   | BB <sub>119-122</sub> |
| 33   | P159                                  | V163                                    | 160-162 (GDA)                                | 159-161 (ETS)                                      | G160_A162delinsETS                                  | BB <sub>123-126</sub> |
| 34   | V163                                  | E165/I166/D167                          | 164 (A)                                      | 163 (K)                                            | A164K                                               | BB <sub>127-130</sub> |

FIG. 31  
continuação

A: continuação

| BB # | Âncora em N de D1:AA conservado em D1 | Âncora em C de D1:AA conservado em D1 | Blocos de construção de D1:AA variável em D1 | Blocos de construção de D1:AA variável em D1L3 | Mutações do bloco de construção de variantes de D1 | Grupo BB            |
|------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------|
| 35   | L169                                  | E169                                  | 168 (A)                                      | 167 (E)                                        | A168E                                              | BB <sub>55-57</sub> |
| 36   | V172/Y173                             | V172/Y173                             | 170-171 (YD)                                 | 169-171 (VE)                                   | Y170_C171delinsVE                                  |                     |
| 37   | V172/Y173                             | D175/V176                             | 174 (L)                                      | 173 (T)                                        | L174T                                              |                     |
| 38   | D175/V176                             | W180                                  | 177-179 (QEK)                                | 176-178 (KHR)                                  | Q177_K179delinsKHR                                 |                     |
| 39   | W180                                  | E183                                  | 181-182 (GL)                                 | 180-181 (KA)                                   | G181_L182delinsKA                                  | BB <sub>38-40</sub> |
| 40   | E183                                  | M187-GDFNAGCSY-V198                   | 184-187 (DVNL)                               | 183-187 (NFIF)                                 | D184_L187delinsNFIF                                |                     |
| 41   | M187-GDFNAGCSY-V198                   | W203                                  | 199-202 (RPSQ)                               | 198-201 (PKKA)                                 | R199_Q202delinsPKKA                                |                     |
| 42   | W203                                  | I206/R207/L208                        | 204-205 (SS)                                 | 203-204 (KN)                                   | S204_S205delinsKN                                  |                     |
| 43   | I206/R207/L208                        | T210                                  | 209 (W)                                      | 208 (R)                                        | W209R                                              |                     |
| 44   | T210                                  | P212                                  | 211 (S)                                      | 210 (D)                                        | S211D                                              | BB <sub>41-48</sub> |
| 45   | P212                                  | F214                                  | 213 (T)                                      | 212 (R)                                        | T213R                                              |                     |
| 46   | F214                                  | W216/L217/I218                        | 215 (Q)                                      | 214 (V)                                        | Q215V                                              |                     |
| 47   | W216/L217/I218                        | D220                                  | 219 (P)                                      | 218 (G)                                        | P219G                                              |                     |
| 48   | D220                                  | D223/T224/T225                        | 221-222 (SA)                                 | 220-221 (QE)                                   | S221_A222delinsQE                                  |                     |
| 49   | D223/T224/T225                        | T229                                  | 226-228 (ATP)                                | 225-228 (VKKS)                                 | A226_P228delinsVKKS                                | BB <sub>49</sub>    |
| 50   | T229                                  | C231-AYDRI-V237                       | 230 (H)                                      | 230 (N)                                        | H230N                                              |                     |
| 51   | C231-AYDRI-V237                       | G240                                  | 238-239 (VA)                                 | 238-239 (LR)                                   | V238_A239delinsLR                                  |                     |
| 52   | G240                                  | V247/N248/P249                        | 241-246 (MLLRGA)                             | 241-246 (QEVSS)                                | M241_A246delinsQEVSS                               | BB <sub>50-54</sub> |
| 53   | V247/N248/P249                        | S251                                  | 250 (D)                                      | 250 (K)                                        | D250K                                              |                     |
| 54   | S251                                  | F255                                  | 252-254 (ALP)                                | 252-254 (NSV)                                  | A252_P254delinsNSV                                 |                     |
| 55   | F255                                  | F257/Q258                             | 256 (N)                                      | 256 (D)                                        | M256D                                              |                     |
| 56   | F257/Q258                             | Y261                                  | 259-260 (AA)                                 | 259-260 (KA)                                   | A259_A260delinsKA                                  |                     |
| 57   | Y261                                  | L263                                  | 262 (G)                                      | 262 (K)                                        | G262K                                              | BB <sub>55-59</sub> |
| 58   | L263                                  | A268                                  | 264-267 (SDOL)                               | 264-267 (TEEE)                                 | S264_L267delinsTEEE                                |                     |
| 59   | A268                                  | S272/D273/H274                        | 269-271 (QAI)                                | 269-271 (LDV)                                  | Q269_I271delinsLDV                                 |                     |
| 60   | S272/D273/H274                        | P276/V277/E278                        | 275 (Y)                                      | 275 (F)                                        | Y275F                                              |                     |
| 61   | P276/V277/E278                        | L281                                  | 279-280 (VM)                                 | 279-280 (FK)                                   | V279_M280delinsFK                                  |                     |
| 62   | L281                                  | -                                     | 282 (K)                                      | 282-305<br>(QSSRAFTNSKK<br>SVTLRKKTKSKRS)      | K282delinsQSSRAFTNSKKSVTLRKKTKSKRS                 | BB <sub>60-62</sub> |

FIG. 31  
continuação

**B** Exemplo de projeto de blocos de construção: variantes de DNase1L3 humana (D1L3) com blocos de construção de DNase1 humana (D1)

| BB # | Átomo em N de D1L3:<br>AA conservado em D1 | Átomo em C de D1L3:<br>AA conservado em D1 | Bloco de construção de D1L3: AA<br>variante em D1L3 | Bloco de construção de D1: AA<br>em D1 | Mutação do bloco de construção de<br>variante de D1L3 | Capo<br>na          |
|------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------|
| 0    | N/A                                        | N/A                                        | 1-20 (MSRELAPLLLLLSIHSA)                            | 1-22 (MRGNKLL<br>GALLAALLOGAVS)        | MT <sub>12</sub> delinsMRGMKLLGALLALA<br>ALLOGAVS     | BB <sub>0</sub>     |
| 1    | Rep. bloco anal.                           | F26N27                                     | 21-25 (MRICS)                                       | 23-27 (LKAA)                           | M21_S25delinsLKAA                                     |                     |
| 2    | F26N27                                     | F31G32                                     | 26-30 (VRS)                                         | 30-32 (IQT)                            | V26_S30delinsIQT                                      | BB <sub>1,3</sub>   |
| 3    | F33G34                                     | K35                                        | 33-34 (ES)                                          | 35-36 (ET)                             | E33_S34delinsET                                       |                     |
| 4    | K35                                        | V46                                        | 36-45 (QEDKNAMDI)                                   | 38-47 (MSNATLVSYI)                     | Q36_H45delinsMSNATLVSYI                               | BB <sub>4</sub>     |
| 5    | V46                                        | R51                                        | 47-50 (KV/K)                                        | 49-52 (QILS)                           | K47_K50delinsOILS                                     |                     |
| 6    | R51                                        | D53                                        | 52 (C)                                              | 54 (Y)                                 | C52Y                                                  | BB <sub>5,7</sub>   |
| 7    | D53                                        | E59                                        | 54-58 (ILVM)                                        | 56-60 (IALVQ)                          | I54_M58delinsIALVQ                                    |                     |
| 8    | E59                                        | D62                                        | 60-61 (IK)                                          | 62-63 (VR)                             | I60_K61delinsVR                                       |                     |
| 9    | D62                                        | L71                                        | 63-70 (SNNRICPI)                                    | 65-72 (SHLTAVGK)                       | S63_I70delinsSHLTAVGK                                 | BB <sub>8,10</sub>  |
| 10   | L71                                        | L75N76                                     | 72-74 (MEK)                                         | 74-76 (LDN)                            | M72_K74delinsLDN                                      |                     |
| 11   | L75N76                                     | Y85                                        | 77-84 (RNSRRGIT)                                    | 79-84 (QDAPDT)                         | R77_T84delinsQDAPDT                                   | BB <sub>11</sub>    |
| 12   | Y85                                        | Y87                                        | 86 (N)                                              | 86 (H)                                 | N86H                                                  |                     |
| 13   | Y87                                        | S90                                        | 88-89 (VI)                                          | 88-89 (VV)                             | V88_I89delinsVV                                       | BB <sub>12,14</sub> |
| 14   | S90                                        | L93/G94/R95                                | 91-92 (SR)                                          | 91-92 (EP)                             | S91_R92delinsEP                                       |                     |
| 15   | L93/G94/R95                                | Y98/K99/E100                               | 96-97 (NT)                                          | 96-97 (NS)                             | N96_T97delinsNS                                       |                     |
| 16   | Y98/K99/E100                               | Y102                                       | 101 (Q)                                             | 101 (R)                                | Q101R                                                 |                     |
| 17   | Y102                                       | F104                                       | 103 (A)                                             | 103 (L)                                | A103L                                                 | BB <sub>15-18</sub> |
| 18   | F104                                       | Y106                                       | 105 (L)                                             | 105 (V)                                | L105V                                                 |                     |
| 19   | Y106                                       | V111/S112                                  | 107-110 (KEKL)                                      | 107-110 (RPDQ)                         | K107_L110delinsRPDQ                                   |                     |
| 20   | V111/S112                                  | Y117                                       | 113-116 (VKRS)                                      | 113-116 (AVDS)                         | V113_S116delinsAVDS                                   | BB <sub>19,22</sub> |
| 21   | Y117                                       | Y119                                       | 118 (H)                                             | 118 (Y)                                | H118Y                                                 |                     |
| 22   | Y119                                       | D121                                       | 120 (H)                                             | 120 (D)                                | H120D                                                 |                     |
| 23   | D121                                       | D126                                       | 122-127 (YQGGDA)                                    | 122-128 (GCEPGN)                       | Y122_A127delinsGCEPGN                                 | BB <sub>23,25</sub> |
| 24   | D126                                       | F130                                       | 129 (V)                                             | 130 (T)                                | V129T                                                 |                     |
| 25   | F130                                       | R132/E133/P134                             | 131 (S)                                             | 132 (N)                                | S131N                                                 | BB <sub>26</sub>    |
| 26   | R132/E133/P134                             | V137                                       | 135-136 (FV)                                        | 136-137 (AI)                           | I35F_136VdelinsAI                                     |                     |
| 27   | V137                                       | F139                                       | 138 (W)                                             | 139 (R)                                | W139R                                                 |                     |
| 28   | F139                                       | T144                                       | 140-143 (QSPH)                                      | 141-144 (FSRF)                         | Q140_H143delinsFSRF                                   |                     |
| 29   | T144                                       | F149                                       | 145-148 (AVKD)                                      | 146-149 (EVRE)                         | A145_D148delinsAVRD                                   |                     |
| 30   | F149                                       | I151                                       | 150 (V)                                             | 151 (A)                                | V150A                                                 |                     |
| 31   | I151                                       | P153/L154/H155                             | 152 (I)                                             | 153 (V)                                | I152V                                                 | BB <sub>27,34</sub> |
| 32   | P153/L154/H155                             | P157                                       | 156-157 (IT)                                        | 157-158 (AA)                           | T156_T157delinsAA                                     |                     |
| 33   | P157                                       | V162                                       | 159-161 (ETS)                                       | 160-162 (GDA)                          | E159_S161delinsGDA                                    |                     |
| 34   | V162                                       | E164/H165/D166                             | 163 (K)                                             | 164 (A)                                | K163A                                                 |                     |

FIG. 31  
continuação

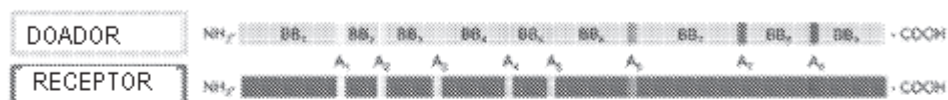
## B: continuação

| BB # | Âncora em H de D1L3: AA conservados de D1L3 | Âncora em C de D1L3: AA conservados de D1L3 | Bloco de construção de D1L3: AA variável em D1 | Bloco de construção de D1L3: AA variável em D1 | Mutações do bloco de construção de variantes de D1L3 | Grupo BB            |
|------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------|
| 35   | E164/I165/D166                              | L168                                        | 167 (E)                                        | 168 (A)                                        | E167A                                                | BB <sub>35-37</sub> |
| 36   | L168                                        | V171/Y172                                   | 169-170 (VE)                                   | 170-171 (YD)                                   | V169_E170delinsYD                                    |                     |
| 37   | V171/Y172                                   | D174/V175                                   | 173 (T)                                        | 174 (L)                                        | T173L                                                |                     |
| 38   | D174/V175                                   | W179                                        | 176-178 (KHR)                                  | 177-179 (QEK)                                  | K176_R178delinsQEK                                   | BB <sub>38-40</sub> |
| 39   | W179                                        | E182                                        | 180-181 (KA)                                   | 181-182 (GL)                                   | K180_A181delinsGL                                    |                     |
| 40   | E182                                        | M187-GDFNAGCSY-V197                         | 183-186 (NFI)                                  | 184-187 (DVML)                                 | N183_F186delinsDVML                                  |                     |
| 41   | M187-GDFNAGCSY-V197                         | W202                                        | 198-201 (PKKA)                                 | 199-202 (RPSQ)                                 | 198P_201AdelinsRPSQ                                  |                     |
| 42   | W202                                        | I205/R206/L207                              | 203-204 (KN)                                   | 204-205 (SS)                                   | K203_N204delinsSS                                    |                     |
| 43   | I205/R206/L207                              | T209                                        | 208 (R)                                        | 209 (W)                                        | R208W                                                |                     |
| 44   | T209                                        | P211                                        | 210 (D)                                        | 211 (S)                                        | D210S                                                | BB <sub>44-46</sub> |
| 45   | P211                                        | F213                                        | 212 (R)                                        | 213 (T)                                        | R212T                                                |                     |
| 46   | F213                                        | W215/L216/I217                              | 214 (V)                                        | 215 (Q)                                        | V214Q                                                |                     |
| 47   | W215/L216/I217                              | D219                                        | 218 (G)                                        | 219 (P)                                        | G218P                                                |                     |
| 48   | D219                                        | D222/T223/T224                              | 220-221 (QE)                                   | 221-222 (SA)                                   | Q220_E221delinsSA                                    |                     |
| 49   | D222/T223/T224                              | T229                                        | 225-228 (VKK)                                  | 226-228 (ATP)                                  | V225_S228delinsATP                                   |                     |
| 50   | T229                                        | C231-AYDRI-V237                             | 230 (N)                                        | 230 (H)                                        | N230H                                                | BB <sub>50-54</sub> |
| 51   | C231-AYDRI-V237                             | G240                                        | 236-239 (LR)                                   | 238-239 (VA)                                   | L238_R239delinsVA                                    |                     |
| 52   | G240                                        | V247/V248/P249                              | 241-246 (QETVSS)                               | 241-246 (MLLRGA)                               | Q241_S246delinsMLLRGA                                |                     |
| 53   | V247/V248/P249                              | S251                                        | 250 (K)                                        | 250 (D)                                        | K250D                                                |                     |
| 54   | S251                                        | F255                                        | 252-254 (NSV)                                  | 252-254 (ALP)                                  | N252_V254delinsALP                                   |                     |
| 55   | F255                                        | F257/Q258                                   | 256 (D)                                        | 256 (N)                                        | D256N                                                |                     |
| 56   | F257/Q258                                   | Y261                                        | 259-260 (KA)                                   | 259-260 (AA)                                   | K259_A260delinsAA                                    | BB <sub>56-58</sub> |
| 57   | Y261                                        | L263                                        | 262 (K)                                        | 262 (G)                                        | K262G                                                |                     |
| 58   | L263                                        | A268                                        | 264-267 (TEEE)                                 | 264-267 (SDQL)                                 | T264_E267delinsSDQL                                  |                     |
| 59   | A268                                        | S272/D273/H274                              | 269-271 (LDV)                                  | 269-271 (QAI)                                  | L269_V271delinsQAI                                   |                     |
| 60   | S272/D273/H274                              | P276/V277/E278                              | 275 (F)                                        | 275 (Y)                                        | F275Y                                                |                     |
| 61   | P276/V277/E278                              | L281                                        | 279-280 (FK)                                   | 279-280 (VM)                                   | F279_K280delinsVM                                    |                     |
| 62   | L281                                        | -                                           | 282-305 (QSSRAFTNSKK SVTLRKTKSKRS)             | 282 (K)                                        | Q282_S305delinsK                                     | BB <sub>62-63</sub> |

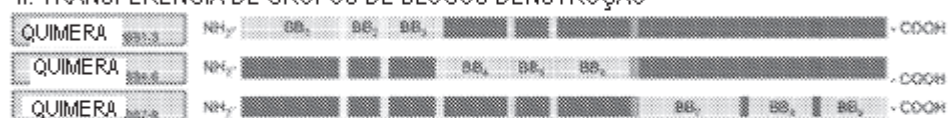
FIG. 32

## PROJETO DO GRUPO DE BLOCO DE CONSTRUÇÃO

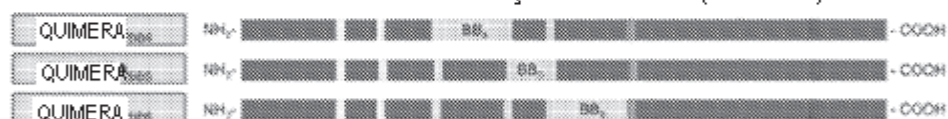
## I. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS HOMÓLOGAS



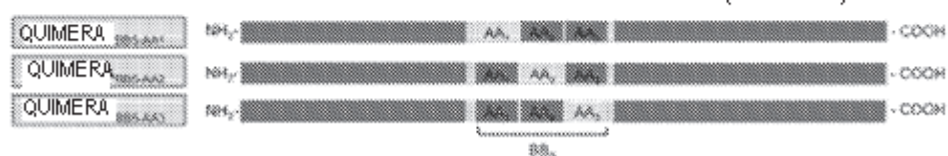
## II. TRANSFERÊNCIA DE GRUPOS DE BLOCOS DE CONSTRUÇÃO



## III. TRANSFERÊNCIA DE BLOCOS DE CONSTRUÇÃO INDIVIDUAIS (OPCIONAL)



## IV. TRANSFERÊNCIA DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS INDIVIDUAIS (OPCIONAL)





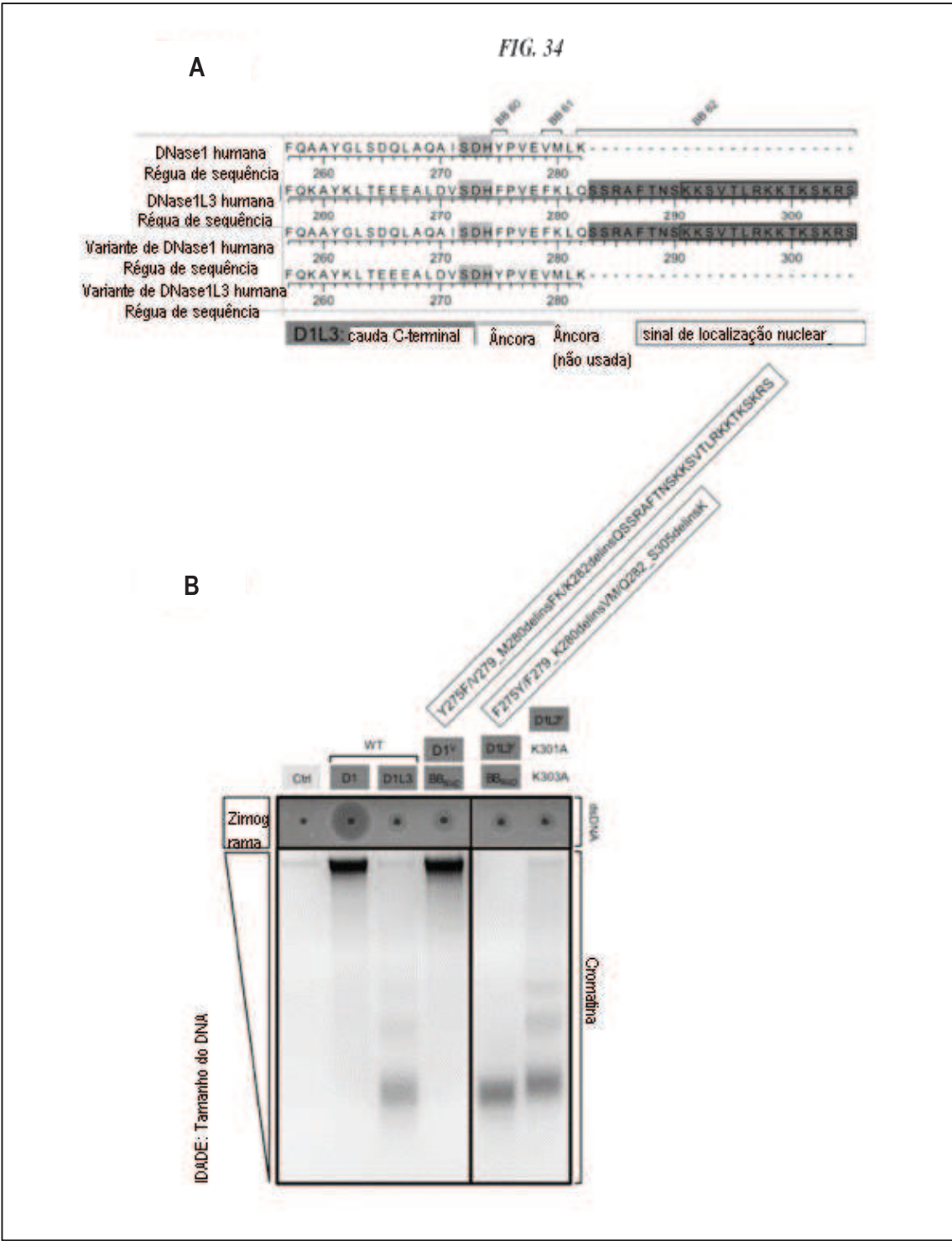


FIG. 35

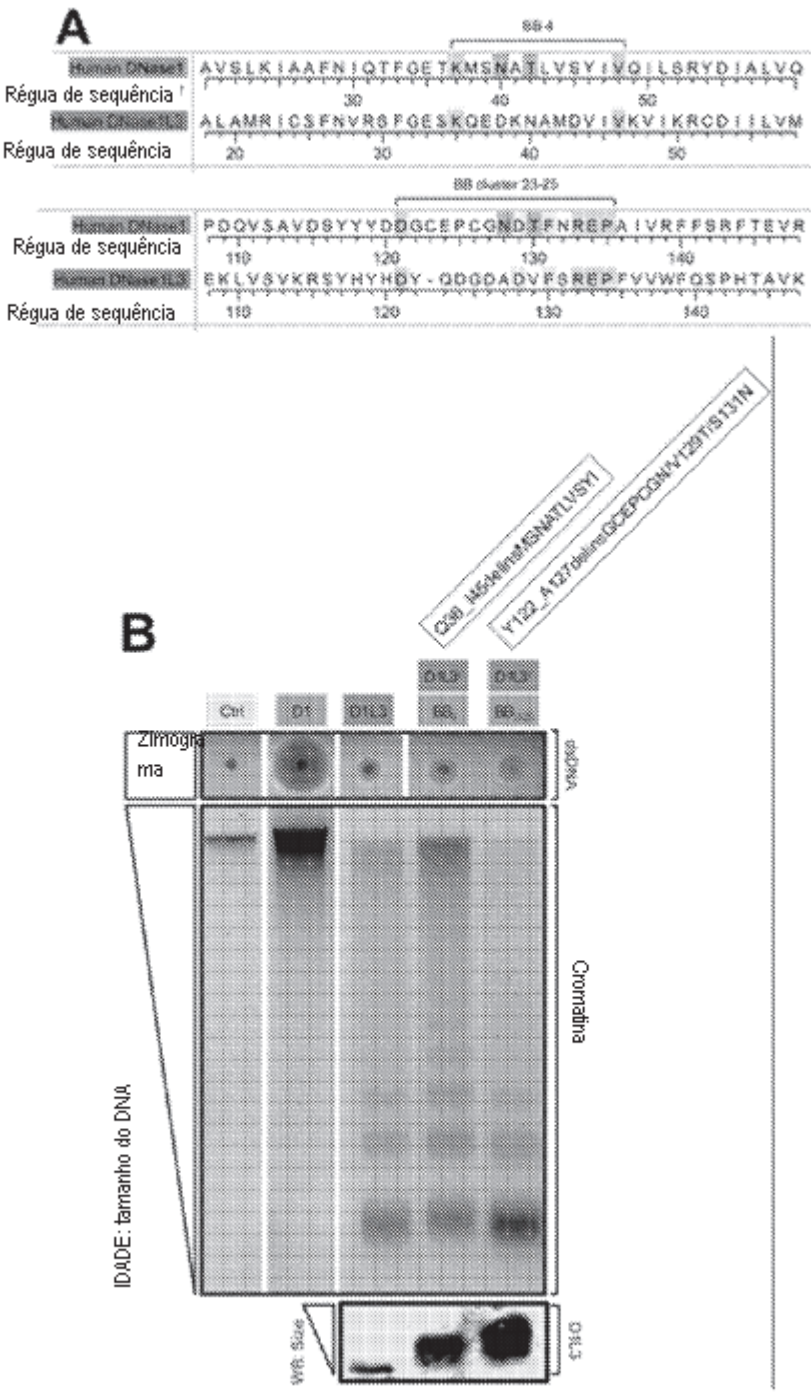


FIG. 36

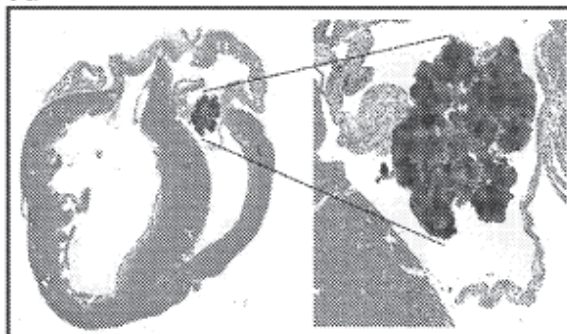
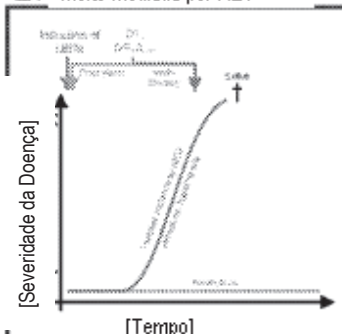
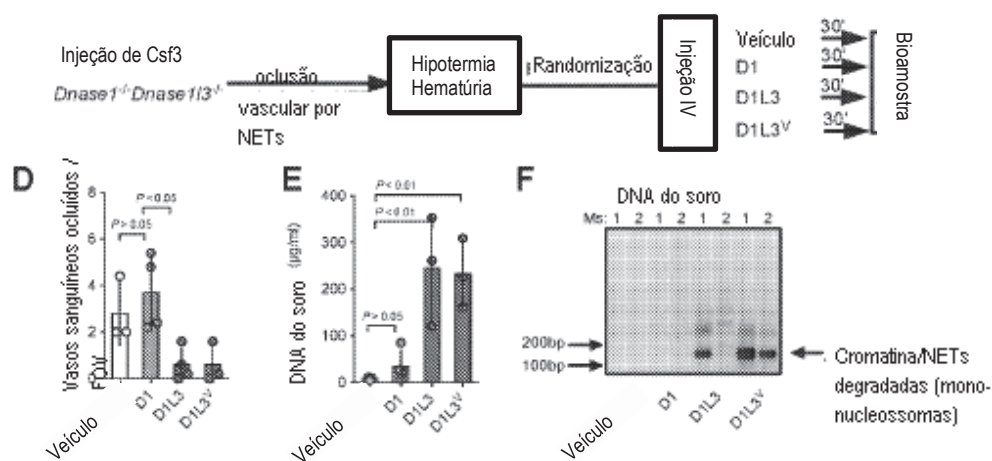
**A:** coágulo de NET na câmara cardíaca**B:** Morte mediada por NET**C:** Projeto experimental: terapia anti-Net aguda

FIG. 37

A: Projeto experimental: terapia de lesão isquemia-reperfusão

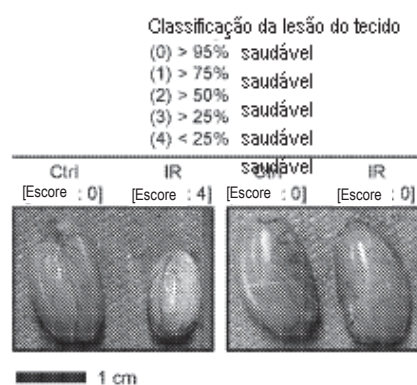
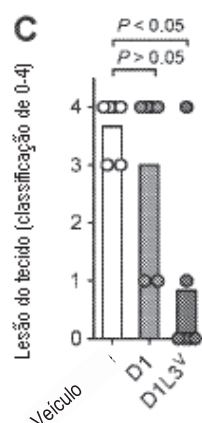
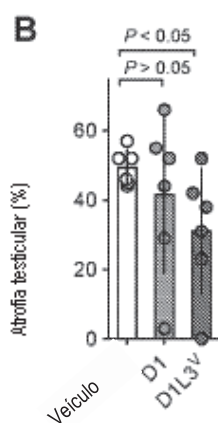
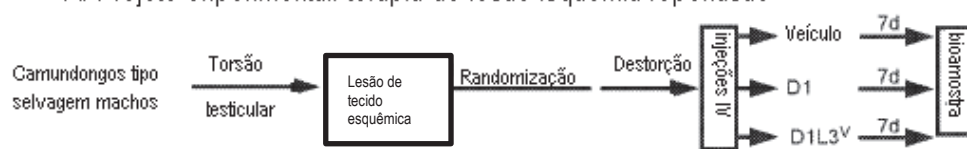


FIG. 38

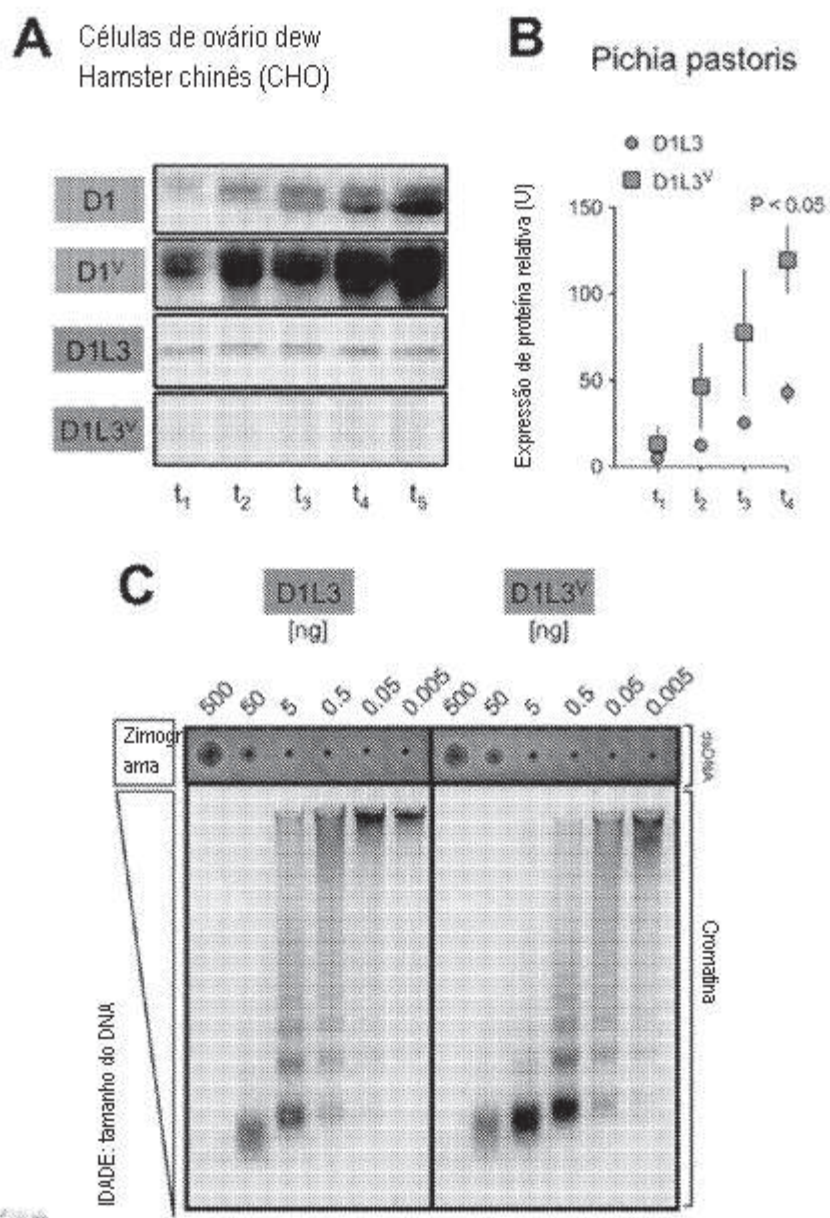


FIG. 39

| SEQ ID NO | Descrição            | Mutação (proteína madura sem peptídeo sinal)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Projeto de bloco de construção                                                                          | SEQ ID No original |
|-----------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 5         | Variante de DNase1   | Q31R/Q49K/Q79K/W209K (Q49R/Q27K/Q57K/W167K)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | -                                                                                                       | 1                  |
| 6         | Variante de DNase1   | Q31R/Q49K/Q79K/Q177K/W209K/Q262K (Q49R/Q27K/Q57K/Q155K/W187K/Q249K)                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | -                                                                                                       | 1                  |
| 7         | Variante de DNase1   | Q31R/A136F/T227K (Q49R/A114F/T203K)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | -                                                                                                       | 1                  |
| 9         | Variante de DNase1   | A136F/A164K (A114F/A142K)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | -                                                                                                       | 1                  |
| 10        | Variante de DNase1   | Q79_T84delinsRNSRRGIT (Q57_T62delinsRNSRRGIT)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | • (BB <sub>11</sub> )                                                                                   | 1                  |
| 11        | Variante de DNase1   | H66N/V88_V89delinsVIE91_P92delinsSR (H64N/V56_V87delinsVIE69_P70delinsSR)                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | • (BB <sub>12-14</sub> )                                                                                | 1                  |
| 12        | Variante de DNase1   | A136_I1137delinsFV (A114_I1115delinsFV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | • (BB <sub>15</sub> )                                                                                   | 1                  |
| 13        | Variante de DNase1   | R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE<br>(R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S186D/T191R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE)                                                                                                                                                                                               | • (BB <sub>11-16</sub> )                                                                                | 1                  |
| 14        | Variante de DNase1   | A226_P228delinsVKKS (A204_P206delinsVKKS)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | • (BB <sub>16</sub> )                                                                                   | 1                  |
| 15        | Variante de DNase1   | Q79_T84delinsRNSRRGIT/H66N/V88_V89delinsVIE91_P92delinsSR/A136_I137delinsFV/R199_Q202delinsPKKA/S204_S205delinsKNW209R/S211D/T213R/Q215V/P219G/S221_A222delinsQE/A226_P228delinsVKKS (Q57_T62delinsRNSRRGIT/H64N/V56_V87delinsVIE69_P70delinsSR/A114_I1115delinsFV/R177_Q180delinsPKKA/S182_S183delinsKNW187R/S186D/T191R/Q193V/P197G/S199_A200delinsQE/A204_P206delinsVKKS) | • (BB <sub>11</sub> , BB <sub>12-14</sub> , BB <sub>15</sub> , BB <sub>16-18</sub> , BB <sub>19</sub> ) | 1                  |
| 17        | Variante de DNase1L3 | F275Y/F278_K280delinsVWQ282_S305delinsK (F259Y/F259_K280delinsVWQ282_S285delinsK)                                                                                                                                                                                                                                                                                            | • (BB <sub>19-20</sub> )                                                                                | 2                  |
| 19        | Variante de DNase1L3 | Q36_I45delinsMSNATLVSVY (Q16_P25delinsMSNATLVSVY)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | • (BB <sub>19</sub> )                                                                                   | 2                  |
| 20        | Variante de DNase1L3 | Y122_A127delinsGCEPCGNV129T/S131N (Y102_A107delinsGCEPCGNV109T/S111N)                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | • (BB <sub>17-20</sub> )                                                                                | 2                  |

**RESUMO****ENZIMAS DE DNASE ENGENHEIRADAS E USO NA TERAPIA**

A presente invenção fornece proteínas DNase engenheiradas (incluindo DNase1 tipo 3 e DNase1) que são úteis no tratamento de condições caracterizadas por acumulação e / ou liberação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Em alguns aspectos, a invenção fornece composições e métodos para prevenir ou tratar a oclusão vascular envolvendo NETs. Conforme demonstrado neste documento, as NETs participam de um mecanismo não canônico de oclusão vascular, que não depende de fibrina ou plaquetas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### **Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 202000252 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 17/04/2020
- Hora de Geração do Código: 18:09:13
- Código de Controle:
  - Campo 1: 29FFAD182A5233E5
  - Campo 2: 6F6E351A3873C59E