

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 605**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04775224 .1**  
96 Fecha de presentación: **01.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1661579**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Método para tratamiento de infecciones bacterianas sistémicas asociadas a cambios de la composición cualitativa y/o cuantitativa del ADN extracelular de la sangre**

30 Prioridad:  
**14.07.2003 WO PCT/RU03/00304**  
**12.03.2004 RU 2004108057**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2012**

73 Titular/es:  
**CLS Therapeutics Limited**  
**Bordeaux Court Les Echelons St Peter Port**  
**Guernsey GY1 3DR , GB**

72 Inventor/es:  
**GENKIN, Dmitry Dmitrievich;**  
**TETS, Victor Veniaminovich y**  
**TETS, Georgy Victorovich**

74 Agente/Representante:  
**Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 388 605 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para tratamiento de infecciones bacterianas sistémicas asociadas a cambios de la composición cualitativa y/o cuantitativa del ADN extracelular de la sangre

5

Sector técnico

La presente invención concierne a la medicina y veterinaria y se refiere al enzima ADNasa que se utiliza para el tratamiento de una infección bacteriana sistémica que está acompañada por cambios cuantitativos y cualitativos del ADN sanguíneo extracelular.

10

Técnica anterior

El método terapéutico principal para las enfermedades causadas por bacterias, hongos y protozoos son los antibióticos y la quimioterapia (véase el Manual Merck de Diagnóstico y Terapia, 16ª Edición). La forma principal de la terapia con fármacos contra la aterosclerosis es la terapia con los compuestos del grupo de las estatinas que inhiben la síntesis de colesterol (véase Nuevos conceptos y paradigmas en la medicina cardiovascular: La gestión no invasiva de la enfermedad coronaria, ("New Concepts and Paradigms in Cardiovascular Medicine: The Noninvasive Management of Coronary Artery Disease") K. Lance Gould, American Journal of Medicine, Volumen 104, 22 de junio, 1998, págs. 2-17)

15

20

La terapia de la diabetes mellitus se compone de tres enfoques principales: la terapia de insulina, fármacos que aumentan la secreción de insulina por el páncreas, fármacos que aumentan la sensibilidad de los tejidos a la insulina o los que aumentan la utilización de glucosa por los tejidos (Gestión farmacológica de la diabetes: Avances recientes y perspectivas de futuro en el tratamiento diario con fármacos ("Pharmacological Management of Diabetes: Recent Progress and Future Perspective in Daily Drug Treatment"), Gérard Emilien y otros, Pharmacol. Ther. volumen 81, No. 1, págs. 37-51, 1999). El tratamiento de la hipersensibilidad de tipo IV se basa en la terapia inmunosupresora e inmunomoduladora (véase Inmunosupresión Terapéutica ("Therapeutic Immunosuppression"), Ed. A.W. Thomson, Ser. Immunology and Medicine, volumen 29, Acad. Publishers Kluwer, Dordrecht, 2001).

25

30

Las enfermedades causadas por mutaciones en los genes somáticos y acompañadas por el desarrollo de mosaicismos somáticos no tienen ningún tratamiento etiológico, véase H. Youssoufian, R. E. Pyeritz Mecanismos y consecuencias del mosaicismos somático en seres humanos ("Mechanisms and Consequences of Somatic Mosaicism in Humans"), Nature Reviews Genetics, 2002; 3:748-758.

35

La resistencia a los fármacos se considera el principal problema de la terapia con antibióticos de una infección bacteriana. La circulación de cepas resistentes a los antibióticos y la aparición de otras nuevas en el proceso del tratamiento (por ejemplo, como resultado de la formación de biopelículas en el organismo del paciente) son la principal causa de la ineficiencia de la terapia (La utilización y la resistencia a los antibióticos en la comunidad ("The use and resistance to antibiotics in the community") M. Cizman, Int. J. Antimicrob. Agents, 2003, abril 21: págs. 297-307).

40

En la actualidad se reconoce universalmente que el problema de la resistencia a los antibióticos tiene un carácter de amenaza global (Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos: su importancia clínica en el nuevo milenio ("Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium") A. M. Sefton, Drugs, 2002, volumen 62: 557-66) y requiere el desarrollo de nuevos antibióticos originales y nuevos métodos con mecanismos de no antibióticos efectivos sobre el proceso infeccioso. Por ejemplo, la vancomicina se utiliza para el tratamiento infeccioso provocado por cocos gram positivos resistentes a la penicilina y la cefalosporina. Las principales desventajas de la vancomicina son el número cada vez mayor de cepas resistentes a la vancomicina en circulación, la elevada toxicidad, el espectro de actividad relativamente estrecho (La amenaza de la resistencia a la vancomicina ("The threat of vancomycin resistance"), T. M. Perl, Am. J. Med., 1999 mayo 106: págs. 26-37).

45

50

Los datos mencionados anteriormente indican que es todavía una tarea muy importante el desarrollo de nuevos métodos eficaces, de baja toxicidad, que demuestren un amplio espectro de actividad contra todas las especies de bacterias, incluyendo cepas resistentes a antibióticos. Los problemas de la terapia y la quimioterapia con antibióticos de las enfermedades infecciosas causadas por los hongos y los protozoos son similares a los del tratamiento de las infecciones bacterianas; por ejemplo, cuando se utiliza un fármaco establecido, anfotericina (Resistencia a fármacos antifúngicos a azoles y polienos ("Antifungal drug resistance to azoles and polyenes"), Mar Masiá Canuto y otros, The Lancet Infectious Diseases, Volumen 2, número 9, 1 de septiembre de 2002, páginas 550-563, Revisión sistemática de la eficacia y la tolerabilidad de las formulaciones del antifúngico anfotericina B ("A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations"), Jane P. Barrett y otros, Clinic Therapeutics, Volumen 25, Número 5, mayo de 2003, páginas 1295-1320).

55

60

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que está acompañada de la formación de placas ateroscleróticas en determinadas paredes de las arterias de tamaño grande y mediano. Dependiendo de la localización, el estadio y el tamaño de las placas ateroscleróticas la enfermedad tiene distintas manifestaciones clínicas (angina de pecho,

65

derrame cerebrovascular y demás). Las manifestaciones especialmente asociadas con la disfunción de órganos causada por la aterosclerosis sistémica se curan mediante terapia con fármacos o intervención quirúrgica. No existe cura para la aterosclerosis mediante métodos de terapia farmacológica, al igual que para cualquier enfermedad sistémica. Un método establecido de prevención que retrasa la progresión de la enfermedad es la terapia con inhibidores de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA) (lovastatina, pravastatina, etc.) que conducen a la inhibición de la síntesis de colesterol endógeno y al aumento de la depuración de lipoproteínas de baja densidad del plasma sanguíneo y atenúan el desarrollo de la aterosclerosis (Nuevos conceptos y paradigmas en la medicina cardiovascular: La gestión no invasiva de la enfermedad de las arterias coronarias ("New Concepts and Paradigms in Cardiovascular Medicine: The Noninvasive Management of Coronary Artery Disease"), K. Lance Gould, *The American Journal of Medicine*, Volumen 104, 22 de junio de 1998, págs. 2-17). Las desventajas de este tratamiento son los efectos adversos (Una mirada a la seguridad de las estatinas disponibles en la actualidad ("A safety look at currently available statins"), M. H. Moghadasian, *Expert Opin. Drug Saf.* 2002 septiembre 1: págs. 269-74) y la eficacia limitada ("Estatinas: evaluando beneficios, eficacia y seguridad", M. B. Clearfield, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2002, mayo 3: págs. 469-77).

La causa principal de incapacidad física y muerte de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 2 son las complicaciones asociadas con la microangiopatía y el desarrollo de la macroangiopatía. Se considera que el control metabólico efectivo del nivel de glucosa (mantenimiento del nivel de glucosa y el nivel de hemoglobina glucosilada dentro de los límites normales) previene el desarrollo de las complicaciones. La terapia con insulina, que incluye la terapia intensiva de insulina, es el método de elección cuando es imposible llegar a un control metabólico con otros fármacos (Terapia de la insulina en pacientes ambulatorios con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2: revisión científica, ("Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review"), D. E. DeWitt, I. B. Hirsch, *JAMA*, 2003, mayo 289: págs. 2254-64).

Sin embargo, aunque se utilice terapia de insulina a dosis elevadas, el riesgo de desarrollar complicaciones, incluso las mortales, es todavía lo suficientemente elevado (Mortalidad por causa específica en una población con diabetes: Estudio de la mortalidad por diabetes en South Tees ("Cause-specific mortality in a population with diabetes: South Tees Diabetes Mortality Study"), N. A Roper, y otros, *Diabetes Care*, 2002, enero 25: págs. 43-8). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la tarea del desarrollo de nuevos métodos de terapia contra la diabetes mellitus tipo I y tipo II, incluyendo los métodos de prevención de las complicaciones, sigue siendo de interés actual y está generalmente reconocida.

Uno de los métodos clínicos establecidos de tratamiento de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado es la administración del péptido ciclosporina A (Inmunosupresión terapéutica ("Therapeutic Immunosuppression"), ed. A. W. Thomson, *Ser. Immunology and Medicine*, volumen 29, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 2001). Los inconvenientes bien conocidos de este método son los efectos adversos graves, concretamente, nefrotoxicidad, hipertensión y alto riesgo de aparición de infecciones (Ciclosporina: mecanismos de acción y toxicidad ("Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity"), R. M. Graham, *Cleve Clin. J. Med.*, 1994, julio-agosto 61: págs. 308-13). Otro problema es la pérdida de la eficacia durante el tratamiento a largo plazo, que se muestra en el aumento del riesgo de rechazo de trasplantes (Trasplante renal, pasado, presente y futuro ("Renal transplantation, past, present and future"), C. Ponticelli, y otros, *J. Nephrol.*, 1999, julio-agosto 12 Supl. 2: S105-10). De este modo, para tratamientos acompañados por cambios cualitativos y/o cuantitativos de ADN sanguíneo extracelular, el amplio espectro de métodos diferentes que se utilizan tienen inconvenientes similares: toxicidad, efectos adversos, baja eficacia de la terapia. Al mismo tiempo, en la práctica clínica real de estas enfermedades a menudo se acompañan entre sí. Por ejemplo, las terapias contra las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado con fármacos inmunosupresores multiplican el riesgo de enfermedades infecciosas (Avances recientes en el diagnóstico y tratamiento de la infección en el receptor de un trasplante. ("Recent advances in the diagnosis and management of infection in the organ transplant recipient") N. E. Tolkoff-Rubin, H. R. Rubin; *Semin. Nephrol.* 2000, marzo 20: 148-63), la aterosclerosis es una complicación muy común de la diabetes mellitus (Diabetes y aterosclerosis. epidemiología, fisiopatología y tratamiento ("Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management"), J. A. Beckman, M. A. Creager, P. Libby; *JAMA*, 2002 mayo, 287:2570-81) y suele ir acompañada de procesos infecciosos sistémicos (Infección y aterosclerosis: papel potencial de la carga de patógenos y mimetismo molecular ("Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry"), S. E. Epstein, J. Zhu, M. S. Burnett, Y. F. Zhou, G. Vercellotti, D. Hajjar, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, junio 20:1417-20), muchos tipos de diabetes se desarrollan como resultado de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (Evidencia de la autoinmunidad de islotes celulares en pacientes ancianos con diabetes tipo 2 ("Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes"), M. Pietropaolo, E. Barinas-Mitchell, S. L. Pietropaolo, L. H. Kuller, M. Trucco, *Diabetes*, 2000, enero 49: 32-8), o durante el proceso infeccioso (Enfermedades sistémicas causadas por la infección por vía oral ("Systemic diseases caused by oral infection") X. Li, K. M. Kolltveit, L. Tronstad, I. Olsen, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, octubre 13:547-58), y conduce a un riesgo elevado de desarrollo de infecciones (Diabetes y el riesgo de mortalidad relacionada con infecciones en los EE.UU. ("Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S."), A. G. Bertoni, S. Saydah, F. L. Brancati, *Diabetes Care*, 2001, junio 24:6 1044-9).

El documento US 6.391.607 B1 se refiere a variantes de secuencias de aminoácidos de ADNasa I humana que han aumentado la actividad hidrolítica de ADN. Se dan a conocer secuencias de ácido nucleico que codifican dichas

variantes hiperactivas, para permitir de este modo la producción de estas variantes en cantidades suficientes para su utilización clínica. Se refiere además a composiciones farmacéuticas y a utilizaciones terapéuticas de las variantes hiperactivas de ADNasa humana I.

5 Según el documento DE 40 24 530 A1, se controlan virus y enfermedades virales en humanos y animales mediante el tratamiento con nucleasas (I) aisladas de páncreas bovino. Entre las (I) se incluyen también ribonucleasas y desoxirribonucleasas, específicamente ADNasa I.

10 S. Sugihara y otros describen en el British Journal of Cancer, Nature Publishing Group, Londres, G. B., volumen 67, núm. 1, 1 de enero de 1993 (01/01/1993), páginas 66-70, ISSN: 0007-0920 XP008086562 que un tratamiento con desoxirribonucleasa impide la metástasis hepática transmitida por sangre de células tumorales trasplantadas cutáneamente en ratones.

15 J. C. Davis JR y otros describen en Lupus, Basingstoke, G. B., volumen 8, No. 1, 1 de enero de 1999 (01/01/1999), páginas 68-76, ISSN: 0961-2033 XP009124143 la utilización de la ADNasa I humana recombinante (ADNasa hr) en pacientes con nefritis lúpica.

#### Características de la invención

20 La solución del objetivo de desarrollo de un método de alto rendimiento y baja toxicidad para el tratamiento de una infección sistémica bacteriana que está acompañada por el cambio cuantitativo y/o cualitativo de la composición del ADN extracelular del plasma sanguíneo, es la base de la presente invención.

25 Según la presente invención, este objetivo se consigue mediante la introducción de un agente de destrucción de ADN sanguíneo extracelular en la circulación sanguínea sistémica para tratar una infección bacteriana sistémica asociada con los cambios que se observan en la composición cualitativa y/o cuantitativa del ADN sanguíneo extracelular. Como agente de destrucción de ADN sanguíneo extracelular puede introducirse el enzima ADNasa en la circulación sistémica: El enzima ADNasa puede introducirse en la circulación sistémica en dosis que proporcionan el cambio de perfil electroforético de ADN sanguíneo extracelular que puede ser detectado mediante electroforesis puls-gel, con lo que el enzima ADNasa puede ser administrado en dosis y regímenes que pueden proporcionar un nivel hidrolítico de ADN sanguíneo medido en el plasma sanguíneo y que supera las 150 unidades Kuntz por litro de plasma, y este nivel puede mantenerse durante más de 12 horas durante 24 horas en total.

35 El desarrollo de una infección bacteriana sistémica está acompañado por un cambio cuantitativo y/o cualitativo en el ADN sanguíneo extracelular, pero a base de los datos disponibles, no hay conocimiento sobre el repertorio genético del ADN sanguíneo extracelular de los pacientes con este tipo de infección, sobre el papel biológico del ADN sanguíneo extracelular en esta infección y sobre el efecto terapéutico potencial de la destrucción del ADN sanguíneo extracelular a efectos del tratamiento de este tipo de infección, de modo que, teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, la presente invención cumple con los requisitos de los criterios de "novedad" (N).

40 Tal como establece el presente solicitante, el ADN sanguíneo extracelular de los pacientes con una infección bacteriana sistémica contiene un repertorio cuantitativa y cualitativamente único de genes y elementos de regulación genética que difieren en gran medida del repertorio de ADN que se describe en el genoma humano. En contraste con el ADN intracelular, el ADN extracelular de estos pacientes contiene genes humanos principalmente únicos. Se ha descubierto ADN extracelular de bacterias y hongos en la matriz de las biopelículas y en el plasma sanguíneo de humanos infectados.

45 Se ha establecido que el ADN sanguíneo extracelular que incluye ADN extracelular de bacterias, hongos y protozoos promueve el desarrollo de una infección bacteriana sistémica.

50 Se ha establecido que la destrucción del ADN extracelular de plasma sanguíneo conduce a efectos terapéuticos sobre una infección bacteriana sistémica.

55 Las nuevas características mencionadas anteriormente de la presente invención se basan en nuevas ideas acerca de los mecanismos de la enfermedad descrita. De esta manera, el método reivindicado cumple los requisitos de los criterios de "etapa inventiva" (IS).

#### Breve descripción de los dibujos

60 Tal como se establece a continuación, la presente invención se ha explicado mediante la descripción detallada de las realizaciones sin referencias a dibujos.

#### Realización preferente

65 El método reivindicado de la presente invención se lleva a cabo tal como se describe a continuación:

Materiales y métodos.

Se utilizaron los siguientes agentes que destruyen el ADN sanguíneo extracelular: ADNasa pancreática bovina (Sigma y Samson-Med), ADNasa I humana recombinante (Gentech), anticuerpos anti-ADN hidrolizadores de ADN aislados de la sangre de pacientes con lupus eritematoso, de acuerdo con A. M. Shuster (A. M. Shuster y otros, Science, volumen 256, 1992, págs. 665-667).

Se aisló ADN extracelular a partir de plasma sanguíneo tal como se describe a continuación: Se centrifugó plasma fresco (no más de 3-4 horas después de la toma de muestra) con un anticoagulante añadido (citrato de sodio) en Ficoll-PlaquePlus (Amersham-Pharmacia) durante 20 minutos a 1500 G a temperatura ambiente. La mitad del plasma se separó, sin afectar al resto de las células en la almohadilla Ficoll y posteriormente se centrifugó a 10000 G durante 30 minutos para la separación de los fragmentos y residuos de células. El sobrenadante se separó, sin afectar a los sedimentos, y se rellenó hasta el 1% de sarkosil, Tris-HCl 50 µM, pH 7,6, 20 µM EDTA, 400 µM NaCl y, a continuación, se mezcló con un volumen igual de mezcla fenol-cloroformo (1:1). La emulsión preparada se incubó durante 2 horas a T=65°C, a continuación se separó la mezcla de fenol-cloroformo por centrifugación (500 G durante 20 minutos, temperatura ambiente).

El procedimiento de desproteinización con mezcla de fenol-cloroformo se repitió 3 veces y, a continuación, se procesó la fase acuosa con cloroformo y éter dietílico. La separación de los disolventes orgánicos se hizo por centrifugación a 5000 G durante 15 minutos). A continuación, se añadió un volumen igual de isopropanol a la fase acuosa resultante y la mezcla se incubó durante toda la noche a 0°C. Después de la sedimentación, los ácidos nucleicos se separaron por centrifugación a 10000 G durante 30 minutos. El sedimento de ácidos nucleicos se disolvió en Tris-HCl 10 µM, pH 7,6 con EDTA 5 µM, y se sometió al gradiente de CsCl (1 M, 2,5 M, 5,7 M) en un tubo de ensayo para el rotor SW60Ti. El volumen de solución de ADN fue de 2 ml, el volumen de cada etapa de CsCl fue de 1 ml. Se llevó a cabo ultracentrifugación en una centrífuga L80-80 (Beckman) durante 3 horas a 250000 G. El ADN se recogió de la superficie de cada etapa del gradiente en fracciones. Estas fracciones se dializaron durante 12 horas (T=4°C). La presencia de ADN en las fracciones se determinó por electroforesis en agar y el ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio. La cantidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Beckman DU70) en cubeta (100 mcl) a la longitud de onda de 220-230 nm.

Ejemplo 1.

El tratamiento de la sepsis experimental causada por Candida Albicans (no es parte de la presente invención) y Staphylococcus Aureus.

Grupo 1. Se inocularon 30 ratones retroorbitalmente con  $1 \times 10^{10}$  bacterias de la cepa patógena VT-2003R de Staphylococcus aureus. Se administró dornasa-alfa recombinante (Genentech) por vía intraperitoneal a una dosis de 500 mkg/kg a las 2, 6, 10 y 14 horas después de la inoculación.

Grupo 2. Se inocularon 10 ratones retroorbitalmente con  $1 \times 10^{10}$  bacterias de la cepa patógena VT-2003R de Staphylococcus aureus. Se administró tampón fosfato por vía intraperitoneal a las 2, 6, 10 y 14 horas después de la contaminación.

Después de la última inoculación de dornasa, 24 ratones del grupo 1 se dividieron en dos subgrupos (1a y 1b).

Subgrupo 1a (8 ratones). 2 horas después de la última administración de dornasa se inyectó a los ratones por vía intravenosa (a una dosis 0,1 mkg por animal) el ADN sanguíneo extracelular aislado de una cantidad de ratones diferentes que fueron inoculados retroorbitalmente con  $1 \times 10^{10}$  bacterias de la cepa patógena VT-2003R de Staphylococcus Aureus 15 horas antes del aislamiento del ADN.

Subgrupo 1b (8 ratones). 2 horas después de la última administración de dornasa se inyectó a los ratones por vía intravenosa (a una dosis 0,1 mkg por animal) el ADN sanguíneo extracelular aislado de una cantidad de ratones diferentes que fueron infectados por vía intravenosa con la dosis LD50 de bacterias Candida Albicans 3 días antes del aislamiento del ADN.

Se evaluó la viabilidad de los animales 32 horas después de la contaminación. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

Viabilidad de los ratones a diferentes puntos temporales después de la contaminación									
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h	28 h	32 h
Grupo 1	100%	100%	100%	90%	90%	80%	50%	40%	30%
Grupo 2	100%	100%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	20%
1a							20%	10%	10%
1b							50%	50%	40%

Grupo 3 - 10 ratones. Se administró por vía intravenosa aislado clínico de *Candida Albicans* a una dosis LD50. Se administró alfa dornasa recombinante (Genentech) por vía intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg dos veces al día en los días 2º, 3º y 4º después de la contaminación.

Grupo 4 - 10 ratones. Se administró por vía intravenosa aislado clínico de *Candida Albicans* a una dosis LD50. Se administró anfotericina B por vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg dos veces al día en los días 2º, 3º y 4º después de la contaminación.

Grupo 5 - 10 ratones. Se administró por vía intravenosa aislado clínico de *Candida Albicans* a una dosis LD50. Se administró tampón fosfato por vía intraperitoneal como control negativo dos veces al día en los días 2º, 3º y 4º después de la contaminación.

La viabilidad de los ratones y su peso se estimó en el 7º día después de la contaminación. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Viabilidad de los ratones a diferentes puntos temporales después de la contaminación				
	1 día	3 días	5 días	7 días
Grupo 3	100%	100%	100%	100%
Grupo 4	100%	100%	100%	100%
Grupo 5	100%	80%	50%	50%

El peso de los ratones del grupo 4 en el 7º día del experimento fue un 20% menor que en el grupo 3. Este hecho indica que anfotericina B es más tóxica que la dornasa alfa, aunque sus eficacias de protección son iguales.

De este modo, ADN sanguíneo extracelular de los animales infectados posee influencia negativa sobre el desarrollo del proceso infeccioso y, de acuerdo con el método reivindicado, su destrucción es eficaz en el tratamiento de infecciones bacterianas y hongos.

Ejemplo 2. Tratamiento de la infección generalizada (sepsis).

Hombre de 38 años de edad ha sido admitido en el Departamento de Medicina Interna en estado grave. Se le había diagnosticado 12 días antes síndrome respiratorio agudo. Debido a temperatura subfebril, síndrome asténico y dolor en la parte derecha del pecho, se le diagnosticó neumonía 5 días antes de la hospitalización. Se le prescribió inyección de cefazolina y roxitomicina por vía oral, pero no se observó mejora, y dos días antes de su ingreso en el hospital, desarrolló fiebre (39,5-40°C), náuseas, dolor de cabeza. Aparecieron en el último día antes de la hospitalización múltiples erupciones hemorrágicas en la piel, dolores musculares, ictericia y diarrea. En el momento del ingreso en el hospital, se encontró que la temperatura fue de 38,3°C, la presión arterial fue de 100/60, taquicardia de 120 pulsaciones por minuto, síntomas meníngeos negativos, frío y las extremidades cianóticas. Los datos de los exámenes de laboratorio: había presente leucocitosis moderada y desviación a la izquierda del hemograma (18% de formas jóvenes), aparición de neutrófilos con granulación tóxica, aumento de bilirrubina conjugada, AST y ALT. Se encontraron en la ecografía del hígado numerosas zonas pequeñas de heterogeneidad. Se le diagnosticó al paciente sepsis. Se hizo el control bacteriológico sanguíneo. Se utilizó para el tratamiento gentamicina/ampicilina/metronidazol, heparina, vasodilatadores por vía oral. A pesar de la poliquimioterapia con antimicrobianos, hemoabsorción y transfusión de plasma sanguíneo el estado del paciente empeoró. Se prescribió infusiones de vancomicina dado que se aisló *S. pneumoniae* de la sangre del paciente. Durante las siguientes 48 horas, a pesar de las infusiones de vancomicina, el estado del paciente continuó empeorando. Aparecieron síntomas de fallo múltiple de órganos. Se iniciaron, después de la aprobación de los padres, infusiones de ADNasa pancreática bovina por vía intravenosa sin interrupción a una dosis de 800 mg/día (1.600.000 unidades Kunitz). Los síntomas de la estabilización del estado aparecieron doce horas después del inicio de la infusión de ADNasa. Estos fueron los siguientes: mejora de la circulación sanguínea periférica y de los índices hemodinámicos sistémicos, aparición de la micción. Las infusiones de ADNasa continuaron durante los siguientes 5 días. En aquel momento los índices de laboratorio, la hemodinámica y la función renal del paciente se volvieron normales y el paciente fue trasladado a respiración autodependiente.

Por lo tanto, la utilización de ADNasa, de acuerdo con la presente invención, posee un efecto terapéutico en la infección bacteriana sistémica.

Aplicación industrial

Para la realización de los métodos se utilizaron materiales y equipos fabricados bien conocidos en condiciones de planta y, de acuerdo con lo mencionado anteriormente, la presente invención cumple con los requisitos de los criterios de "aplicación industrial" (IA).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Enzima ADNasa para su utilización en el tratamiento de una infección bacteriana sistémica asociada con cambios cualitativos y/o cuantitativos en la composición del ADN sanguíneo extracelular, en el que la ADNasa se introduce en la circulación sanguínea sistémica.
- 10 2. Enzima ADNasa, según la reivindicación 1, en la que el enzima ADNasa se introduce en dosis suficientes para proporcionar un cambio en el perfil electroforético del ADN sanguíneo extracelular, en la que la enzima ADNasa se introduce en dosis y regímenes que proporcionan actividad hidrolítica del ADN del plasma sanguíneo, medida en el plasma sanguíneo, que es mayor de 150 unidades Kunitz por litro de plasma durante más de 12 horas dentro de un total de 24 horas.