

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 918**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 12170757 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2497488**

54 Título: **Método para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado 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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.12.2013

73 Titular/es:

CLS THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
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 2 433 918 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 el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado asociadas a cambios de la composición cualitativa y/o cuantitativa del ADN extracelular de la sangre

Sector técnico

La presente invención concierne a la medicina y veterinaria y se refiere al enzima ADNasa que se utiliza para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

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, THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Volumen 104, 22 de junio, 1998, págs. 2-17)

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).

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.

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).

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).

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 Masía 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).

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, 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).

Características de la invención

La solución del objetivo de desarrollo de un método de alto rendimiento y baja toxicidad para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado que están acompañadas por el cambio cuantitativo y/o cualitativo de la composición del ADN extracelular del plasma sanguíneo, es la base de la presente invención.

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 el tratamiento de aterosclerosis y diabetes. 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.

El desarrollo de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado 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 reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado, sobre el papel biológico del ADN sanguíneo extracelular en estas reacciones y sobre el efecto terapéutico potencial de la destrucción del ADN sanguíneo extracelular a efectos del tratamiento de este tipo de reacciones, de modo que, teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, la presente invención cumple con los requisitos de los criterios de "novedad" (N).

Tal como establece el presente solicitante, el ADN sanguíneo extracelular de los pacientes con reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado 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.

Se ha establecido que el ADN sanguíneo extracelular que incluye ADN extracelular de bacterias, hongos y protozoos promueve el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado.

Se ha establecido que la destrucción del ADN extracelular de plasma sanguíneo conduce a efectos terapéuticos sobre reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado.

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

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

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 μ M, pH 7,6, 20 μ M EDTA, 400 μ M 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 desproteización 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. Inhibición de la activación de los linfocitos

Se inmunizaron 20 ratones C57BI por vía transcutánea mediante una suspensión de Mycobacterium Smegmatis (100 µg de antígeno en 50 µl de alumbre de aluminio) en la parte blanda del pie. Cuatro semanas después, se sacrificaron los ratones y se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos de los ratones sensibilizados e intactos se cultivaron en placas Petri en suspensión de cultivo (2,5x10⁵ células/ml) en PRPMI 1640 con 2 mM de glutamina, antibióticos y 10% de suero fetal de ternero en presencia de antígeno de Mycobacterium smegmatis (5 µg/ml), durante 24 horas en 5% de CO₂ a 37°C. Para la determinación del nivel de activación de los esplenocitos en la presencia de antígeno se añadió [3H]-timidina a una concentración de hasta 0,1 mCi /ml 6 horas antes del final del cultivo. Después de que las células de cultivo se lavaron, se disolvieron en formamida y se midió la radiactividad.

- Serie 1 (5 placas) Esplenocitos de ratones sensibilizados.
- Serie 2 (5 placas) Esplenocitos de ratones no sensibilizados. Se añadió dornasa alfa recombinante (Genentech) a 1 µg/ml de concentración a los medios.
- Serie 3 (5 placas) Esplenocitos de ratones intactos.
- Serie 4 (5 placas) Esplenocitos de ratones intactos. Se añadió al medio ADN extracelular sanguíneo aislado a partir de ratones sensibilizados 2 horas después de la inyección subcutánea repetida de antígeno de Mycobacterium Smegmatis en dosis 200 µg. El ADN se añadió a una concentración de 0,05 µg/ml.
- Serie 5 (5 placas) Esplenocitos de ratones intactos. Se añadió al medio ADN extracelular sanguíneo aislado a partir de ratones sensibilizados 2 horas después de la inyección subcutánea repetida de antígeno de Mycobacterium Smegmatis en dosis 200 µg. El ADN se añadió a una concentración de 0,05 µg/ml.
- Serie 6 (5 placas). Esplenocitos de ratones intactos que se cultivaron sin la adición de antígeno.

Captación de [3H] timidina por esplenocitos 24 horas después del cultivo con el antígeno.

Los resultados del experimento se presentan en la tabla 6.

Tabla 6

Inhibición de la activación de los linfocitos	
Nº de serie	número de linfocitos (CPM)
1	115000
2	75000
3	35000
4	95000
5	40000
6	15000

De este modo, el ADN extracelular de plasma sanguíneo aumenta la activación específica de los linfocitos bajo la estimulación de antígenos y la utilización ADNasa conduce a la inhibición de la estimulación antigénica de acuerdo con el método reivindicado.

Ejemplo 2. Tratamiento de la hipersensibilidad de tipo retardado.

Ha sido ingresado en el hospital en estado grave un hombre de 23 años de edad. Hace 4 años, en 1999, le fue diagnosticada mieloleucosis crónica. Se llevó a cabo previamente terapia con hidroxiurea e interferón alfa. Se le realizó un trasplante de médula ósea debido a la progresión aguda de la enfermedad. La médula ósea se le trasplantó de un donante HLA compatible, pero ABO incompatible, y se le llevó a cabo irradiación total del cuerpo con lo siguiente: la administración al paciente de ciclofosfano y metotrexato para la prevención de la reacción de

injerto contra huésped. En el noveno día se ha desarrollado la reacción de injerto contra huésped con fiebre y diarrea generalizada. El paciente ha recibido terapia con pulsos de metilprednisolona y globulina antilinfocítica durante 9 días. El estado del paciente ha mejorado. En el 30º día, la función de la médula ósea se ha restaurado y el paciente fue dado de alta del hospital. Una semana más tarde, el paciente ha sido admitido de nuevo en el hospital con leucopenia (los leucocitos estaban en $0,9 \cdot 10^9$), ulceración en la mucosa de la cavidad oral y fiebre. Se encontraron en la biopsia por aspiración hipoplasia y eosinofilia. Se le prescribió azatioprina y la leucomax, pero después de 6 semanas se ha desarrollado leucopenia (leucocitos en $0,7 \cdot 10^9$). Se le mantuvo la azatioprina y se hizo tratamiento pulsado con metilprednisolona y leucomax. Al mismo tiempo la fiebre y las ulceraciones en la mucosa de la cavidad oral, no se había eliminado todavía.

Poco después de finalizar el tratamiento, tuvieron lugar episodios de hemólisis intravascular con la reducción del número de leucocitos y de trombocitos. Se le prescribió al paciente infusiones intravenosas de desoxiribonucleasa pancreática bovina en dosis de 400 mg/día (800.000 unidades Kunitz) 6 veces al día durante una hora durante 2 semanas. El nivel en el plasma sanguíneo de actividad de hidrólisis de ADN era de más de 180 unidades Kunitz por litro de plasma durante no menos de 12 horas. A partir del quinto día de la terapia el estado del paciente ha mejorado. Número de leucocitos en el séptimo día ha aumentado hasta $1,7 \cdot 10^9$, y en el decimoquinto día el promedio fue de $2,4 \cdot 10^9$. En aquel momento los síntomas de hemólisis habían desaparecido, la temperatura disminuyó y se observó la sanación de las úlceras en la boca. La úlcera de la cavidad oral se sanó y el número de eritrocitos se normalizó. El paciente fue dado de alta del hospital en estado satisfactorio. Un mes más tarde se observó una fórmula normal de la sangre durante la visita de control al hospital.

De este modo, la utilización de la ADNasa, de acuerdo con el método reivindicado, posee efecto terapéutico en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

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 reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado asociadas 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.