

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 112**

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 12170754 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2497487**

54 Título: **Método para el tratamiento de diabetes y aterosclerosis 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 2 434 112 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 diabetes y aterosclerosis 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 diabetes y aterosclerosis.

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, THE 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, abril de 2003 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., mayo de 1999 106: págs. 26-37).

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 reconocido, 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).

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, derrame cerebrovascular y otras). Las manifestaciones especialmente asociadas con la disfunción de órganos

65

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 reconocido 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. septiembre de 2002 1: págs. 269-74) y la eficacia limitada ("Estatinas: evaluando beneficios, eficacia y seguridad", M. B. Clearfield, Expert Opin. Pharmacother., mayo de 2002 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 a elegir 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, mayo de 2003, 289: págs. 2254-64).

Sin embargo, aunque se utilice terapia de insulina a dosis elevadas, el riesgo de desarrollar complicaciones, incluso 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, enero de 2002 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., julio-agosto de 1994 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., julio-agosto de 1999 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 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. marzo de 2000, 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, mayo de 2002, 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., junio de 2000, 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, enero de 2000, 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., octubre de 2000,13:547-58), 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, junio de 2001, 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 las enfermedades diabetes y aterosclerosis 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.

25 Según la presente invención, este objetivo se consigue mediante la introducción de un agente de destrucción de ADN extracelular sanguíneo en la circulación sanguínea sistémica para tratar la aterosclerosis y la diabetes. Como agente de destrucción de ADN extracelular sanguíneo 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 extracelular sanguíneo 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.

30 El desarrollo de diabetes y aterosclerosis está acompañado por un cambio cuantitativo y/o cualitativo en el ADN extracelular sanguíneo, pero a base de los datos disponibles, no hay conocimiento sobre el repertorio genético del ADN extracelular sanguíneo de los pacientes las enfermedades mencionadas anteriormente, sobre el papel biológico del ADN extracelular sanguíneo en estas enfermedades y sobre el efecto terapéutico potencial de la destrucción del ADN extracelular sanguíneo a efectos del tratamiento de estas enfermedades, 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 extracelular sanguíneo de los pacientes con las enfermedades mencionadas anteriormente 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 extracelular sanguíneo que incluye ADN extracelular de bacterias, hongos y protozoos promueve el desarrollo de las enfermedades enumeradas anteriormente.

50 Se ha establecido que la destrucción del ADN extracelular de plasma sanguíneo conduce a efectos terapéuticos sobre las enfermedades enumeradas anteriormente.

55 Las nuevas características mencionadas anteriormente de la presente invención se basan en nuevas ideas acerca de los mecanismos de las enfermedades descritas. 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 extracelular sanguíneo: 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 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 μ M, pH 7,6 con EDTA 5 μ M, 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. Influencia de la terapia de ADNasa en la viabilidad de las células beta pancreáticas y de endotelio de la aorta.

Se utilizó DNasa I humana recombinante (Gentech). Se utilizaron células β de páncreas embrionario humano y células endoteliales de aorta humana para la formación del cultivo de células primario. Se añadió ADN aislado a partir de plasma de paciente con la forma grave de diabetes mellitus tipo 2 que se había complicado por la aterosclerosis (0,0025 μ g en 1 ml de medio de cultivo) a una de las series experimentales en cultivo celular 24 horas después del pasaje y se añadió a la segunda serie de cultivo celular ADN extraído de la sangre del mismo paciente, pero tratado con ADNasa (1 μ g/ml; 37°C, 30 minutos). El número de células viables se contabilizó utilizando la técnica de absorción de azul de tripano en 24 horas.

Los resultados del experimento se presentan en la tabla 4:

Porcentaje de células viables 48 horas después de su cultivo (en porcentaje)			
Células	Control	ADN del paciente	ADN del paciente tratado con ADNasa
Células β	73%	43%	61%
Endotelio	62%	35%	55%

De este modo, el ADN extracelular de plasma sanguíneo de pacientes con la forma grave de diabetes mellitus tipo 2 y la aterosclerosis influye negativamente tanto en las células β de páncreas normal y en las células endoteliales normales. La destrucción de ADN extracelular de la sangre del paciente impide el desarrollo de la influencia negativa de acuerdo con el método reivindicado.

Ejemplo 2. Tratamiento de la aterosclerosis.

Hombre de 54 años de edad, ha sido ingresado en el hospital en estado grave aquejado de dolor intenso en el abdomen, diarrea, dolor intenso en las piernas que aparece al caminar, pérdida de peso. Se le había diagnosticado diabetes mellitus tipo 2 hace 12 años y se le había recetado glybencamye. El dolor en el epigastrio después de la ingesta de alimentos apareció hace 15 meses. Se le prescribieron antiácidos, pero el dolor siguió aumentando y apareció esteatorrea en los últimos 3 meses. Debido al dolor intenso, se había desarrollado un síndrome de anorexia algunos días antes de la hospitalización. Agotamiento considerable (peso corporal de 44 kg, la pérdida de peso corporal fue de 28 kg durante los últimos 5 meses) y se detectó la ausencia de pulsaciones aórticas en las piernas durante el examen.

No se observaron cambios orgánicos durante la gastroduodenoscopia y la colonoscopia. Los datos de ECG no se cambiaron patológicamente. Se observó un aumento moderado de los niveles de colesterol y la fracción de lipoproteínas de baja densidad en el análisis de sangre. El nivel de hemoglobina glicosilada fue del 11%. Se observó en la aortografía la oclusión parcial de la aorta por debajo de la arteria renal (70 %), la oclusión parcial de las arterias ilíacas (90 %), la oclusión total de la arteria mesentérica superior y la inferior. Se eligió el tratamiento conservador debido a la ausencia de la posibilidad de utilizar métodos quirúrgicos de tratamiento. Se inició nutrición parenteral intensiva. Se prescribió terapia con insulina. Se ha llevado a cabo terapia con antiagregantes. Con el consentimiento del paciente, se iniciaron infusiones intravenosas diarias de ADNasa pancreática bovina en dosis de 800 mg/día (1.600.000 unidades Kunitz) divididas en 4 administraciones de dos horas. En el séptimo día después del inicio de la terapia se le permitió al paciente tomar alimentos dietéticos. El síndrome de dolor desapareció. El paciente ha recibido nutrición enteral de valor completo hasta el 20º día de terapia. El estado general ha mejorado, el peso corporal ha aumentado. En el día 45º de la terapia se realizó una angiografía como una parte de un estudio preoperatorio. Se observó una disminución del nivel de oclusión de la aorta y las arterias ilíaca en el 20% y el 30%, correspondientemente, y la aparición de la circulación sanguínea en la parte superior e inferior de la arteria mesentérica (oclusión del 80%).

Las muestras de ADN extracelular de este paciente se clonaron mediante el método que permite construir la biblioteca de plasma no amplificada de dicho ADN con representatividad de hasta millón de clones con un tamaño promedio de 300-500 bases.

Aislado de acuerdo con el método mencionado anteriormente, se desproteinizó el ADN con la utilización de proteinasa K (Sigma) a 65°C para la eliminación de las proteínas firmemente unidas. Después de la desproteización del ADN se trató con fenol-cloroformo a 65°C y se sedimentó con 2,5 volúmenes de etanol durante la noche. Después de lo cual, el ADN se procesó con restrictasa EcoRI durante 3 horas o con polimerasa Pfu (Stratagene) en la presencia de 300 µM de todos los desoxinucleotidotrifosfatos para la eliminación de bordes "pegajosos". El ADN completo se fosforiló mediante la polinucleótido quinasa T4 (30U, 2 horas). Las muestras/preparaciones recibidas se ligaron en Bluescript (Stratagene), el plásmido se digirió mediante EcoRI o PvuII correspondientemente y se desfosforiló mediante fosfatasa alcalina CIP (Fermentas) durante 1 hora. Generalmente, se utilizó para la ligadura 1 µg de vector y de 0,1 a 0,5 µg de ADN en suero. La ligadura se realizó utilizando el Rapid Ligation Kit (Roche) durante 10 horas a 16°C. El volumen de mezcla de ligasa fue de 50 µl. La biblioteca ligada se transformó en células DH12S (Life Technologies) utilizando el electroporador (BioRad). Para la transformación de una biblioteca, se utilizaron 12-20 cubetas de electroporación. Se dispusieron en placas diluciones de la biblioteca a concentraciones de 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ para el control en placas con 1,5 % de agar y medio LB. En ambos casos, la representatividad de la biblioteca fue de 2-3x10⁶ clones, aproximadamente.

El análisis de los clones elegidos al azar con una longitud de 300 hasta 1000 unidades de pares de bases de la biblioteca que se había obtenido del ADN extracelular de plasma sanguíneo del paciente antes del tratamiento ha indicado que 56 de 75 clones son fragmentos únicos de ADN humano. Se identificó la función o el producto del gen correspondiente para 11 genes mediante HumanGeneBank.

Gen o producto proteico correspondiente	Función descrita en la Aterosclerosis y Diabetes
Endopeptidasa neutra	En la aterosclerosis su actividad se incrementa en las células endoteliales, células musculares no estriadas, células del estroma de la arteria íntima. La disminución de la actividad puede reducir la acumulación de lípidos en la pared vascular.
Muskelina 1	Es mediadora de la respuesta de las células a la trombospondina 1. Los procesos mediados por la trombospondina 1 son componentes fisiopatológicos de afección aterosclerótica de la pared arterial.
Nf-kappaB	En la hiperglucemia y la aterosclerosis su actividad se incrementa en las células de la pared arterial
Canal catiónico potencial de receptores transitorios	
Fosfolipasa C, epsilon.	Induce la expresión de los receptores de lipoproteínas de baja densidad
CRTL1 : proteína de unión de cartílago 1	
17 kD proteína de cerebro fetal	
Nicotinamida nucleótido transhidrogenasa	
BAI3: inhibidor de la angiogénesis específica cerebral	
GAD2 : glutamato descarboxilasa 2	Uno de los principales autoantígenos en la diabetes tipo 1.
E-selectina	Un nivel de expresión elevado es un factor de riesgo de desarrollo de angiopatía en la diabetes tipo 2.

5 El análisis de 50 clones elegidos al azar de la biblioteca que se obtiene del ADN extracelular de plasma sanguíneo del paciente en el 21^o día después del comienzo del tratamiento ha mostrado que más del 90% de las consecuencias clónicas mostradas son fragmentos cortos de ADN repetitivo humano, en el ADN satélite alfa principal. Los cambios en el perfil electroforético de ADN extracelular sanguíneo que se evalúa mediante electroforesis de gel en campo pulsado se registraron al mismo tiempo.

10 De este modo, la utilización de ADNasa de acuerdo con el método reivindicado posee efecto terapéutico en la aterosclerosis.

10 Ejemplo 3. Tratamiento de la diabetes mellitus.

15 El control metabólico insatisfactorio de la diabetes mellitus, que se manifiesta por un nivel elevado de hemoglobina glucosilada en la sangre y baja sensibilidad a la insulina hace que sea necesaria la utilización de dosis elevadas de insulina y son los factores principales que predisponen al desarrollo de complicaciones.

20 Paciente de 46 años de edad, sufre de diabetes mellitus tipo 2 durante 3 años. Debido a los resultados sin éxito de compuestos antidiabéticos orales que no fueron capaces de disminuir el nivel de glucosa en sangre, se le recetó insulina recombinante humana de acción rápida a 0,3 U/kg (21U/día). El nivel de hemoglobina glucosilada en la sangre era todavía elevado (más de 10 %), han aparecido síntomas de angiopatía y polineuropatía diabética y disminución de la agudeza visual. La demanda diaria de insulina se ha incrementado hasta 1,2 U/kg (84 U/día). Se le prescribió al paciente inyecciones intramusculares de ADNasa pancreática bovina a 200 mg/día (2 veces al día) durante 4 meses. Al final del ciclo de tratamiento el paciente estaba mejor, disminuyó el nivel de hemoglobina glucosilada en la sangre y la dosis diaria de insulina también se ha reducido en dos ocasiones. Los resultados se
25 presentan en la tabla 5.

Tabla 5

Efecto del tratamiento con ADNasa en los índices metabólicos del paciente			
	Antes del tratamiento	Tres meses después del inicio del tratamiento	Cuatro meses después del inicio del tratamiento
Hemoglobina glucosilada (%)	13,2	10,1	7,2
Necesidad de insulina U/Kg de peso corporal	1,2	0,9	0,6
Cantidad de ADN extracelular de plasma sanguíneo (%)	100	85	70

30 La cantidad de ADN extracelular sanguíneo se estimó mediante densitometría de la banda electroforética. La cantidad de ADN antes del tratamiento se tomó como el 100%.

De este modo, la utilización de ADNasa en la diabetes posee un efecto terapéutico de acuerdo con el método reivindicado.

35 Aplicación industrial

40 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 diabetes y aterosclerosis asociadas con cambios cualitativos y/o cuantitativos en la composición del ADN extracelular sanguíneo, 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 extracelular sanguíneo, 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 en total, dentro de un periodo de 24 horas.