

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 096**

51 Int. Cl.:

**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61K 31/726** (2006.01)  
**A61K 31/727** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**A61K 31/737** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2003 E 03739577 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1549337**

54 Título: **Combinación de ADNasa I y glucosaminoglucanos para su uso en limpieza de ADN extracelular**

30 Prioridad:

**18.02.2002 GB 0203830**  
**18.02.2002 GB 0203773**  
**17.05.2002 GB 0211417**  
**18.10.2002 GB 0224329**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.01.2015**

73 Titular/es:

**OCKHAM BIOTECH LIMITED (100.0%)**  
**Manor Farm, 98 Swanwick Lane**  
**Swanwick Hampshire SO31 7HA, GB**

72 Inventor/es:

**SHUTE, JANIS KAY;**  
**CARROLL, MARY PATRICIA;**  
**DR. CONWAY, JOY y**  
**HOCKEY, PETER MOREY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 527 096 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

Combinación de ADNasa I y glucosaminoglucanos para su uso en limpieza de ADN extracelular

### 5 Campo de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1 a 21 y se refiere a ADNasa I y en particular al uso de ADNasa I en el tratamiento de trastornos caracterizados por la presencia de ADN extracelular endógeno.

### 10 Antecedentes de la invención

Las ADNasas son un grupo de enzimas de fosfodiesterasa capaces de hidrolizar el ADN. Actúan de una forma inespecífica, ya que no necesitan la presencia de una secuencia específica en la molécula diana y son capaces de degradar extensamente moléculas de ADN escindiéndolas múltiples veces. Los dos tipos principales de ADNasas son las enzimas de tipo ADNasa I y ADNasa II. Existen también enzimas de tipo ADNasa tipo III. La ADNasa I necesita cationes para estar activa y tiene un pH óptimo casi neutro. Hidroliza el ADN para producir nucleótidos de fosfato en 5'. La ADNasa II puede activarse mediante cationes divalentes y tiene un pH ácido óptimo. Hidroliza el ADN para producir nucleótidos de fosfato en 3'.

Clínicamente se piensa sobre todo que las ADNasas, y en particular la ADNasa I, son útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios y en la actualidad se usan para tratar la fibrosis quística. Se ha sugerido que las ADNasas también pueden ser útiles en el tratamiento de una serie de otras dolencias que incluyen las que implican sitios inflamatorios y trastornos autoinmunitarios como lupus eritematoso sistémico (LES). Los trastornos respiratorios en cuyo tratamiento, según se cree, la ADNasa tiene utilidad se caracterizan por un aumento en la viscosidad del moco debido a la presencia de ADN genómico humano y bacteriano.

El moco es una mezcla compleja de sales, agua, glucoproteínas, proteoglucanos y proteínas que limpia, lubrica y protege numerosos pasos en el organismo, incluidos los de los pulmones. Sin embargo, la presencia de ADN genómico y en particular de largas cadenas de ADN genómico, aumenta la viscosidad del moco hasta el punto en que se ve comprometido el aclaramiento mucociliar. El moco viscoso no se limpia adecuadamente mediante los mecanismos normales y bloquea u obstruye las vías respiratorias del pulmón, limitando de este modo el flujo en las vías respiratorias. También puede promover la aparición de infecciones. En conjunto el efecto puede ser fatal o discapacitante.

Según se piensa el ADN genómico viscoso en estas dolencias respiratorias se origina principalmente en células inflamatorias infiltrantes como los neutrófilos. Estas células, según se cree, experimentan necrosis, en lugar del proceso más controlado de la apoptosis, para liberar grandes cantidades de ADN genómico gelatinoso en el moco. La liberación de otros polímeros, tales como actina, a partir de las células necrosantes puede incrementar aún más la viscosidad del moco.

La fibrosis quística es uno de los principales trastornos respiratorios en los que el incremento anómalo de producción de mucosidad y la presencia de ADN en el moco desempeñan un papel importante. La fibrosis quística es un trastorno heredado autosómico recesivo causado por mutación del gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Es el trastorno heredado más común en personas de ascendencia europea y aparece también en otras poblaciones, aunque normalmente con una menor incidencia. Los pacientes con fibrosis quística muestran normalmente dificultad en la respiración, una pérdida excesiva de sales durante la sudoración y una digestión y absorción incompletas del alimento. La enfermedad puede afectar también a la fertilidad masculina.

El CFTR es un canal de cloruros y está presente en células secretoras de mucosidad. Los iones cloruro son liberados en el moco a través del canal de CFTR. Así se eleva la osmolaridad del moco y se produce el paso de agua desde las células al moco, diluyéndolo y ayudando a garantizar que tiene la viscosidad correcta. En pacientes con fibrosis quística, debido al defecto en CFTR, los iones cloruro no son transportados eficazmente en el moco y de este modo el moco es más viscoso. La captación de sodio, normalmente limitada por la actividad del CFTR, se incrementa y, con ello, la captación de agua que conduce a secreciones condensadas deshidratadas que promueven la infección bacteriana y con ello la inflamación. El número de glóbulos blancos, y en particular neutrófilos, en el moco en el pulmón de pacientes con fibrosis quística también se incrementa enormemente y la necrosis de estas células libera ADN genómico que aumenta adicionalmente la viscosidad del moco.

La fibrosis quística es normalmente fatal, aunque la esperanza de vida para las personas afectadas está en aumento debido a la mejora en los tratamientos. En la década de 1960 en promedio las personas aquejadas de fibrosis quística tenían una esperanza de vida de menos de diez años, mientras que actualmente la esperanza de vida media se aproxima a treinta años.

5

Las ADNasas, y en particular la ADNasa I humana recombinante usada comúnmente en el tratamiento de fibrosis quística, son costosas. Además, aunque las ADNasas se usan en la actualidad para tratar a pacientes con fibrosis quística, aproximadamente del 50 al 70% de los pacientes con fibrosis quística muestran sólo un beneficio mínimo o inexistente después del tratamiento.

10

### **Resumen de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo de que los glucosaminoglucanos que tienen un peso molecular medio de 8 a 40 kd pueden reforzar la actividad de la ADNasa I. El glucosaminoglucano en sí no escinde el ADN, sino que  
15 aumenta la capacidad de hacerlo de la ADNasa I. Este efecto sinérgico inesperado significa que se necesita menos ADNasa I para conseguir el mismo efecto y también que pueden alcanzarse niveles superiores de actividad total en un sistema usando la misma cantidad de ADNasa I.

El mayor nivel de actividad que puede conseguirse con la misma cantidad de enzima puede significar que las  
20 dolencias o las personas previamente refractarias al tratamiento con ADNasas, o que obtuvieron un beneficio mínimo del tratamiento, pueden ahora ser tratables. También puede significar que debe usarse menos ADNasa I lo que es importante en particular en aplicaciones en las que se emplean ADNasas I recombinantes ya que estas enzimas son costosas.

En consecuencia, la presente invención proporciona el uso de un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto con un trastorno  
25 caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno, en el que el sujeto es sometido también a tratamiento con una ADNasa I, el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es: (a) un  
30 trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

La presente invención también proporciona el uso de una ADNasa I en la fabricación de un medicamento destinado  
35 al tratamiento de un sujeto con un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno, en el que el sujeto es sometido también a tratamiento con un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es: (a) un  
40 trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende:

45 - Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

- Una ADNasa I; y

50 - Un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona:

- Productos que comprenden un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tales que el  
55 glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd, y una ADNasa I para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el sujeto destinado a tratamiento, donde el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I y donde los productos están destinados a administrarse de una forma simultánea, separada o en secuencia, en los que el trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;

(b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio;

- 5 - Un agente para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno, comprendiendo el agente un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd, en el que dicho sujeto es sometido a tratamiento con una ADNasa I y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de
- 10 ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio; y

- Un agente para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la presencia de ADN
- 15 extracelular endógeno, comprendiendo el agente una ADNasa I, en el que dicho sujeto es sometido a tratamiento con un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva
- 20 crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

En la presente memoria descriptiva se describe un kit que comprende:

- 25 - Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

- Una ADNasa I; y

- 30 - Un envase.

La invención también proporciona:

- Un nebulizador u otro dispositivo de aerosol líquido, inhalador de polvo seco o inhalador dosificador que
- 35 comprende una composición de acuerdo con la invención; y

- El uso de un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd para incrementar la actividad de una ADNasa *in vitro*.

#### 40 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el efecto de la heparina no fraccionada en la degradación de ADN por ADNasa. El eje Y muestra la concentración de ADN después de la incubación con ADNasa durante 1 hora. El eje X muestra la concentración de ADNasa empleada. Se proporcionan los resultados para incubaciones realizadas en presencia de heparina (□) y

45 en ausencia de heparina (♦).

La figura 2 muestra el efecto de la heparina no fraccionada en la degradación de ADN por ADNasa tal como se determina por electroforesis en gel de agarosa. El panel superior muestra los resultados de la incubación de ADN genómico con ADNasa en ausencia de heparina, mientras que el panel inferior muestra los resultados cuando las

50 mismas digestiones se realizaron en presencia de heparina. Las calles 1 a 12 son las siguientes: calles 1 y 2 - ADN en solitario; calles 3 y 4 - ADN + ADNasa (5 minutos de incubación); calles 5 y 6 - ADN + ADNasa (15 minutos de incubación); calles 7 y 8 - ADN + ADNasa (30 minutos de incubación); calles 9 y 10 - ADN + ADNasa (45 minutos de incubación); calles 11 y 12 - ADN + ADNasa (60 minutos de incubación).

55 La figura 3 muestra el efecto de la heparina no fraccionada en la degradación de ADN por ADNasa tal como se determina mediante microscopía de fuerza atómica (MFA). El Panel A muestra los resultados para ADN incubado por sí mismo. El Panel B muestra los resultados para ADN incubado con ADNasa. El Panel C muestra los resultados para ADN incubado con ADNasa y 1 microgramo por ml de heparina. El Panel D muestra los resultados para ADN incubado con ADNasa y 10 microgramos por ml de heparina.

La figura 4 muestra el efecto de varios glucosaminoglucanos (GAG) en la actividad de la ADNasa. El eje Y muestra la concentración de ADN restante después de una hora de incubación con ADNasa y el GAG, mientras que el eje X muestra la concentración de GAG empleada. Se muestran los resultados para (A) heparina; (B) una mezcla de condroitín sulfato A y C; (C) heparán sulfato; (D) heparina de bajo peso molecular; y (E) sulfato de dextrano (que es un control sin GAG).

La figura 5 muestra el efecto de una mezcla de condroitín sulfato A y C en la eficacia de la ADNasa en el esputo de fibrosis quística tal como se valora usando un ensayo de barrera que implica la medida del transporte de microesferas fluorescentes. Se muestran los resultados para una diversidad de concentraciones de condroitín sulfato.

La figura 6 muestra el efecto de una mezcla de condroitín sulfato A y C en la degradación de ADN por ADNasa tal como se determina por microscopia de fuerza atómica (MFA). El Panel A muestra los resultados obtenidos en un control de ADN sin ADNasa ni condroitín sulfato. El Panel B muestra los resultados para ADN incubado con ADNasa en solitario. El Panel C muestra los resultados para ADN incubado con ADNasa y condroitín sulfato.

#### **Breve descripción de las secuencias**

20 SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de nucleótidos y aminoácidos para ADNasa 1 humana.

SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos para ADNasa 1 humana.

#### **Descripción detallada de la invención**

25

La presente invención se refiere a la administración, a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno, de un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, para potenciar la actividad de una ADNasa I que se administra al sujeto con el fin de tratar el trastorno. El trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

30

Se potencia así la actividad de la ADNasa I. Puede observarse un efecto sinérgico. En una realización especialmente preferida de la invención el glucosaminoglucano empleado será una heparina o una sal fisiológicamente aceptable de la misma. La ADNasa empleada es una ADNasa I. En una realización adicional preferida especialmente el glucosaminoglucano se administrará por vía intranasal y/o por inhalación.

35

#### *Sinergia de glucosaminoglucano con ADNasa I*

40

Inesperadamente los glucosaminoglucanos con un peso molecular medio de 8 a 40 kd son capaces de incrementar la actividad de la ADNasa I. Es decir, la misma cantidad molar de enzima tiene una mayor actividad en presencia de glucosaminoglucano que en ausencia de glucosaminoglucano. El glucosaminoglucano en solitario no tiene actividad hidrolítica de ADN, o es insignificante, y así el aumento en la actividad se debe específicamente a un aumento en la actividad de la enzima en presencia de glucosaminoglucano.

45

La velocidad de digestión del ADN, es decir, la cantidad de ADN digerido por unidad de tiempo puede incrementarse una, dos, tres, diez, veinte o más veces mediante la adición del glucosaminoglucano. La mejora en la actividad de la ADNasa I puede estar comprendida normalmente entre el 5% y el 5.000%, preferentemente entre el 50 y el 2.500%, más preferentemente entre el 75 y el 1.000%, más preferentemente todavía entre el 100 y el 1.000%, más preferentemente aún entre el 250 y el 1.000% y todavía más preferentemente entre el 500 y el 1.000%. Estas mejoras se referirán normalmente a la cantidad de ADN que la ADNasa I puede degradar en un instante dado y preferentemente a la actividad de la enzima expresada en unidades Kunitz o alternativamente unidades Dornase.

50

Una unidad Kunitz de ADNasa I producirá una A260 delta de 0,001 por minuto por ml a pH 5,0 a 25 °C, usando ADN como sustrato, con  $[Mg^{2+}] = 4,2$  mM. Preferentemente el ADN usado para valorar la actividad de la ADNasa I será ADN genómico de timo de ternera o esperma de salmón. Una unidad Dornase se define como la cantidad de enzima que provocará una disminución de 1,0 unidades de viscosidad relativa en una solución de ADN altamente polimerizado con respecto a una viscosidad original de 4,0 en 10 minutos a 37 °C.

55

La presencia de glucosaminoglucano puede aumentar de forma efectiva el número de unidades de actividad de la enzima ADNasa I presente en más de una vez, dos veces, tres veces, cinco veces, diez veces, veinte veces o más. Normalmente, la presencia de glucosaminoglucano puede reducir de forma eficaz la cantidad molar de ADNasa I necesaria para conseguir la misma actividad a la mitad, la cuarta parte, la quinta parte, la décima parte o más. El glucosaminoglucano puede asegurar una digestión más completa de ADN en un instante dado para la misma cantidad de ADNasa I y así el promedio, o tamaño de fragmento principal, presente puede ser normalmente dos, tres, cinco, diez, veinte, cincuenta o más veces más largo en ausencia que en presencia de glucosaminoglucano después de la incubación durante una cantidad de tiempo equivalente.

10

En la presente memoria descriptiva se describe una serie de procedimientos para someter a ensayo la actividad de la ADNasa I. Cualquiera de ellos puede usarse para valorar la actividad de la ADNasa I. En particular puede usarse un ensayo basado en fluorescencia que usa, por ejemplo, colorante Hoechst tal como se describe en Labarce y Paiden, 1980, Anal. Biochem., 102:344-352 para someter a ensayo la hidrólisis de ADN. Puede usarse electroforesis en gel para valorar el tamaño de los fragmentos de ADN.

15

El glucosaminoglucano o la sal del mismo se proporcionan normalmente en una cantidad que produce un efecto sinérgico en la actividad de la ADNasa I. Así puede conseguirse uno o más de los valores dados en la presente memoria descriptiva para incrementar la actividad. La proporción entre ADNasa I y glucosaminoglucano, o sal en peso o alternativamente por unidades puede ser, por ejemplo, de 1:50.000 a 1.000:1, preferentemente de 1:10.000 a 100:1, más preferentemente de 1:5.000 a 50:1, más preferentemente todavía de 1:1.000 a 25:1. La proporción puede ser, por ejemplo, de 1:500 a 1:20, preferentemente de 1:150 a 1:5, más preferentemente de 1:50 a 1:2 y más preferentemente todavía de 1:10 a 1:1. Los dos pueden estar, por ejemplo, en las mismas cantidades o bien la ADNasa I puede estar en un exceso de dos veces, cinco veces, diez veces o más o alternativamente el glucosaminoglucano puede estar presente en un exceso similar.

20

#### *ADNasa 1*

En la presente invención puede usarse cualquier ADNasa I. Por tanto, la ADNasa es una ADNasa I (EC 3.1.21.1). Las ADNasas I aparecen en una serie de especies y cualquier ADNasa I capaz de escindir el ADN puede usarse en la invención. La ADNasa I puede ser de una fuente animal como, por ejemplo, de origen bovino o porcino. Puede ser de origen vegetal, fúngico o microbiano. Sin embargo, normalmente y con la máxima preferencia la ADNasa I es de origen humano y es preferentemente una ADNasa I humana recombinante. En las realizaciones de la invención pueden usarse preparaciones de ADNasa I disponibles comercialmente tales como Dornase™ y Pulmozyme™.

30

La ADNasa I tendrá actividad hidrolítica de ADN, por ejemplo puede hidrolizar el ADN para proporcionar nucleótidos de fosfato en 5'. Puede usarse un ensayo basado en fluorescencia usando, por ejemplo, colorante Hoechst tal como el detectado en Labarce y Paiden, 1980, Anal. Biochem., 102:344-352 para someter a ensayo la hidrólisis de ADN. La actividad hidrolítica puede valorarse de distintas formas conocidas en la técnica lo que incluye electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida analítica, ensayo de hipercromicidad (Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:349-362 (1950); Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:363-377 (1950)) o ensayo de verde de metilo (Kumick, Arch. Biochem. 29:41-53 (1950); Sinicropi, y col., Anal. Biochem. 222:351-358 (1994)). La descomposición de moléculas de ADN de formas de peso molecular alto o bajo puede someterse a seguimiento preferentemente mediante técnicas tales como electroforesis en gel de agarosa. Pueden realizarse experimentos de control en ausencia de la enzima y/o en presencia de una proteína de la que se sabe que posee actividad de la ADNasa I.

35

La ADNasa I mostrará preferentemente actividad mucolítica para muestras de mucosidad que contienen ADN. Actividad mucolítica se refiere a la reducción de la viscoelasticidad (viscosidad) del moco. La actividad mucolítica puede determinarse mediante cualquiera de varios procedimientos diferentes conocidos en la técnica, lo que incluye ensayos de compactación de esputo (véase por ejemplo el documento WO-94/10.567) que usan un péndulo de torsión (Janmey, J. Biochem. Biophys. Methods 22:41-53 1991) u otras metodologías reológicas adecuadas.

40

Se sabe que la ADNasa I tiene predisposición a la desamidación. Los residuos de asparagina y en particular la asparagina en las posiciones de aminoácidos 7 y 74 de la ADNasa I humana madura son proclives a la desamidación. Este procedimiento convierte los residuos de asparagina en cuestión en residuos de ácido aspártico o iso-aspartato. La desamidación reduce la actividad de la enzima y así sucede en particular para la desamidación en la asparagina en la posición de aminoácidos 74 de ADNasa I humana madura.

45

Se dispone de técnicas para eliminar las formas desamidadas de las enzimas y dejar las formas amidadas que

pueden emplearse para preparar ADNasa I destinada a su uso en la invención. Estas técnicas pueden incluir intercambio catiónico tentacular (TCX) o purificación de afinidad usando ADN para purificar las formas amidadas de la enzima que todavía son capaces de unirse al ADN.

5 Una preparación de ADNasa I para su uso en la invención puede comprender normalmente del 85 al 100%, preferentemente del 90 al 100%, más preferentemente del 95 al 100% y más preferentemente todavía del 99 al 100% de enzima amidada, o parcialmente amidada, en peso. En particular estas cifras se refieren a la cantidad de enzima totalmente amidada, es decir, con la amidación de la totalidad de los residuos que están amidados de forma natural. Normalmente tendrán más del 95%, preferentemente más del 99% y más preferentemente todavía más del 10 99,9% de la ADNasa I en una forma amidada. En particular, estos valores se refieren a valores en el momento de la producción o a sus valores desde un mes a un año, preferentemente de dos a seis meses y más preferentemente de tres a cuatro meses después de la producción. Pueden referirse al valor durante cualquier punto de la vida en almacenamiento del producto.

15 Se sabe que determinadas superficies promueven la desamidación de la ADNasa I y con ello que las composiciones farmacéuticas, preparaciones y medicamentos de la invención no se almacenan preferentemente en contacto con vidrio. Sin embargo, pueden almacenarse en recipientes de vidrio que estén recubiertos con una capa no vítrea de manera que el vidrio no esté en contacto con la ADNasa I. Alternativamente pueden suministrarse en recipientes de plástico u otros recipientes adecuados no de vidrio.

20 En la invención pueden usarse variantes de ADNasa I conocida o de ocurrencia natural. Así el término ADNasa I comprende dichas variantes. El término "variantes" se refiere a polipéptidos que tienen el mismo carácter esencial o funcionalidad biológica básica que la ADNasa I. El carácter esencial de una ADNasa I es la actividad de fosfodiesterasa y la capacidad de hidrolizar el ADN. En la presente memoria descriptiva se describen ensayos para 25 medir la escisión de ADN y pueden usarse para determinar si una variante tiene actividad hidrolítica.

La SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos para ADNasa I humana y en la invención se comprenden las variantes de esta secuencia. Normalmente, polipéptidos con más del 65% de identidad, preferentemente al menos el 80% o al menos el 90% y en particular preferentemente al menos el 95%, al menos el 30 97% o al menos el 99% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que conservan la actividad hidrolítica de ADN, se consideran variantes que pueden emplearse en la invención. Dichas variantes pueden incluir variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de proteínas, siempre y cuando el péptido mantenga la actividad hidrolítica de ADN y más del 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

35 Es posible realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, pueden introducirse de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones. El polipéptido modificado conservará la actividad de la ADNasa I. Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí.

40

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares sin carga	C S T M
		N Q
	Polares con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Dentro del alcance de la invención se encuentran variantes más cortas. Por ejemplo, se considera que un péptido de al menos 20 aminoácidos o hasta 50, 60, 70, 80, 100, 150 ó 200 aminoácidos de longitud se sitúa dentro del alcance de la invención siempre y cuando demuestren actividad hidrolítica de ADN y más del 65% de identidad con la 45 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En particular, pero no de forma exclusiva, este aspecto de la invención comprende la situación en que la proteína es un fragmento de la secuencia completa de proteínas de SEQ ID NO: 2 y puede representar una región hidrolítica y de unión a ADN que incluye en particular el sitio activo.

Puede usarse una diversidad de programas para calcular la homología porcentual. UWGCG Package proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (usado, por ejemplo, en los ajustes por defecto) 50 (Devereux y col. (1984) Nucleic Acids Research 12, p. 387-395). Pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear las secuencias (normalmente en sus ajustes por defecto), por ejemplo tal como

se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S, F y col. (1990) *J Mol Biol* 215:403-10.

El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras de longitud breve W en la secuencia de consulta que se correspondan con o satisfagan una determinada puntuación T de umbral de valor positivo cuando existe alineación con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como umbral de puntuación de palabra de proximidad (Altschul y col., ver más arriba). Estas coincidencias de palabras de proximidad iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas destinadas a encontrar HSP que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en las dos direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que sea posible incrementar la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones para las coincidencias de palabras en cada dirección se interrumpen cuando: la puntuación de alineación acumulativa se sitúan fuera en una cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa desciende a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de las dos cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la semejanza entre dos secuencias; véase por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medida de semejanza proporcionada por el algoritmo BLAST es la suma mínima de probabilidades (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produzca por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la suma mínima de probabilidades en la comparación entre la primera secuencia y la segunda secuencia es inferior aproximadamente a 1, preferentemente inferior aproximadamente a 0,1, más preferentemente inferior aproximadamente a 0,01, y con la máxima preferencia inferior aproximadamente a 0,001.

La ADNasa I empleada puede ser en realidad una variante que tiene afinidad reducida por la actina en comparación con la ADNasa I de la que procede. Estas variantes pueden usarse, por ejemplo, cuando la actina está presente como adición al ADN y preferentemente cuando el trastorno destinado a tratamiento es un trastorno respiratorio en el que la actina está presente en el moco.

La variante puede tener del 0 al 50%, preferentemente del 0 al 25%, más preferentemente del 0 al 15% y más preferentemente todavía del 0 al 5% de la afinidad de la ADNasa I no modificada de la que procede por la actina y preferentemente de la de ADNasa I humana. La afinidad de la variante por la actina puede reducirse de 1 a 1.000 veces, preferentemente de 5 a 500 veces, más preferentemente de 10 a 100 veces y más preferentemente todavía de 20 a 50 veces. Estas cifras pueden referirse a afinidad por acción polimérica o monomérica o ambas. La variante puede carecer totalmente de la capacidad de unirse específicamente a actina. Sin embargo, las variantes con actividad reducida por la actina conservarán parte o la totalidad de su capacidad hidrolítica y de su capacidad para unirse a ADN y escindirlos.

Pueden realizarse cambios en aminoácidos en una ADNasa I para introducir un sitio de glucosilación en, o cerca de, un sitio de unión a actina de la ADNasa I para reducir la afinidad de la variante por la actina. Las regiones o residuos responsables de la unión a actina pueden ser borrados o sustituidos por aminoácidos alternativos. Pueden realizarse inserciones o modificaciones cerca de los sitios de unión a actina para desajustar su función. Las variantes preferidas de ADNasa I con afinidad reducida por la actina se detallan en la patente de EEUU 6.348.343 y en la presente invención puede emplearse cualquiera de las variantes de la ADNasa I detalladas en el presente documento con afinidad reducida por la actina, pero que conservan la actividad hidrolítica de ADN. A continuación puede determinarse la reducción en la capacidad de unión a actina para verificar que la afinidad por la actina se reduce, a la vez que se conserva la actividad hidrolítica de ADN.

La capacidad de una variante para unirse a la actina puede ser objeto de seguimiento mediante técnicas conocidas en la técnica tales como las detalladas en Mannherz, y col., *Eur. J. Biochem.* 104:367-379 (1980). Las afinidades de unión relativas de diferentes ADNasas I pueden determinarse midiendo la unión de la ADNasa I a actina inmovilizada en un ensayo ELISA o comparando la actividad hidrolítica de ADN de la ADNasa I en presencia y ausencia de actina.

La secuencia de la ADNasa I puede modificarse de manera que tenga una semivida extendida. Por ejemplo, la

secuencia de la enzima puede modificarse para eliminar las secuencias de reconocimiento para determinadas proteasas y en particular para las derivadas de células inflamatorias presentes en el pulmón u otros sistemas en los que se empleará la invención.

5 La ADNasa I puede modificarse también químicamente para alterar sus propiedades tales como, por ejemplo, su semivida biológica. Para conseguir estas modificaciones covalentes pueden introducirse haciendo reaccionar residuos de aminoácidos diana de la ADNasa I nativa o en variante con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de aminoácido o residuos en el extremo N o C. Los agentes y los procedimientos de derivación son bien conocidos en la técnica.

10 Entre los residuos que pueden someterse en particular a derivación se incluyen residuos de cisteinilo (muy frecuentemente por reacción con  $\alpha$ -haloacetatos), residuos de histidilo (por reacción con dietilpirocarbonato en pH 5,5-7,0), residuos terminales de lisinilo y amino (por reacción con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos), residuos de arginilo (por reacción con reactivos tales como fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-  
15 ciclohexanodiona y ninhidrina). Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse selectivamente por reacción con carbodiimidias o pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio. La fijación covalente de agentes tales como polietilenglicol (PEG) o albúmina sérica humana a las ADNasas I puede reducir su inmunogenicidad y/o toxicidad de la variante y/o prolongar su semivida y por consiguiente puede usarse en la invención.

20 La ADNasa I puede conjugarse directamente con el glucosaminoglucano o unirse a través de una molécula intermedia.

#### *Glucosaminoglucanos*

25 Los medicamentos y usos de la invención emplean glucosaminoglucanos tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 21. Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos lineales que poseen secuencias de repetición características que normalmente están altamente sulfatadas en N y O en residuos de D-glucosamina, galactosamina y ácido urónico. Estas fracciones de sulfato introducen un alto grado de carga negativa a lo largo de  
30 la cadena polimérica de glucosaminoglucano y se añaden a la heterogeneidad de estas macromoléculas.

En la invención puede emplearse cualquier glucosaminoglucano adecuado según las reivindicaciones. Preferentemente, el glucosaminoglucano estará en una forma adecuada para su administración por vía intranasal, por inhalación y/o por instilación ya que normalmente los medicamentos de la invención se administrarán por dichas  
35 vías. Los glucosaminoglucanos y las sales de glucosaminoglucanos adecuados para su uso en la presente invención tendrán un peso molecular medio de 8 a 40 kd, preferentemente de 10 a 30 kd, más preferentemente de 12 a 20 kd. En particular, el glucosaminoglucano o la sal puede tener un peso molecular medio de 14 a 18 kd, preferentemente de 15 a 17 kd y más preferentemente de 16 a 17 kd. En algunos casos todas, o sustancialmente todas, las moléculas de glucosaminoglucano o las moléculas de sales de glucosaminoglucano tendrán un peso molecular  
40 comprendido dentro de los intervalos especificados anteriormente. Así del 50 al 100%, preferentemente del 75 al 100%, más preferentemente del 90 al 100%, más preferentemente todavía del 95 al 100% de las moléculas pueden tener dicho peso molecular. En algunos casos al menos el 95%, preferentemente el 97,5%, más preferentemente el 99%, más preferentemente todavía el 99,5% y más preferentemente aún el 99,9% pueden tener un peso molecular comprendido dentro del intervalo. El glucosaminoglucano o la sal descritos en la presente memoria descriptiva  
45 pueden estar presentes en un intervalo de tamaños de peso molecular y normalmente el tamaño de peso molecular que se produce con la mayor frecuencia estará situado dentro de uno de los intervalos de pesos moleculares especificados anteriormente.

Preferentemente, el glucosaminoglucano empleado en la invención será cualquiera entre condroitín sulfato A a E,  
50 heparina, sulfato de heparina, heparano, heparán sulfato, ácido hialurónico, queratán sulfato o una mezcla o dos cualesquiera de los mismos. El condroitín sulfato B se refiere a veces como sulfato de dermatano. En una realización más preferida de la invención el glucosaminoglucano será cualquiera entre condroitín sulfato A, C, D o E, heparina, sulfato de heparina, heparano, heparán sulfato, ácido hialurónico, queratán sulfato o una mezcla de dos cualesquiera de los mismos. En una realización preferida en particular el glucosaminoglucano será condroitín sulfato  
55 A, condroitín sulfato C, heparina, sulfato de heparina, heparano, heparán sulfato o una mezcla de dos cualesquiera de los mismos. Más preferentemente, el glucosaminoglucano será condroitín sulfato A, condroitín sulfato C, heparina o una mezcla de dos cualesquiera de los mismos. En una realización de la invención todavía más preferida el glucosaminoglucano será heparina. En algunas realizaciones de la invención el glucosaminoglucano empleado será una mezcla de más de dos glucosaminoglucanos de uno de los grupos mencionados anteriormente, por ejemplo una

mezcla de tres, cuatro o cinco glucosaminoglucanos.

En realizaciones de la invención en las que se emplea una mezcla de dos glucosaminoglucanos los dos, por ejemplo, pueden estar presentes en la proporción de 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 ó 1:100. La proporción puede ser de 90:10, 5 80:20, 70:30, ó 60:40. Puede emplearse cualquier proporción adecuada y cualquier glucosaminoglucano puede estar en una concentración más elevada. La proporción puede ser la misma que la proporción en la que los dos se aíslan cuando se recuperan de un tejido común usando técnicas estándar. En una realización preferida de la invención se empleará una mezcla de condroitín A y C y en particular en una proporción de 80:20, preferentemente 75:25 y más preferentemente todavía 70:30 con el condroitín sulfato A estando presente en el nivel más alto.

10 Normalmente, el glucosaminoglucano no se habrá sometido a fragmentación para reducir su peso molecular. Por lo común, el glucosaminoglucano no se habrá sometido a despolimerización, por ejemplo por medios químicos o enzimáticos, para reducir su peso molecular. El número medio de unidades de sacárido en las cadenas de polisacáridos del glucosaminoglucano puede estar comprendido normalmente entre 18 y 100, preferentemente entre 15 30 y 80, más preferentemente entre 40 y 60 y más preferentemente todavía entre 5 y 60 unidades.

El glucosaminoglucano puede ser cualquier glucosaminoglucano adecuado disponible comercialmente y, por ejemplo, puede ser un glucosaminoglucano no fraccionado. El glucosaminoglucano normalmente habrá sido aislado a partir de fuentes naturales tales como un animal. En algunos casos, el glucosaminoglucano puede haber sido 20 sintetizado en lugar de ser una molécula de ocurrencia natural.

En algunos casos el glucosaminoglucano puede haber sido aislado a partir de un animal, y en particular de tejidos animales tales como los de cerdos o vacas. El glucosaminoglucano puede haberse obtenido de tejidos tales como el pulmón, el hígado o el intestino de un animal y en particular de pulmón de vaca o mucosa intestinal de cerdo. El 25 glucosaminoglucano puede haberse obtenido de la piel de dicho organismo.

El glucosaminoglucano puede haber sido aislado a partir de un pez cartilaginoso u otro organismo marino o de agua dulce. En algunos casos el glucosaminoglucano puede haber sido aislado a partir de un tiburón o un calamar y en particular a partir del cartílago de un organismo de este tipo. El glucosaminoglucano puede haber sido aislado a 30 partir de esturión y en particular de notocordio de esturión.

Uno de los glucosaminoglucanos especificados mencionados anteriormente puede haberse modificado para generar un derivado del glucosaminoglucano. Dichos derivados pueden usarse en la invención siempre y cuando conserven la capacidad de incrementar la actividad de la ADNasa I. Así en presencia del derivado una cantidad molar dada de 35 ADNasa I mostrará un nivel superior de actividad que en ausencia del derivado. Así en el caso de la heparina, la heparina puede haberse sometido a desulfonación en O por ejemplo, al menos en las posiciones 2-O y 3-O. Pueden realizarse modificaciones iguales o equivalentes en otros glucosaminoglucanos para generar derivados destinados a su uso en la presente invención.

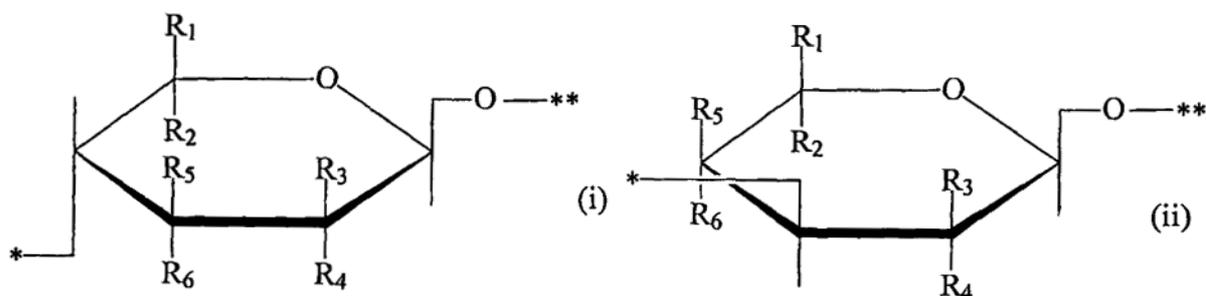
40 El glucosaminoglucano puede haber sido sometido a acetilación, desacetilación, oxidación y/o descarboxilación tales como, por ejemplo, oxidación con peryodato para generar un derivado. En la invención pueden usarse heparinoides.

En la presente memoria descriptiva se describe un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que comprende unidades de disacáridos de repetición de fórmula general (1):

45 
$$-[A-B]- \quad (1)$$

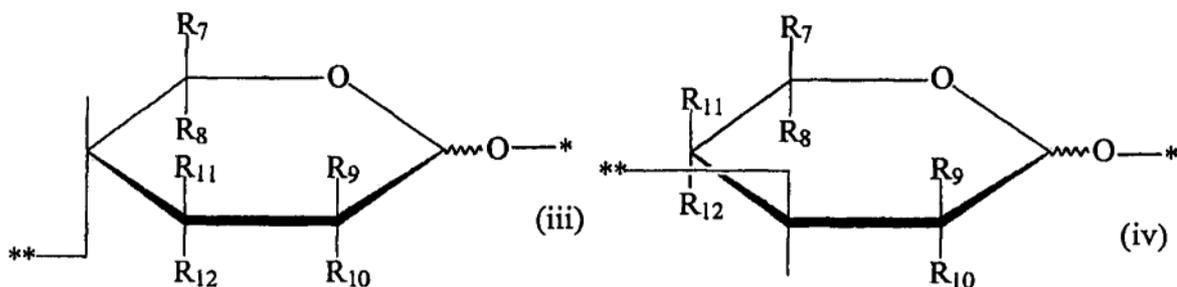
donde:

50 cada A es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (i) o (ii)



donde:

- 5 - Uno entre  $R_1$  y  $R_2$  es hidrógeno, y el otro es  $-CO_2H$ ,  $-SO_3H$  o  $-CH_2OR$  en el que R es hidrógeno o  $-SO_3H$ ;
- Uno entre  $R_3$  y  $R_4$  es hidrógeno, y el otro es  $-OR$  en el que R es hidrógeno o  $-SO_3H$ ;
- Uno entre  $R_5$  y  $R_6$  es hidrógeno, y el otro es  $-OH$ ;
- 10 - \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción B adyacente; y
- \*\* representa un enlace directo con una fracción B adyacente;
- 15 cada B es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (iii) o (iv);



donde:

- 20 - Uno entre  $R_7$  y  $R_8$  es hidrógeno y el otro es  $-CH_2OH$  o  $-CH_2OSO_3H$ ;
- Uno entre  $R_9$  y  $R_{10}$  es hidrógeno y el otro es  $-NHAc$ ,  $-NH_2$  o  $-NHSO_3H$ ;
- 25 - Uno entre  $R_{11}$  y  $R_{12}$  es hidrógeno y el otro es  $-OH$  o  $-OSO_3H$ ;
- \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción A adyacente;
- \*\* representa un enlace directo con una fracción A adyacente; y
- 30 - ww indica un enlace en cualquier orientación estereoquímica;
- o una sal fisiológicamente aceptable del mismo.
- 35 Las fórmulas en la presente memoria descriptiva adoptan la práctica estándar para la representación de azúcares. De acuerdo con esta práctica, las fórmulas incluyen líneas verticales a través de cada uno de los átomos de carbono cíclicos. Esto no significa, naturalmente, que se fijen grupos metilo en cada posición, o que estén presentes grupos metileno como parte del enlace entre fracciones cíclicas adyacentes.

Preferentemente, cada fracción A en el glucosaminoglucano de fórmula general (1) es la misma. Preferentemente, cada fracción B en el glucosaminoglucano de fórmula general (1) es la misma.

5 Preferentemente, cada fracción A en el glucosaminoglucano de fórmula general (1) es una fracción de fórmula general (i).

Normalmente, uno entre R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es hidrógeno, y el otro representa -CO<sub>2</sub>H o -CH<sub>2</sub>OR, en el que R es hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H. Preferentemente, uno entre R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es hidrógeno y el otro representa -CO<sub>2</sub>H.

10

Normalmente, R<sub>3</sub> es hidrógeno y R<sub>4</sub> es -OR, en el que R representa hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H.

Normalmente R<sub>5</sub> es -OH y R<sub>6</sub> es hidrógeno.

15

Normalmente cada A es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (i).

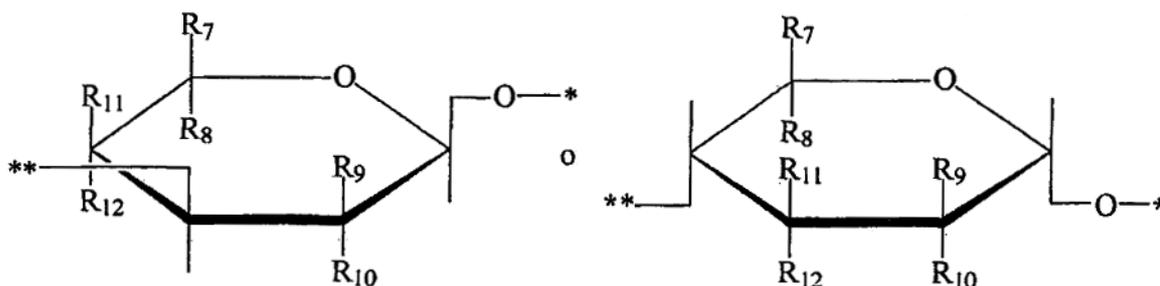
Normalmente R<sub>7</sub> es -CH<sub>2</sub>OH o -CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H y R<sub>8</sub> es hidrógeno.

Normalmente R<sub>9</sub> es hidrógeno y R<sub>10</sub> es -NHAc, -NH<sub>2</sub> o -NHSO<sub>3</sub>H.

20

Normalmente R<sub>11</sub> es -OSO<sub>3</sub>H o -OH y R<sub>12</sub> es hidrógeno.

Normalmente cada B es el mismo o diferente y representa



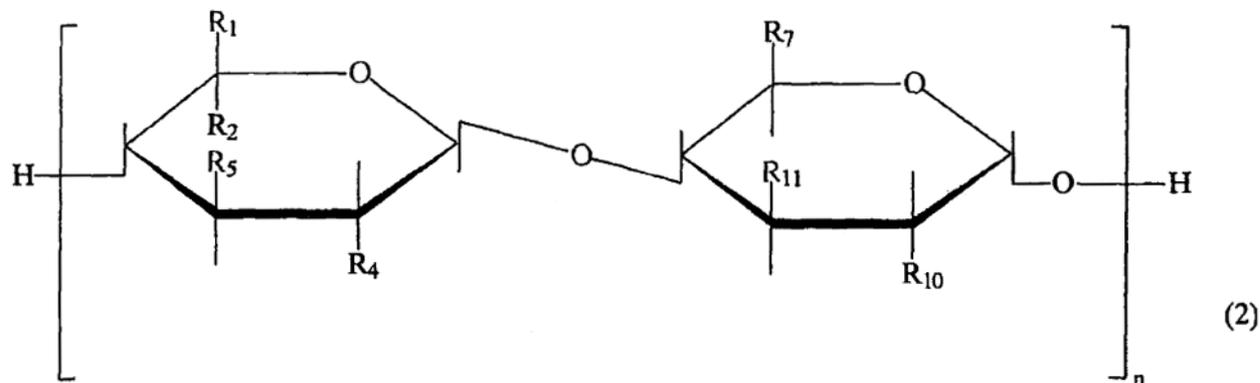
25

en el que R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> \* y \*\* son tal como se describe anteriormente.

30

Preferentemente R<sub>1</sub> no es hidrógeno en una fracción A que es adyacente a una fracción (iv) en la que R<sub>12</sub> es hidrógeno.

Normalmente el glucosaminoglucano de fórmula general (1) es un glucosaminoglucano de fórmula general (2)



35

donde:

- Uno entre  $R_1$  y  $R_2$  es hidrógeno y el otro es  $-CO_2H$ ;

-  $R_4$  es  $-OH$  o  $-OSO_3H$ ;

5

-  $R_5$  es  $-OH$ ;

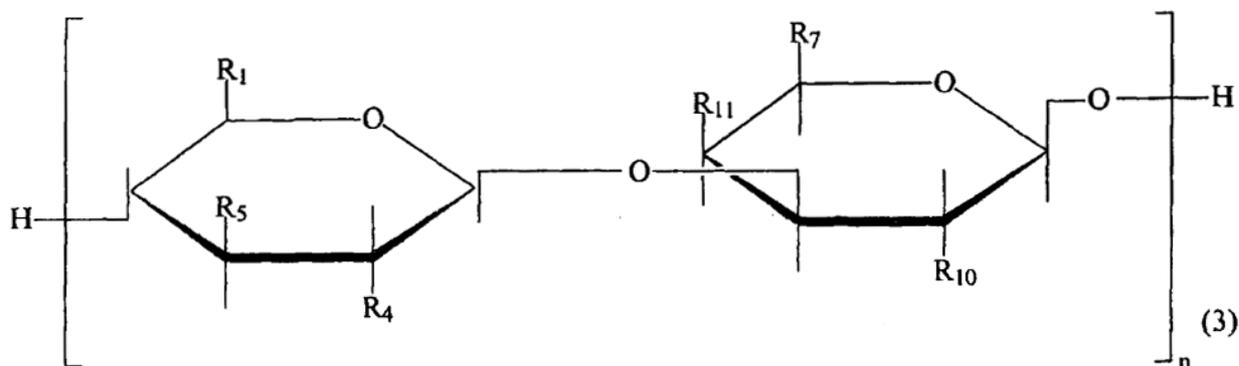
-  $R_7$  es  $-CH_2OH$  o  $-CH_2OSO_3H$ ;

10 -  $R_{10}$  es  $-NH_2$ ,  $-NH_3^+$  o  $-NHAc$ ; y

-  $R_{11}$  es  $-OSO_3H$  o  $-OH$ .

Normalmente el glucosaminoglucano de fórmula general (1) es un glucosaminoglucano de fórmula general (3)

15



donde:

20 -  $R_1$  es  $-CO_2H$ ;

-  $R_4$  es  $-OH$ ;

-  $R_5$  es  $-OH$ ;

25

-  $R_7$  es  $-CH_2OH$  o  $-CH_2OSO_3H$ ;

-  $R_{10}$  es  $-NHAc$ ; y

30 -  $R_{11}$  es  $-OH$  o  $-OSO_3H$ .

Puede emplearse cualquier sal de glucosaminoglucano adecuada fisiológicamente aceptable y en particular una sal metálica, por ejemplo una sal de sodio, una sal de metal alcalino o una sal de metal alcalinotérreo. Otras sales incluyen sales de calcio, litio y cinc. También pueden usarse sales de amonio. La sal puede ser glucosaminoglucanato de sodio o sulfato de glucosaminoglucano. En la invención pueden usarse también sales de derivados de glucosaminoglucanos específicos mencionados en la presente memoria descriptiva. En la presente solicitud en la que se hace mención de un glucosaminoglucano, dicha mención incluye también las sales fisiológicamente aceptables del mismo.

40 Normalmente una sal fisiológicamente aceptable es una sal con un ácido o base fisiológicamente aceptable. Las sales preferidas son sales con bases fisiológicamente aceptables. Normalmente, dichas sales son compuestos en los que el átomo de hidrógeno ácido de un grupo  $-CO_2H$  y/o  $-OSO_3H$  es sustituido por un catión, por ejemplo, un catión de metal alcalino (por ejemplo, sodio o potasio) o de metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio o magnesio). Dichas sales pueden prepararse, por ejemplo, por reacción con un hidróxido apropiado.

45

El número de unidades de disacárido presente en el glucosaminoglucano o la sal del mismo empleados en la invención será tal que el peso molecular del glucosaminoglucano o la sal es de 8 a 40 kd, preferentemente de 10 a

30 kd, más preferentemente de 12 a 20 kd. En particular, puede ser de tal forma que el glucosaminoglucano tenga un peso molecular de 14 a 18 kd, preferentemente de 15 a 17 kd y más preferentemente de 16 a 17 kd. El número de unidades de disacárido presentes en el glucosaminoglucano puede representarse mediante el número n, en el que n es cualquier número entero tal que el glucosaminoglucano tenga un peso molecular situado dentro de 5 cualquiera de los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente.

Así el glucosaminoglucano o la sal empleados pueden representarse mediante la fórmula general:



10

donde -A-B es cualquiera de los disacáridos mencionados anteriormente y n es un número entero tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular situado dentro de los intervalos de peso molecular especificados anteriormente. El valor de n puede ser, por ejemplo, de 30 a 55 y más preferentemente de 35 a 50.

15 El glucosaminoglucano empleado en la invención comprenderá normalmente más de una cadena de longitud. Por ello n para algunas de las cadenas de glucosaminoglucano presentes puede ser un número entero menor o mayor que un número entero que, por sí mismo, produciría un tamaño de cadena de peso molecular situado dentro de uno de los intervalos especificados anteriormente. Así el valor medio de n del glucosaminoglucanos presente en los medicamentos de la invención puede ser cualquiera de los valores especificados para n en la presente memoria  
20 descriptiva y en particular un valor de n que proporciona un glucosaminoglucano o sal de peso molecular situado entre uno de los intervalos de peso molecular especificados en la presente memoria descriptiva.

Se prefiere en particular que las sales para su uso en la invención sean sales de fórmula:

25



donde  $x \leq 4n$  y M representa un catión fisiológicamente aceptable o una mezcla del mismo. Con la máxima preferencia,  $x \leq 2n$ .

30 En una realización preferida en particular de la invención el glucosaminoglucano empleado será una heparina o una sal fisiológicamente aceptable de la misma. La heparina es un mucopolisacárido de ocurrencia natural presente en diversos órganos y tejidos, en particular el hígado, el pulmón y las grandes arterias. La heparina es un polímero de residuos alternos de  $\alpha$ -D-glucosamina y hexuronato unidos por enlaces (1,4)-glucosídicos. Cuando los glucosaminoglucanos se sintetizan en la naturaleza, normalmente se conjugan con el núcleo central de una proteína.  
35 Sin embargo, preferentemente los glucosaminoglucanos descritos en la presente memoria descriptiva carecen de dicho núcleo central. Normalmente, las preparaciones de glucosaminoglucanos carecerán de un núcleo y pueden emplearse o, si están presentes, puede eliminarse el núcleo. Las preparaciones de glucosaminoglucanos disponibles comercialmente carecerán por lo común del núcleo y pueden emplearse.  
40 La heparina se usa clínicamente como un anticoagulante, del que se piensa que ejerce sus efectos a través de la interacción con antitrombina III (AT-III) y cofactor de heparina II y otros factores de coagulación. Normalmente la heparina conservará cierta actividad anticoagulante, es decir, será capaz de aumentar el tiempo de coagulación en una persona. Así preferentemente la heparina será capaz de unirse a antitrombina III (AT-III) y/o cofactor de heparina II (HCII) y con ello inhibir la coagulación. Preferentemente será capaz de formar un complejo con AT-III,  
45 trombina y un factor de coagulación. También puede emplearse una heparina que carezca de actividad anticoagulante o que tenga una actividad anticoagulante reducida. Así la heparina puede haber sido modificada de manera que tenga del 0 al 80%, preferentemente del 5 al 60%, más preferentemente del 10 al 40% y más preferentemente todavía del 10 al 30% de la actividad de la forma no modificada o en comparación con una heparina no modificada. Otros glucosaminoglucanos, en particular el sulfato de dermatano, poseen también actividad  
50 anticoagulante. Preferentemente, por tanto, los glucosaminoglucanos y sus derivados empleados conservarán cierta actividad anticoagulante, tal como se expone anteriormente para la heparina.

#### *Sujetos destinados a tratamiento*

55 El sujeto destinado a tratamiento tendrá una enfermedad o trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno tal como se reivindica. Es decir, existirá ADN extracelular presente que tiene su origen en las células del organismo del sujeto. En particular, la enfermedad o trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno

caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

Normalmente el ADN estará presente en una de las soluciones o secreciones extracelulares del organismo. Así en realizaciones preferidas el ADN puede estar presente en el pulmón incluyendo sus vías respiratorias. Normalmente este ADN se originará en el núcleo y por ello será ADN genómico.

El ADN extracelular será normalmente de alto peso molecular. Así puede suceder que tenga, por ejemplo, un tamaño medio de fragmento, un intervalo de tamaño de fragmento o un tamaño de fragmento predominante en el intervalo de 100 bases a 1 megabase, preferentemente de 1 kb a 500 kb, más preferentemente de 5 kb a 250 kb de longitud, más preferentemente todavía de 25 kb a 100 kb y más preferentemente aún de 25 kb a 50 kb de longitud. En realizaciones de la invención en las que la dolencia destinada a tratamiento es un trastorno autoinmunitario tal como LES, el ADN puede ser de menor longitud o puede estar situado en los intervalos especificados anteriormente. Normalmente, el ADN estará total o parcialmente libre de histonas o comprenderá regiones que carezcan de histonas. Puede estar unido por factores catiónicos o factores con grupos catiónicos tales como mediadores inflamatorios y/o proteasas. Así por ejemplo puede formar complejos o asociarse con elastasa, catepsinas y/o IL-8.

La presencia del ADN incrementará normalmente la viscosidad de la solución o líquido en el que está presente. Así sucede, en particular, cuando el sujeto sufre un trastorno respiratorio en el que normalmente la presencia del ADN aumentará la viscosidad del moco u otras secreciones pulmonares. También puede suceder cuando el objeto está destinado a tratar o a ayudar a resolver un sitio inflamatorio y en particular un sitio inflamatorio confinado en el que existe presencia de ADN extracelular.

Normalmente, la presencia de ADN puede aumentar la viscosidad de la solución en la que está presente del 10 al 5000%, preferentemente del 50 al 2500%, más preferentemente del 100 al 1000%, más preferentemente todavía del 200 al 800% y más preferentemente aún del 400 al 600%. La viscosidad de la solución puede normalmente duplicarse, triplicarse, cuadruplicarse o incrementarse cinco veces o más en comparación con la viscosidad de la solución en ausencia de ADN. Normalmente la viscosidad del ADN será tal que puede comprender dicha función en el sujeto como, por ejemplo, la función pulmonar. Puede causar obstrucción al flujo aéreo y/o promover la aparición de infecciones.

En una realización de la invención el sujeto puede sufrir inflamación y en particular inflamación en la que exista ADN extracelular en el sitio inflamatorio. El sitio inflamatorio principal puede estar, en particular, confinado parcial o totalmente. El sitio puede contener o producir grandes cantidades de pus u otro material inflamatorio. Entre los ejemplos de dolencias se incluyen abscesos, meningitis, peritonitis, sinusitis, otitis, periodontitis, pericarditis, pancreatitis, colelitiasis, endocarditis y artritis séptica. El sujeto puede tener lesiones inflamatorias o infectadas tales como lesiones infectadas de la piel y/o las membranas mucosas, heridas quirúrgicas, lesiones ulcerosas y quemaduras. La presencia del ADN puede aumentar la viscosidad de soluciones en el sitio inflamatorio y ralentizar o evitar la resolución de la inflamación. También puede provocar dificultades mecánicas, así, por ejemplo, cuando el sitio inflamatorio confinado es una articulación, o está en una articulación, su funcionamiento puede verse comprometido. De este modo puede ser más difícil de flexionar o de manipular. El sujeto puede tener un trastorno autoinmunitario, por ejemplo uno caracterizado por la producción de una respuesta inmunitaria contra el ADN y en particular anticuerpos contra el ADN. En una realización preferida el sujeto puede tener, o estar en riesgo de desarrollar, lupus eritematoso sistémico (LES).

En una realización preferida en particular de la invención el sujeto sufrirá un trastorno respiratorio y en particular uno en el que la viscosidad del moco u otras secreciones pulmonares es elevada debido a la presencia de ADN. Un sujeto según se describe en la presente memoria descriptiva puede tener, por ejemplo, enfermedad pulmonar bronquial aguda o crónica, tal como neumonía infecciosa, bronquitis o traqueobronquitis, bronquiectasia, fibrosis quística, asma, tuberculosis y/o infecciones fúngicas. El sujeto puede tener una infección del aparato respiratorio. El sujeto puede tener sinusitis, congestión sinusal o infecciones víricas que infectan el sistema respiratorio tales como un resfriado o una gripe. En una realización preferida en particular de la invención el sujeto tendrá fibrosis quística. El sujeto puede tener neumonía.

Los trastornos destinados a tratamiento son como los que se describen en las reivindicaciones 1 a 21 e implicarán normalmente infiltración de células inflamatorias en el sitio inflamatorio y en particular en el sistema respiratorio. Estas células pueden ser macrófagos, granulocitos, linfocitos u otros glóbulos blancos. Pueden ser linfocitos T o linfocitos B. Los granulocitos pueden ser eosinófilos, basófilos o neutrófilos y en particular serán neutrófilos.

El número de células inflamatorias presentes en el sitio, y en particular neutrófilos, puede incrementarse

normalmente entre 1 y 10.000 veces, preferentemente, de 10 a 5000 veces, más preferentemente de 20 a 1000 veces, más preferentemente todavía de 50 a 500 veces y más preferentemente todavía de 100 a 200 veces. La proporción y el número de tipos de glóbulos blancos dados pueden determinarse mediante técnicas de tinción estándar bien conocidas en la técnica. Normalmente, muchas de las células inflamatorias infiltrantes experimentan necrosis o lisis para liberar ADN genómico en el moco de la persona. Así el número y/o la proporción de células necróticas pueden verse elevados normalmente de 10 a 5000 veces, más preferentemente de 50 a 2000 veces, más preferentemente todavía de 100 a 1000 veces y con la máxima preferencia de 200 a 600 veces. En particular las células infiltrantes necróticas responsables principalmente de la liberación de ADN genómico en el moco serán granulocitos y especialmente neutrófilos.

El ADN genómico de las células inflamatorias puede estar predominantemente en forma de largas cadenas de ADN genómico viscoso. La necrosis de estas células también puede acompañarse de la liberación de otras proteínas de las células inflamatorias tales como mediadores inflamatorios y proteínas antibacterianas tales como proteasas como neutrófilos elastasa y/o catepsinas. Además de ADN genómico en el moco pueden estar presentes también otros polímeros que contribuyen adicionalmente a su viscosidad. En muchos casos también pueden estar presentes polímeros de actina que contribuyen adicionalmente a la viscosidad.

Un factor que contribuye a la migración de las células inflamatorias en los pulmones puede ser la presencia de patógenos, irritantes, alérgenos o contaminantes en el pulmón. Por ejemplo, y en particular en la fibrosis quística, el sujeto puede tener infecciones tales como infecciones por *Pseudomonas*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Haemophilus* y/o *Aspergillus* y en particular puede mostrar infección por *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y/o *Burkholderia cepacia*. Estas infecciones pueden ser de larga duración, ocurrir periódicamente o ser nuevas. Pueden ser agudas o crónicas. En algunos casos el patógeno mostrará resistencia a los antibióticos debido a una exposición prolongada a los antibióticos durante el tratamiento.

Los sujetos pueden tener además, o alternativamente, antecedentes de exposición a contaminantes tales como el humo del tabaco o alérgenos tales como el polen que pueden contribuir al flujo de células inflamatorias en el pulmón. La presencia de patógenos, alérgenos y/o contaminantes puede promover también que las células infiltrantes experimenten necrosis en lugar de desecharse mediante procesos como la apoptosis en los que no se cree que se produzca liberación de ADN genómico en el pulmón en cantidades sustanciales.

El sujeto puede tener antecedentes de exposición a contaminantes y/o productos químicos y en particular en forma inhalable. En particular, el sujeto puede fumador de tabaco o exfumador de tabaco. Normalmente, el sujeto puede ser, o haber sido, un fumador empedernido, y haber fumado de 10 a 100, preferentemente de 20 a 60, más preferentemente de 25 a 50 y más preferentemente todavía de 30 a 40 cigarrillos al día. El sujeto haberlo hecho durante varios años como, por ejemplo, de 5 a 50, preferentemente de 10 a 40, más preferentemente de 15 a 30 y más preferentemente todavía de 20 a 25 años. La persona puede haber sido, o ser, fumadora de pipa o de puros. La persona puede haber mascado tabaco o productos que contienen tabaco. En algunos casos la persona puede haberse visto expuesta pasivamente al humo del tabaco en lugar de fumar tabaco ella misma. Así, el sujeto puede, por ejemplo, haber estado expuesto acumulativamente al humo de tabaco pasivo durante largos periodos debido a su trabajo, su ocio y/o su entorno doméstico. El sujeto puede consumir narcóticos inhalados como, por ejemplo, marihuana u otros narcóticos que normalmente se mezclan con tabaco antes de fumarlos.

El sujeto puede haber estado expuesto, de forma adicional o alternativa, a otros contaminantes químicos o ambientales. Así el sujeto puede trabajar, o haber trabajado, en un ambiente que lo expone a productos químicos y/o contaminantes. Así, por ejemplo, el sujeto puede ser obrero en una fábrica o minero, por ejemplo, en una mina de carbón. El sujeto puede trabajar en la industria de la construcción. El sujeto puede haber estado expuesto a altos niveles de contaminación, tales como emisiones de gases de escape de vehículos u otros motores. El sujeto puede haber estado expuesto al smog o a emisiones que contienen dióxido de azufre. El sujeto puede tener una predisposición genética a desarrollar un trastorno y en particular un trastorno respiratorio.

En una de las realizaciones preferidas de la invención el sujeto sufrirá una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En una realización de la invención el sujeto puede tener enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC es un estado de enfermedad caracterizado por la obstrucción al flujo aéreo que no es totalmente reversible. La obstrucción al flujo aéreo es normalmente progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anómala de los pulmones a partículas o gases nocivos. En particular, aunque no de forma exclusiva, la EPOC está asociada al tabaquismo.

La EPOC puede definirse como una dolencia en la que existe un descenso progresivo en la función pulmonar, con el

sujeto afectado teniendo un VEF<sub>1</sub> de menos del 80% del valor predicho para una persona de esa edad/raza y/o altura y/o que muestra una relación VEF<sub>1</sub>/CVF de menos del 70%. En una realización preferida especialmente, el sujeto destinado a tratamiento con EPOC tendrá un VEF<sub>1</sub> de menos del 75% del valor predicho. Normalmente la reducción del VEF<sub>1</sub> es sólo parcialmente reversible. En particular la reducción en el VEF<sub>1</sub> es sólo parcialmente reversible por tratamiento con broncodilatadores tales como, por ejemplo, agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos y en particular salbutamol.

El VEF<sub>1</sub> para una persona con EPOC puede ser del 10 al 80% del valor predicho. Normalmente, el VEF<sub>1</sub> del sujeto será del 10 al 75% del valor predicho. Preferentemente el sujeto puede tener un VEF<sub>1</sub> del 60 al 75% del valor predicho, más preferentemente de 40 a 60% del valor predicho y más preferentemente todavía un valor por debajo del 40% del valor predicho. El sujeto con EPOC puede tener un VEF<sub>1</sub> de menos del 70%, preferentemente menos del 60%, más preferentemente menos del 50% y más preferentemente todavía menos del 40% del valor predicho. El valor de VEF<sub>1</sub> para el sujeto se medirá normalmente con respecto a los valores predichos y se ajustará por edad/sexo/raza y/o altura. Los valores predichos pueden ser los tomados de Coates (ver más adelante). El valor esperado, con el que puede compararse el valor obtenido para el sujeto con EPOC, puede ser el valor medio esperado para fumadores, o no fumadores, o ambos grupos combinados, preferentemente el valor esperado será el de no fumadores que no padecen EPOC (Coates, ver más adelante).

La reducción del VEF<sub>1</sub> en el sujeto con EPOC será sólo parcialmente reversible y en particular será sólo parcialmente reversible con la administración de un broncodilatador. Así, por ejemplo, un aumento en el VEF<sub>1</sub> con respecto al valor basal para el sujeto (es decir, el de antes de la administración del broncodilatador) de más el 15%, preferentemente más del 20% y más preferentemente todavía más del 25% se considerará reversibilidad. El aumento puede comenzar de 5 a 30, preferentemente de 10 a 25, más preferentemente durante un periodo de 15 a 20 minutos después de la administración del broncodilatador. Preferentemente los aumentos comenzarán a partir de 15 minutos después de la administración del broncodilatador. Los aumentos persisten normalmente de 3 a 6 horas, preferentemente de 4 a 5 horas y más preferentemente 4 horas. Normalmente el broncodilatador usado en la valoración de la reversibilidad será un agonista β<sub>2</sub>-adrenérgico tal como salbutamol o ipratropio. La reducción en el VEF<sub>1</sub> puede ser totalmente, o casi totalmente, refractaria al tratamiento con broncodilatadores.

El sujeto con EPOC puede mostrar también aumentos mínimos similares en el VEF<sub>1</sub> con fármacos esteroideos tales como Becotide™ o Prednisolona™ aunque normalmente la respuesta a dichos agentes no se usará para definir la reversibilidad. Los aumentos tendrán lugar también durante un periodo de tiempo más largo, por ejemplo, después de 2 a 3 días y, si los fármacos esteroideos son administrados continuamente, persisten. Si se interrumpen los esteroides la mejoría puede persistir de 12 a 48 horas, o durante días, semanas o incluso meses, por ejemplo de seis horas a seis semanas, preferentemente de 1 día a 3 semanas.

Las pruebas para valorar la reversibilidad de la reducción de VEF<sub>1</sub> se realizarán normalmente cuando el sujeto esté clínicamente estable y libre de infección. El sujeto no debería haber tomado, ni se le deberían haber administrado, broncodilatadores inhalados de acción a corto plazo en las seis horas previas, β-agonistas de acción prolongada en las 12 horas previas o teofilinas de liberación sostenida en las 24 horas previas.

En el diagnóstico de EPOC normalmente deberían medirse los valores espirométricos antes y después de suministrar una dosis adecuada de broncodilatador inhalado al sujeto. La dosis debería seleccionarse preferentemente para que tuviera un valor elevado en la curva de dosis/respuesta y por lo común se suministrará mediante nebulizador para asegurarse de que se ha inhalado. Puede suministrarse una dosis similar con múltiples inhalaciones mediante un inhalador dosificador y un separador de grandes volúmenes, aunque esta forma es menos preferida. Un protocolo característico de dosificación/medidas para un sujeto humano sería:

- Antes y 15 minutos después de 2,5 a 5 mg de salbutamol nebulizado o de 5 a 10 mg de terbutalina;
- Antes y 30 minutos después de 500 μg de bromuro de ipratropio nebulizado; o
- Antes y 30 minutos después de ambos en combinación.

Para sujetos no humanos pueden usarse protocolos equivalentes.

En el diagnóstico de EPOC también puede medirse la CVF del sujeto. En el diagnóstico de EPOC puede usarse la relación entre VEF<sub>1</sub> y CVF. Los sujetos destinados a que tengan EPOC presentarán normalmente un valor VEF<sub>1</sub>/CVF de menos del 70%. La relación entre VEF<sub>1</sub>/CVF puede ser inferior al 65%, preferentemente inferior al

60%, más preferentemente inferior al 55% y más preferentemente todavía inferior al 55%. Un sujeto descrito en la presente memoria descriptiva puede tener un valor de VEF<sub>1</sub>/CVF inferior al 70% y tener también un valor de VEF<sub>1</sub> valor del 80% o menos del valor predicho.

5 La CVF (capacidad vital forzada) corresponde al volumen máximo de aire exhalado de manera forzada desde el punto de máxima inhalación y puede medirse usando espirometría estándar. En particular, los valores especificados anteriormente para VEF<sub>1</sub>/CVF serán los correspondientes a después de la administración de un broncodilatador tal como se expone anteriormente. La reducción en VEF<sub>1</sub>/CVF mostrará normalmente la misma ausencia de reversibilidad que el VEF<sub>1</sub> en sujetos con EPOC.

10

La valoración espirométrica es el procedimiento más preferido para diagnosticar EPOC y con ello el procedimiento para identificar a los sujetos que pueden ser tratados. En consecuencia, en una realización preferida de la invención la valoración espirométrica se usará en el diagnóstico de un sujeto que tiene EPOC y por tanto puede ser tratado mediante la invención. Además, también pueden valorarse los síntomas mostrados por el sujeto para ayudar a

15 confirmar un diagnóstico de EPOC. Normalmente el diagnóstico implicará valoración espirométrica en combinación con la valoración de los síntomas de un sujeto así como la determinación de si el sujeto tiene antecedentes de exposición a factores de riesgo. En algunas situaciones la valoración espirométrica puede no ser posible, en particular en situaciones en las que los recursos son limitados, y la EPOC se diagnosticará por medios alternativos tales como investigación de los síntomas de EPOC enumerados en la presente memoria descriptiva y antecedentes de exposición a factores de riesgo de EPOC. Aunque normalmente las radiografías de tórax no son indicativas de si un sujeto tiene o no EPOC, pueden usarse para diagnosticar otros trastornos respiratorios, como la TB, y con ello descartar EPOC.

25 El sujeto con EPOC mostrará, o habrá mostrado previamente, una tasa acelerada de descenso de la función pulmonar en comparación con la media esperada para una persona equivalente que no padece EPOC y en particular para una persona equivalente no fumadora. El sujeto puede mostrar disnea y sobre todo después de una actividad física como, por ejemplo, ejercicio. Normalmente, este problema no se inducirá por exposición a un alérgeno. El sujeto puede mostrar también una mayor incidencia de infección bacteriana o vírica lo cual puede agravar la dolencia.

30

La persona con EPOC puede mostrar una tasa de disminución en el VEF<sub>1</sub> de una, dos, tres, cuatro o más veces superior al valor medio anual esperado para una persona equivalente que no padece EPOC. Por ejemplo un sujeto de más de treinta años puede mostrar una reducción anual de 50 a 100, preferentemente de 50 a 80 y más preferentemente de 60 a 70 ml de VEF<sub>1</sub>/año en comparación con una reducción de 10 a 40 y normalmente de 20 a 40 ml de VEF<sub>1</sub>/año en el no fumador equivalente. Estos valores pueden aplicarse también a pacientes de EPOC no fumadores como aquéllos en los que el trastorno está provocado por contaminantes.

35

Los sujetos con EPOC pueden mostrar uno o más, y a veces todos, los síntomas de tos, aumento de la producción de esputo, disnea, y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo para la enfermedad. En el caso de tos, aumento del esputo y disnea estos síntomas pueden haber estado presentes durante periodos de tiempo extendidos tales como al menos un mes, preferentemente seis meses, más preferentemente al menos un año y más preferentemente todavía durante al menos dos años. La tos y la producción de esputo crónicas preceden a menudo al desarrollo de EPOC y pueden ser indicativas de personas para las cuales es posible usar la invención de forma profiláctica para prevenir el desarrollo de EPOC.

45

Los sujetos con EPOC pueden tener antecedentes de exposición a contaminantes, entre ellos cualquiera de los mencionados en la presente memoria descriptiva y en cualquiera de los niveles especificados en la presente memoria descriptiva. En particular, el sujeto con EPOC tendrá antecedentes de exposición a tabaco y/o contaminantes industriales.

50

El sujeto con EPOC será normalmente un adulto de edad madura. Por ejemplo, el sujeto puede tener de 21 a 85, preferentemente de 25 a 70, más preferentemente de 30 a 60 y más preferentemente todavía de 40 a 50 años de edad. El inicio de cualquiera de los síntomas mencionados en la presente memoria descriptiva en asociación con EPOC, se habrá producido normalmente en la edad adulta. Por ejemplo, el sujeto podría haber tenido al menos 20, más preferentemente al menos 25, más preferentemente todavía al menos 30 y más preferentemente todavía al menos 35 años de edad antes de haber sufrido un síntoma en particular. Especialmente, los síntomas asociados con fases más avanzadas de EPOC, tales como cualquiera de las mencionadas en la presente memoria descriptiva, puede tener su inicio en estas fases tardías de la vida. Los sujetos con una predisposición genética a desarrollar EPOC, tales como los que presentan deficiencia de la  $\alpha_1$ -antitripsina, pueden desarrollar EPOC antes. Por ejemplo,

55

5 pueden mostrar uno o más síntomas, o un síntoma en particular, entre 10 y 21, preferentemente entre 12 y 18, o más preferentemente entre 14 y 16 años de edad. Alternativamente, pueden mostrar primero el síntoma en cualquiera de los intervalos de edad mencionados en la presente memoria descriptiva. El sujeto puede haberse diagnosticado en cualquiera de las edades, o dentro de cualquiera de los intervalos de edad, especificados en la presente memoria descriptiva. Estos intervalos también pueden aplicarse a cualquier trastorno que el sujeto pueda tener y en particular los mencionados en la presente memoria descriptiva.

10 El sujeto puede tener una predisposición genética a desarrollar EPOC y puede mostrar antecedentes familiares de la dolencia. Por ejemplo, el sujeto puede tener deficiencia de la  $\alpha_1$ -antitripsina y estar por tanto predispuesto a desarrollar EPOC. Los sujetos en riesgo de desarrollar EPOC pueden haber tenido bajos pesos al nacer y/o antecedentes de exposición a contaminantes en el útero o en la primera etapa de su vida. La madre del sujeto puede ser fumadora y puede haber estado fumando durante el embarazo. El sujeto puede haber tenido antecedentes de una grave infección respiratoria en la infancia. Una reducción máxima en la función pulmonar alcanzada, medida por espirometría, puede identificar a aquellas personas que tienen un riesgo mayor de desarrollar EPOC.

20 El sujeto puede presentar una fase temprana de EPOC en la que los síntomas son generalmente moderados y puede mostrar periodos de normalidad o de al menos reducción de los síntomas. Alternativamente, el sujeto puede presentar una fase más desarrollada de EPOC en la que los síntomas, y en particular la reducción en  $VEF_1$ , son más acusados. Preferentemente, los procedimientos y medicamentos de la invención se usan, o se administran, en una fase temprana de EPOC de manera que pueden interrumpir, ralentizar o hacer retroceder el aumento en la tasa de descenso del  $VEF_1$  en la fase más temprana posible.

25 La EPOC es normalmente un trastorno progresivo en el que la gravedad de la EPOC y la magnitud de su influencia en el paciente aumentan con el tiempo. Así puede existir una manifestación progresiva de los síntomas del trastorno. Por lo común, la tos crónica es el primer síntoma que se desarrolla. Inicialmente puede ser intermitente, aunque más adelante puede estar presente todos los días. Normalmente, la tos estará presente durante todo el día, no sólo por la noche y por la mañana. En algunos casos, puede desarrollarse una obstrucción importante al flujo aéreo sin la presencia de tos. Por lo común, después de los accesos de tos se producen pequeñas cantidades de esputo persistente.

35 Conforme la EPOC avanza el sujeto puede experimentar disnea. El inicio de la disnea será a menudo uno de los motivos por los que un sujeto humano acudirá a consulta médica, ya que puede ser discapacitante e inducir asimismo ansiedad. A medida que se deteriora la función pulmonar del sujeto, la dificultad respiratoria se hace más intrusiva. El sujeto puede presentar sibilancias y opresión torácica. La disnea puede empeorar durante o después del ejercicio. Las infecciones respiratorias también pueden agravar la dolencia y provocar un empeoramiento de la disnea. Los sujetos humanos pueden referir que la disnea degrada progresivamente su capacidad de llevar a cabo actividades físicas y de hacer ejercicio.

40 Los pacientes de EPOC a veces se dividen en distintas categorías que reflejan la fase y la gravedad de la enfermedad. Esta clasificación puede ayudar a definir las necesidades de un sujeto en particular y el curso del tratamiento que debe administrársele. En una clasificación (GOLD Executive Summary, ver anteriormente) los sujetos se clasifican en las siguientes categorías:

45 Categoría 0 - En riesgo

La función pulmonar, medida por espirometría, es normal.

Síntomas crónicos (tos, esputo, producción).

50

Normalmente, los sujetos humanos no serán conscientes de alteraciones en la función pulmonar.

Categoría I: EPOC leve

55 Obstrucción leve al flujo aéreo.

$VEF_1/CVF < 70\%$

$VEF_1$  superior o igual al 80% del valor predicho.

Con o sin síntomas crónicos (tos, esputo, producción).

Los sujetos humanos pueden no ser conscientes de que existen alteraciones en su función pulmonar.

5

Categoría II: EPOC moderada

Empeoramiento de la obstrucción del flujo aéreo.

10

$$VEF_1/CVF < 70\%$$

VEF<sub>1</sub> del 30 al 80% del valor predicho (la categoría puede subdividirse en: IIA - VEF<sub>1</sub> del 50 al 80% del valor predicho; y IIB - VEF<sub>1</sub> del 30 al 50% del valor predicho). Con, o sin, síntomas crónicos (tos, esputo, producción, disnea). Normalmente, los síntomas pueden hacerse más pronunciados con el ejercicio. Es probable que los sujetos humanos sean conscientes de la dolencia y hayan solicitado ayuda médica.

15

Categoría III: EPOC grave

Obstrucción grave del flujo aéreo.

20

$$VEF_1/CVF < 70\%$$

Un VEF<sub>1</sub> inferior al 30% del valor predicho o alternativamente un VEF<sub>1</sub> inferior al 50% del valor predicho en conjunción con insuficiencia respiratoria o signos clínicos de insuficiencia cardiaca derecha (insuficiencia respiratoria: presión arterial parcial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) inferior a 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin presión arterial parcial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) superior a 6,7 kPa (50 mmHg) con respiración de aire al nivel del mar.

25

El sujeto destinado a tratamiento que usa la invención afectado por EPOC puede clasificarse en cualquiera de las categorías anteriores. En particular, el sujeto puede ser correspondiente a las categorías I a III, preferentemente a las categorías II a III, y más preferentemente todavía a la categoría III. La invención comprende también el tratamiento de personas en riesgo de EPOC (categoría 0) y con una fase temprana del trastorno (categoría I).

30

Algunos de los síntomas de EPOC son presentados por personas que sufren otras enfermedades. Por ejemplo, un conjunto de trastornos respiratorios distintos a EPOC comprometen la función pulmonar. Sin embargo, estas enfermedades pueden diferenciarse de la EPOC mediante una valoración completa del sujeto y preferentemente aplicando las guías disponibles pertinentes para el diagnóstico de EPOC. La British Thoracic Society ha publicado un conjunto de Directrices (Thorax 1997, 52 (Supl. 5): S1-28) y en una realización preferida un sujeto destinado a tratamiento se encuadrará dentro de la definición del trastorno proporcionada por estas Directrices. Además, la Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) ha publicado un Resumen ejecutivo (2001) que define una estrategia para el diagnóstico, tratamiento y prevención del trastorno. Los sujetos destinados a tratamiento que padecen EPOC se encuadrarán dentro de la definición del trastorno proporcionada por el Resumen ejecutivo.

35

40

La EPOC no incluye la fibrosis quística (FQ), aunque la invención puede usarse para tratar tanto la EPOC como la FQ. Normalmente un sujeto con EPOC tendrá al menos una copia funcional del gen CFTR (salvo que tenga la desgracia de haber desarrollado FQ y EPOC). La EPOC tiene normalmente un inicio mucho más tardío que la fibrosis quística, en la que el paciente nace con el defecto. En caso de EPOC el descenso de la función pulmonar y el inicio de los síntomas se producirán progresivamente con el tiempo. En la FQ el descenso de la función pulmonar tendrá un inicio más inmediato, más temprano en la vida. Un sujeto que padece EPOC a menudo tendrá más de treinta, más de cuarenta o incluso más de cincuenta años cuando sea consciente de que padece el trastorno. La principal excepción al inicio tardío de EPOC se produce en aquellos pacientes que presentan deficiencia de la  $\alpha_1$ -antitripsina. Dichos sujetos presentarán un inicio precoz de la EPOC, por ejemplo, con un diagnóstico de la EPOC después de los diez o de los veinte años, ya que habrán nacido con un trastorno genético que los predispone a sufrir EPOC. Los sujetos que presenten deficiencia de la  $\alpha_1$ -antitripsina y FQ pueden distinguirse fácilmente unos de otros mediante pruebas bioquímicas y genéticas dirigidas a identificar la naturaleza del trastorno.

50

55

El sujeto destinado a tratamiento será un animal vertebrado y preferentemente será un mamífero. Normalmente el sujeto será humano. Sin embargo, la invención también comprende el tratamiento de animales con dolencias que son iguales, o equivalentes, a cualquiera de las dolencias humanas mencionadas en la presente memoria descriptiva. Así la dolencia animal puede tener una patología subyacente similar, o igual, a la de la dolencia humana.

El animal puede tener uno o más síntomas o características similares a la dolencia humana y en particular uno o más de los síntomas enumerados anteriormente. Preferentemente, el animal padecerá una dolencia que se sitúe dentro de la definición de cualquiera de estas dolencias enumeradas anteriormente.

- 5 En los casos en que el sujeto no es humano puede ser un animal doméstico o un animal con importancia agrícola. El animal puede ser, por ejemplo, una oveja, un cerdo, una vaca, un toro, un ave de corral u otro animal criado con fines comerciales. En particular el animal puede ser una vaca o un toro y preferentemente es una vaca lechera. El animal puede ser un animal de compañía tal como un perro, un gato, un pájaro o un roedor. El animal puede ser un gato u otro animal felino. El animal puede ser un mono como, por ejemplo, un primate no humano. Por ejemplo, el
- 10 primate puede ser un chimpancé, un gorila o un orangután. El animal puede ser un caballo y, por ejemplo, puede ser un caballo de carreras. El animal puede ser un animal que intervenga en actos deportivos como, por ejemplo, un galgo.

*Valoración del sujeto*

- 15 La presente invención proporciona medicamentos, y preparaciones para la hidrólisis de ADN con vistas a su uso en el tratamiento de dolencias causadas, o caracterizadas, por la presencia de ADN endógeno extracelular tal como se define en las reivindicaciones 1 a 21. Una de las formas preferidas de evaluar la eficacia de las diversas realizaciones de la invención consiste en determinar la cantidad de ADN presente después del tratamiento.
- 20 Preferentemente, el cambio en la cantidad de ADN y en el intervalo de tamaños de los fragmentos de ADN se determinará normalmente después de la administración de los medicamentos de la invención en comparación con la situación antes de su administración. Puede usarse cualquiera de los procedimientos para medir la cantidad y el tamaño de fragmento, de ADN que se exponen en la presente memoria descriptiva. El intervalo de tamaños de fragmentos de ADN puede determinarse por electroforesis en gel u otras técnicas de separación basadas en la
- 25 separación de ADN por tamaño.

- Puede determinarse la viscosidad de la solución presente en el ADN, y en particular la viscosidad del moco. De nuevo, la situación se compara preferentemente antes y después del tratamiento. Para medir la viscosidad puede usarse cualquiera de las técnicas expuestas en la presente memoria descriptiva como, por ejemplo, técnicas como
- 30 ensayos de compactación y ensayos que usan péndulos de torsión o cualquier otro procedimiento reológico adecuado.

- Los medicamentos descritos en la presente memoria descriptiva pueden reducir la viscosidad de la solución que contiene ADN del 0 al 100%, preferentemente del 20 al 100%, más preferentemente del 50 al 100% y más
- 35 preferentemente todavía del 75 al 100% con respecto a antes de la administración del medicamento. Preferentemente, la longitud media del fragmento de ADN presente o el tamaño de fragmento predominante se reducirá de 1 a 1000 veces, más preferentemente de 5 a 500 veces, más preferentemente de 10 a 100 veces y más preferentemente todavía de 20 a 50 veces. El tamaño medio de fragmento de ADN, o el tamaño de fragmento predominante, puede estar comprendido normalmente entre 50 pb y 10 pb, preferentemente entre 100 pb y 2.500
- 40 pb, más preferentemente entre 250 pb y 1.000 pb y más preferentemente todavía entre 400 pb y 600 pb después del tratamiento. El tratamiento puede producir un desplazamiento visible hacia fragmentos de ADN de menor peso molecular según se visualiza, por ejemplo, por electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio y en particular puede reducir la proporción de especies de ADN en el gel por encima de 2 kb, preferentemente por encima de 5 kb, más preferentemente por encima de 10 kb y más preferentemente todavía por encima de 20 kb en el gel.

- 45 Los cambios mencionados anteriormente y más adelante pueden observarse en un plazo de horas o días después de la administración, por ejemplo de una hora a siete días, preferentemente de dos horas a dos días y más preferentemente de cuatro horas a 24 horas después de la administración.

- 50 Los ensayos para valorar la viscosidad y el ADN pueden realizarse también en muestras tomadas del sujeto para valorar las concentraciones óptimas de ADNasa I y glucosaminoglucano y otros diversos factores que se usarán. Así mediante la realización de experimentos *in vitro* en muestras como, por ejemplo, esputo para determinar cómo hidrolizar de forma óptima el ADN, puede adaptarse el medicamento que se administrará al sujeto a sus necesidades. Es posible hacerlo de manera que en momentos de especial gravedad del trastorno o de
- 55 circunstancias determinadas sea posible ajustar el régimen de tratamiento de la forma apropiada.

La administración de los medicamentos puede producir normalmente una mejoría en el estado del sujeto. Por ejemplo, en el caso de trastornos respiratorios la administración puede producir una reducción de la obstrucción respiratoria, el taponamiento con mucosidades, la formación de espumas y/o el burbujeo. El sujeto puede presentar

un aumento en el VEF<sub>1</sub> que recupera un valor más cercano al predicho para un sujeto equivalente que no padece trastorno respiratorio.

5 En algunos casos, en el tratamiento el sujeto mostrará una mejora del VEF<sub>1</sub> de manera que el VEF<sub>1</sub> aumenta del 25 al 100%, preferentemente del 40 al 100%, más preferentemente del 60 al 100% y más preferentemente todavía del 80 al 100% del valor predicho. La mejora también puede ser mejor, por ejemplo del 5 al 10%, preferentemente del 15 al 25%, o más preferentemente del 20 al 25%. Esto puede acompañarse por la experiencia del sujeto de una mayor facilidad para respirar, una promoción de la expulsión del moco y una reducción de la tos. El sujeto puede mostrar una mayor capacidad de realizar ejercicio y actividad física.

10 El efecto mucolítico de la ADNasa I puede reducir también la incidencia de infecciones respiratorias, en particular cuando el sujeto tiene fibrosis quística o neumonía. Así el sujeto puede mostrar una disminución en infecciones con patógenos como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Haemophilus* y/o *Aspergillus*. En particular, el paciente puede mostrar una menor incidencia de infección por *Haemophilus influenza*,  
15 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y/o *Burkholderia cepacia*. Aquellos sujetos en los que dichas infecciones sean crónicas pueden dejar de estar infectados o presentar una disminución en la carga de patógenos después del tratamiento. La carga patogénica y la naturaleza de los patógenos pueden valorarse usando diversas técnicas microbiológicas bien conocidas en la técnica tales como tinción, cultivo y siembra en placa

20 En aquellos casos en que el sujeto padezca una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de anticuerpos reactivos contra el ADN la eficacia de la invención puede valorarse mediante vigilancia de la disminución de la respuesta inmunitaria frente al ADN en el sujeto. Así normalmente se medirán los títulos de anticuerpos contra el ADN presente en la sangre, ya que pueden revelar la afinidad de los anticuerpos presentes. La valoración de los anticuerpos o de su afinidad puede reducirse, por ejemplo, en un factor de dos, cuatro, cinco, diez, veinte, cincuenta  
25 o más veces. Puede reducirse en más del 20%, preferentemente más del 40%, más preferentemente más del 60% y más preferentemente todavía en más del 90%. La valoración de los títulos de anticuerpos y la afinidad puede realizarse mediante técnicas estándar tales como ensayos ELISA. Es posible vigilar la gravedad del trastorno en el paciente.

30 Normalmente, los medicamentos de la invención tratarán el trastorno en cuestión. Pueden aliviar su gravedad y/o eliminar o reducir los síntomas asociados con el trastorno. En particular reducirán o eliminarán las características del trastorno asociadas con la presencia de ADN extracelular. Así en trastornos respiratorios tales como fibrosis quística tendrán un efecto mucolítico para reducir la viscosidad del moco. De este modo se ayudará a la limpieza de la acumulación de mucosidad y puede incrementarse la expectoración de mucosidad. Puede existir una mejora en la  
35 función pulmonar y una reducción en la incidencia, o gravedad, de la infección. El sujeto puede tener una mayor sensación de bienestar. En algunos casos en tratamiento el sujeto presentará una mejora del VEF<sub>1</sub> de manera que el VEF<sub>1</sub> es del 25 al 100%, preferentemente del 40 al 100%, más preferentemente del 60 al 100% y más preferentemente todavía del 80 al 100% del valor predicho.

40 El VEF<sub>1</sub> se define como el volumen forzado máximo que puede espirarse en un segundo a partir de la inspiración máxima (European Resp. Journal, 1993; 6: Supl. 16 y Coates, Lung Function: Assessment and Applications In Medicine, 4ª edición, Oxford, Blackwell, 1969). Puede medirse mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica, por ejemplo, por espirometría.

45 Los medicamentos pueden aumentar la esperanza de vida, por ejemplo, de 1 a 2 años, preferentemente de 2 a 4 años y más preferentemente todavía más de 4 años.

#### Productos

50 La presente invención también proporciona productos que comprenden un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, teniendo el glucosaminoglucano o la sal del mismo un peso molecular medio de 8 a 40 kD, y una ADNasa I para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el sujeto destinado a tratamiento, donde el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I y donde los productos están destinados a administrarse de una forma  
55 simultánea, separada o en secuencia, en el que el trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

Estos productos pueden estar normalmente en forma sólida o líquida. Pueden estar en forma de un polvo. Pueden estar liofilizados o congelados. Pueden comprender también otros componentes como agua o un tampón. El producto puede adoptar la forma de una solución acuosa que comprende ADNasa I y glucosaminoglucano o una sal del mismo. El producto puede comprender también agentes estabilizantes o conservantes. Puede comprender 5 agentes que permiten que el producto se congele sin perder actividad enzimática tales como glicerol. Los productos pueden formarse, por ejemplo, mezclando polvos de glucosaminoglucano y ADNasa.

*Administración y composiciones farmacéuticas*

10 El glucosaminoglucano o la sal fisiológicamente aceptable pueden administrarse de forma simultánea, por separado o en secuencia con la ADNasa I. Así los dos pueden ser administrados en el mismo medicamento o como dos medicamentos separados y pueden suministrarse al mismo tiempo, uno después del otro o de forma independiente. En realizaciones en las que los dos están destinados a administrarse por separado, preferentemente el glucosaminoglucano, o la sal se administrará antes, o al mismo tiempo, que la ADNasa I.

15 Normalmente, el glucosaminoglucano y la ADNasa I pueden ser administrados con una separación de una semana a un minuto, preferentemente con separación de dos días a una hora, más preferentemente todavía con separación de 24 horas a 2 horas y más preferentemente todavía con separación de 12 a 4 horas. Los dos pueden administrarse con separación de un minuto a una hora, preferentemente con separación de 10 minutos a 30 minutos y más

20 preferentemente todavía con separación de 15 a 25 minutos. Los dos pueden administrarse con separación de un minuto a diez minutos, preferentemente con separación de dos minutos a ocho minutos y más preferentemente con separación de cuatro a seis minutos. En algunos casos pueden administrarse de forma sucesiva, uno inmediatamente después del otro.

25 Los dos pueden ser administrados por la misma vía o por vías diferentes, preferentemente los dos se administrarán por la misma vía ya sea como medicamentos separados o en el mismo medicamento. El glucosaminoglucano o la sal y la ADNasa I pueden proporcionarse en dos composiciones separadas, aunque, por ejemplo, pueden mezclarse antes de la adición a un dispositivo de suministro o en el dispositivo de suministro. El dispositivo de suministro puede tener medios para regular la cantidad de cada uno de los suministrados al sujeto. Puede tener medios para mezclar

30 los dos o suministrar cada uno por separado.

Los medicamentos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden prepararse formulando los agentes activos, es decir, el glucosaminoglucano o la sal y/o la ADNasa I, con un vehículo y/o excipiente estándar farmacéuticamente aceptable como es habitual en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de la formulación

35 dependerá de varios factores, entre ellos el glucosaminoglucano, sal o ADNasa I empleado en particular y la vía de administración deseada. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, EE.UU., se describen de forma extensa dos tipos adecuados de formulación. Normalmente, la dosis necesaria que se administrará estará determinada por un médico, aunque para el glucosaminoglucano, o sal del mismo, será, por ejemplo, de 0,01 mg a 5 g, preferentemente de 0,1 mg a 2,5 g, más preferentemente de 1 mg a 1

40 g, más preferentemente todavía de 10 mg a 500 mg, más preferentemente todavía de 50 mg a 250 mg y más preferentemente todavía de 100 mg a 200 mg. Normalmente, estas dosis se suministrarán una vez, dos veces o tres veces al día y preferentemente se suministrarán una vez o dos veces al día y más preferentemente se suministrarán dos veces al día.

45 Si el glucosaminoglucano es heparina o una sal fisiológicamente aceptable de la misma la dosificación administrada puede estar normalmente en el intervalo de 10 a 10.000 unidades/kg de peso corporal, preferentemente de 100 a 10.000 unidades/kg de peso corporal, más preferentemente de 200 a 5.000 unidades/kg de peso corporal, más preferentemente todavía de 500 a 2.000 unidades/kg, y más preferentemente aún de 1.000 a 1.500 unidades/kg.

50 Normalmente las dosis de ADNasa I serán tales que la concentración de ADNasa I alcanzada en el sitio diana es de 100 a 0,001 µg/ml, preferentemente de 50 a 0,1 µg/ml, más preferentemente todavía de 25 a 0,5 µg/ml, más preferentemente aún de 10 a 1 µg/ml. La concentración alcanzada en el sitio diana puede ser de 8 a 2 µg/ml y preferentemente de 4 a 2 µg/ml. Normalmente, estas dosis se suministrarán una vez, dos veces o tres veces al día y preferentemente se suministrarán dos veces al día.

55 Normalmente, la duración del tratamiento puede ser de un día, una semana, dos semanas, un mes, seis meses, un año o más. En muchos casos el sujeto tomará los medicamentos de la invención permanentemente o durante periodos prolongados. Así puede suceder sobre todo cuando el sujeto tiene un defecto genético, por ejemplo cuando el sujeto tiene fibrosis quística, y padece, por tanto, permanentemente la dolencia. También puede suceder cuando

uno de los factores causales en el trastorno es algo a lo que el sujeto está expuesto de manera continuada y que no puede evitar, o bien no desea reducir su exposición al mínimo. El sujeto puede ser fumador de tabaco, pero no querer dejar de fumar.

- 5 En casos en los que el trastorno es más breve, o aparece periódicamente, la duración de la administración puede ser más corta y puede estar ligada a la duración del trastorno. Así, por ejemplo, cuando la dolencia es un absceso u otra situación inflamatoria como, por ejemplo, la afectación de un sitio inflamatorio confinado, una vez que se ha resuelto la inflamación puede interrumpirse o reducirse la administración del medicamento. El plan de administración puede coordinarse de manera que se administren niveles mayores de los medicamentos, el comienzo de la
- 10 administración se inicie en momentos en los que se haya incrementado la gravedad del trastorno. Así en trastornos respiratorios como, por ejemplo, fibrosis quística o neumonía, puede suceder lo anterior cuando el sujeto muestra un aumento en la obstrucción, infección y/o inflamación de las vías respiratorias. El medicamento también puede suministrarse antes del ejercicio u otra actividad física.
- 15 En casos en los que el trastorno afecta a un sitio inflamatorio específico el medicamento puede administrarse directamente en el sitio inflamatorio o en la región del sitio. Así los medicamentos pueden inyectarse, por ejemplo, en el sitio, aplicarse en forma de crema o en el brazo, etc. El medicamento puede ser administrado mediante un implante. Así en la presente memoria descriptiva se describe un implante que comprende un medicamento de la invención. Normalmente, en trastornos autoinmunitarios los medicamentos pueden administrarse de forma sistémica,
- 20 por ejemplo, por inyección intravenosa. Esto puede darse, en particular, en el caso de LES.

Preferentemente los medicamentos de la invención pueden administrarse por inhalación y/o por vía intranasal. Así pueden suministrarse por la nariz y/o por la boca. Los procedimientos adecuados para formular y preparar medicamentos que se administrarán por inhalación, instilación y por vía intranasal son bien conocidos en la técnica.

- 25 Los medicamentos también pueden administrarse por instilación. En una realización preferida, los medicamentos de la invención son adecuados para su administración por inhalación. En tratamiento por inhalación el medicamento puede estar en forma de solución útil para la administración por aerosol líquido, inhaladores dosificadores, o en una forma adecuada para un inhalador de polvo seco. El medicamento puede estar presente en forma de blíster o de un comprimido fraccionable.
- 30 En algunos casos los medicamentos pueden ser administrados por instilación. En estos casos, normalmente el medicamento estará en forma líquida y se administrará por una vía artificial como, por ejemplo, una cánula endotraqueal. Normalmente, el líquido será extraído en una jeringa y después expulsado a través de la vía artificial al interior del aparato respiratorio del sujeto. En un contexto de urgencias a menudo se usa una instilación. En
- 35 muchos casos puede usarse cuando el sujeto presenta una forma relativamente avanzada de EPOC y ha sido ingresado en el hospital. Normalmente se instilarán volúmenes tales como de 1 a 20 ml, preferentemente de 2 a 10 ml, y más preferentemente todavía de 3 a 6 ml. Para suministrar los medicamentos de la invención puede usarse cualquier procedimiento para su administración en el tracto pulmonar.
- 40 En aquellos casos en los que el medicamento se administrará por la nariz puede hacerse, por ejemplo, en forma de spray nasal. El spray puede administrarse, por ejemplo, usando un atomizador o nebulizador. En algunos casos el medicamento puede estar en forma de gotas nasales. Estas gotas pueden administrarse usando un cuentagotas medicinal. Para una exposición más extensa de las formas de dosificación nasal véase Remington's Pharmaceutical Sciences (más arriba). Los medicamentos administrados por la nariz pueden incluir agentes de ajuste del pH,
- 45 agentes emulsionantes o dispersantes, conservantes, tensioactivos, agentes de gelificación o agentes de tamponamiento al igual que los otros medicamentos de la invención. Con la máxima preferencia la forma de dosificación nasal será isotónica con las secreciones nasales.

- Los medicamentos descritos en la presente memoria descriptiva pueden formularse como aerosoles. La formulación
- 50 de aerosoles farmacéuticos es rutinaria para los expertos en la materia, véase por ejemplo, Sciarra, J. en Remington's Pharmaceutical Sciences (más arriba). Los agentes pueden formularse como aerosoles en solución, aerosoles de polvos secos en dispersión o suspensión, emulsiones o preparaciones semisólidas. El aerosol puede suministrarse usando cualquier sistema propelente conocido para los expertos en la materia. Los aerosoles pueden aplicarse en el aparato respiratorio superior, por ejemplo por inhalación nasal, o en el aparato respiratorio inferior o
- 55 en ambos. El glucosaminoglucano, sal o ADNasa puede suministrarse usando procedimientos de suministro de liposomas y nanopartículas. Los liposomas, en particular los liposomas catiónicos, pueden usarse en formulaciones de vehículos.

Los medicamentos para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden incluir, además de ingrediente activo,

un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia. En particular pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración. Se describen vehículos farmacéuticos en 5 Remington's Pharmaceutical Sciences (más arriba).

Los medicamentos y composiciones de la invención pueden, por ejemplo, ser neutralizados de tal forma que, si incluyen una ADNasa I, tendrán un pH similar o idéntico al pH óptimo de la ADNasa I que se está empleando en particular. Por ejemplo, el pH empleado puede estar en 2, preferentemente 1, más preferentemente 0,5, más 10 preferentemente todavía 0,2 y más preferentemente aún 0,1 unidades de pH con respecto al pH óptimo de la enzima que se emplea. En algunos casos, una ADNasa I puede estar activa en un amplio intervalo de pH y el pH elegido será el más cercano al pH fisiológico, o al menos la enzima estará activa al menos parcialmente a un pH fisiológico y por consiguiente puede ser neutralizado a pH fisiológico o al menos a un pH en 2, preferentemente 1, más 15 preferentemente 0,5, más preferentemente todavía 0,2 y más preferentemente aún 0,1 unidades de pH con respecto al pH óptimo.

Los medicamentos pueden incluir constituyentes para optimizar su adecuación a la vía de suministro escogida en particular. La viscosidad de los medicamentos puede mantenerse en un nivel deseado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Entre los agentes espesantes que pueden usarse se incluyen metilcelulosa, goma de 20 xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, alcohol polivinílico, alginatos, acacia, quitosanos y combinaciones de los mismos. La concentración del agente espesante dependerá del agente seleccionado y de la viscosidad deseada.

En algunas realizaciones, y en particular cuando se va a usar suministro intranasal, los medicamentos pueden 25 comprender un humectante. Se puede así ayudar a reducir o a prevenir el secado de la membrana mucosa y a prevenir la irritación de las membranas. Entre los humectantes adecuados se incluyen sorbitol, aceite mineral, aceite vegetal y glicerol; agentes suavizantes; acondicionadores de membrana; edulcorantes; y combinaciones de los mismos.

30 Los medicamentos pueden comprender un tensioactivo. Entre los tensioactivos adecuados se incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos. Entre los ejemplos de tensioactivos que pueden usarse se incluyen, por ejemplo, derivados de polioxietileno de ésteres parciales de ácidos grasos de anhídridos de sorbitol, como por ejemplo, Tween 80, estearato de polioxilo 40, estearato de polioxietileno 50, fusidatos, sales biliares y Octoxinol.

35 Los medicamentos de la presente invención pueden suministrarse mediante cualquier dispositivo adaptado para introducir una o más composiciones terapéuticas en el aparato respiratorio superior y/o inferior. Los dispositivos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser inhaladores dosificadores. Los dispositivos pueden estar adaptados para suministrar las composiciones terapéuticas de la invención en forma de una niebla finamente dispersada de líquido, espuma o polvo. El dispositivo puede usar un efecto piezoeléctrico o vibración ultrasónica 40 para desalojar el polvo adherido a una superficie como, por ejemplo, una cinta con el fin de generar una niebla adecuada para su inhalación. Los dispositivos pueden usar cualquier sistema propulente conocido por los expertos en la materia lo que incluye, pero no se limita a, bombas, gas licuado, gas comprimido y similares.

Los dispositivos descritos en la presente memoria descriptiva comprenden normalmente un recipiente con una o más 45 válvulas a través de las cuales se desplaza el flujo de la composición terapéutica y un accionador para controlar el flujo. Los dispositivos adecuados descritos en la presente memoria descriptiva pueden verse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (más arriba). Los dispositivos adecuados para administrar los medicamentos de la invención incluyen inhaladores y nebulizadores tales como los usados normalmente para suministrar esteroides a los asmáticos. En algunos casos, cuando el sujeto es por ejemplo un niño, puede usarse un separador 50 para facilitar la administración eficaz desde el inhalador.

Comercialmente existen varios diseños que pueden emplearse para suministrar los medicamentos de la invención. Entre ellos se incluyen los dispositivos Accuhaler, Aerohaler, Aerolizer, Airmax, Autohaler, Clickhaler, Diskhaler, Easi-breathe inhaler, Fisonair, Integra, Jet inhaler, Miat-haler, Novolizer inhaler, Pulvinal inhaler, Rotahaler, 55 Spacehaler, Spinhaler, Sincroner inhaler y Turbohaler.

En aquellos casos en los que el glucosaminoglucano y/o la ADNasa I se administran en forma de partículas o gotitas, es posible elegir el tamaño de la partícula/gotita y/u otras propiedades de la partícula/gotita para asegurarse de que las partículas se suministran en una región determinada del aparato respiratorio. Por ejemplo, pueden

diseñarse para llegar sólo a las partes superior o inferior del aparato respiratorio. En aquellos casos en los que el glucosaminoglucano, sal o agente terapéutico se suministran en forma acuosa preferentemente la solución será isotónica para ayudar a asegurar un suministro eficaz en el sujeto.

- 5 Si se desea administrar los medicamentos a, o por, el aparato respiratorio el tamaño de partícula del medicamento puede escogerse en función de la parte deseada del aparato respiratorio en la que se desea administrar el medicamento. En concreto, se cree que las partículas con un diámetro de 10  $\mu\text{M}$  son eficaces para llegar a las partes inferiores del aparato respiratorio y por consiguiente pueden emplearse cuando se desea un sitio semejante como diana para los medicamentos. Si se desea suministrar el medicamento a las partes inferiores del aparato respiratorio, como, por ejemplo, los alvéolos, el diámetro de las partículas administradas puede ser inferior a 10  $\mu\text{M}$ , preferentemente inferior a 8  $\mu\text{M}$ , más preferentemente inferior a 6  $\mu\text{M}$  y más preferentemente todavía inferior a 4  $\mu\text{M}$ . En una realización preferida las partículas pueden tener un diámetro de 3  $\mu\text{M}$  o menos y más preferentemente pueden tener un diámetro de 2  $\mu\text{M}$  o menos. Las partículas pueden tener un diámetro de 3 a 5  $\mu\text{M}$ . En algunos casos las partículas administradas pueden tener un diámetro inferior a 1.000 nm, preferentemente inferior a 500 nm, más preferentemente inferior 250 nm y más preferentemente aún inferior a 100 nm. Los tamaños pueden referirse a partículas de material sólido o gotitas de soluciones y suspensiones.

El tamaño de partículas necesario para penetrar en una parte específica del aparato respiratorio será conocido en la técnica y por consiguiente el tamaño de partículas puede escogerse de manera que se adapte al tamaño pretendido.

- 20 Pueden usarse técnicas como trituración para producir las partículas necesarias de muy pequeño tamaño. En algunos casos la parte deseada del aparato respiratorio puede ser el aparato respiratorio superior y por consiguiente pueden emplearse tamaños de partícula más grandes. También puede elegirse la densidad de las partículas y su forma para facilitar su suministro al sitio deseado.
- 25 Los medicamentos descritos en la presente memoria descriptiva pueden adoptar diversas formas. En el caso de que estén destinados a ser administrados por el aparato respiratorio pueden tener forma de polvos, microesferas de polvo, soluciones, suspensiones, geles, suspensiones de nanopartículas, liposomas, emulsiones o microemulsiones. El líquido presente puede ser agua u otros disolventes adecuados como CFC o HFA. En el caso de soluciones y suspensiones, pueden ser acuosas o incluir soluciones distintas del agua.

- 30 Las composiciones de la invención también pueden usarse como recubrimiento de implantes, dispositivos o materiales que se introducirán en el cuerpo. En estas realizaciones pueden liberarse desde la superficie del objeto, preferentemente de forma lenta.

- 35 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

- 40 - Una ADNasa I; y

- Un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 45 El excipiente puede ser cualquiera de los mencionados en la presente memoria descriptiva, o cualquiera de los vehículos. La ADNasa I y el glucosaminoglucano o sal son tal como se define en las reivindicaciones 1 a 21.

#### *Aplicaciones no clínicas*

- 50 Aunque el uso principal de la invención es en un contexto clínico, la ADNasa I se usa también para diversas aplicaciones no clínicas. Así la demostración del efecto sinérgico del glucosaminoglucano en la actividad de la ADNasa I significa que la cantidad de ADNasa I necesaria en dichas aplicaciones puede reducirse o alternativamente que puede conseguirse un nivel superior de actividad de la ADNasa I usando la misma cantidad de ADNasa I.

- 55 Así la presente invención proporciona el uso de un glucosaminoglucano, o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd para aumentar la actividad de una ADNasa I *in vitro*.

Los usos no clínicos de la invención incluyen, por ejemplo, experimentos de laboratorio y/o investigación. Por ejemplo, la ADNasa I se usa en ocasiones para eliminar el ADN contaminante de preparaciones de ARN y en

particular de ARNm antes de la síntesis de ADNc. También se usa para reducir la viscosidad en cámaras de microinyección para microinyección de embriones y otros sistemas en los que los aumentos de viscosidad debidos a la presencia de ADN pueden causar problemas. La invención puede usarse para incrementar la actividad de la ADNasa I en situaciones en las que se va a usar la enzima para reducir la viscosidad de una solución mediante escisión del ADN.

Los productos y procedimientos de la invención pueden usarse en cualquier aplicación no clínica que implique ADNasa I. Pueden introducirse etapas adicionales de purificación en los procedimientos para eliminar el glucosaminoglucano, si así se desea o resulta necesario, posteriormente al o después del tratamiento con ADNasa I.

10 Cualquiera de los parámetros descritos en la presente memoria descriptiva en relación con las aplicaciones clínicas de la invención puede ser aplicable igualmente a las aplicaciones no clínicas, y viceversa.

#### Kits

15 También se refieren kits que comprenden: un glucosaminoglucano o una sal del mismo, de peso molecular medio de 8 a 40 kd; una ADNasa I; y un envase. El glucosaminoglucano o la sal y la ADNasa I pueden proporcionarse en los kits en cualquiera de las formas expuestas en la presente memoria descriptiva. El kit puede comprender también reactivos o ensayos adicionales para realizar los diversos ensayos y técnicas que pueden realizarse usando ADNasa I y en particular técnicas de laboratorio que usan la enzima. El kit puede comprender también

20 adicionalmente instrucciones sobre cómo poner en práctica las técnicas.

En la presente memoria descriptiva se describe un kit que comprende:

- Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, teniendo el glucosaminoglucano o la sal del mismo un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

25

- Una ADNasa I; y

- Un envase.

30

El kit puede comprender instrucciones para la administración en secuencia, simultánea o separada de la ADNasa I y glucosaminoglucano a un sujeto que padece un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno y sometido a tratamiento con un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd, de manera que el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I en el que el trastorno es: (a) un trastorno respiratorio caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón; (b) seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía; (c) lupus eritematoso sistémico (LES); o (d) un trastorno caracterizado por la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

35

40 Las instrucciones pueden adoptar la forma de una etiqueta en el envase. El kit puede comprender adicionalmente medios para administrar el glucosaminoglucano o la sal del mismo y/o la ADNasa I tales como cualquiera de los expuestos en la presente memoria descriptiva.

En los Ejemplos siguientes se ilustra la invención.

45

#### **Ejemplo 1: Demostración de sinergia de ADNasa y heparina *in vitro***

Se determinó el efecto de la heparina en la actividad de la ADNasa *in vitro*. Se incubó ADN de timo de ternera (5 µg/ml) con un intervalo de concentraciones de ADNasa en presencia o ausencia de heparina no fraccionada (160 unidades USP por mg de una sal sódica de heparina de mucosa intestinal porcina, obtenida de Calbiochem, número de catálogo 375095) y se usó a una concentración de 1 mg/ml durante 1 hora a 37°C. Todas las soluciones se prepararon en tampón de fosfato de sodio que contenía sulfato de magnesio 1,2 mM. Después del tratamiento con ADNasa se estimó la cantidad de ADN intacto usando colorante Hoechst y cuantificando la fluorescencia asociada (Labarca y Pailer, 1980, Anal. Biochem., 102:344-352). Se usó ADNasa I bovina y tuvo 2.500 unidades kunitz por mg (se usó la misma ADNasa en los Ejemplos 2 y 3). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

50

55

La presencia de heparina incrementó significativamente la actividad de la ADNasa, con el resultado de una descomposición más rápida del ADN. Sin embargo, los experimentos que usaron heparina de bajo peso molecular de peso molecular medio 6 kd en el intervalo de concentración de 0,01 µg/ml a 10 mg/ml no tuvieron efecto en la

actividad de la ADNasa (heparina de bajo peso molecular, se empleó una sal sódica de heparina obtenida de mucosa intestinal porcina con PM 6.000, obtenida de Sigma, número de catálogo D7037). Así, los resultados muestran que en concentraciones de ADNasa que se alcanzan normalmente en las vías respiratorias de los pacientes con fibrosis quística que recibieron [...] inhalado *[frase incompleta]*

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>

10 <120> TERAPIA DE COMBINACIÓN CON GLUCOSAMINOGLUCANO

<130> P.85643 GCW

<140>

15 <141>

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

20

<210> 1

<211> 1055

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

25

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1054)

<223>

30

<400> 1

a gcc atg cac tac cca act gca ctc ctc ttc ctc atc ctg gcc aat ggg	49
Ala Met His Tyr Pro Thr Ala Leu Leu Phe Leu Ile Leu Ala Asn Gly	
1 5 10 15	
acc cag acc ttt cgc atc tgc gcc ttc aat gcc cag cgg ctg aca ctg	97
Thr Gln Thr Phe Arg Ile Cys Ala Phe Asn Ala Gln Arg Leu Thr Leu	
20 25 30	
ccc aag gtg gcc agg gag cag gtg atg gac acc tta gtt cgg ata ctg	145
Pro Lys Val Ala Arg Glu Gln Val Met Asp Thr Leu Val Arg Ile Leu	
35 40 45	
gct cgc tgt gac atc atg gtg ctg cag gag gtg gtg gac tct tcc ggc	193
Ala Arg Cys Asp Ile Met Val Leu Gln Glu Val Val Asp Ser Ser Gly	
50 55 60	
agc gcc atc ccg ctc ctg ctt cga gaa ctc aat cga ttt gat ggc tct	241
Ser Ala Ile Pro Leu Leu Leu Arg Glu Leu Asn Arg Phe Asp Gly Ser	
65 70 75 80	
ggg ccc tac agc acc ctg agc agc ccc cag ctg ggg cgc agc acc tac	289
Gly Pro Tyr Ser Thr Leu Ser Ser Pro Gln Leu Gly Arg Ser Thr Tyr	
85 90 95	
atg gag acg tat gtg tac ttc tat cgg tca cac aaa aca cag gtc ctg	337
Met Glu Thr Tyr Val Tyr Phe Tyr Arg Ser His Lys Thr Gln Val Leu	
100 105 110	
agt tcc tac gtg tac aac gat gag gat gac gtc ttt gcc cgg gag cca	385
Ser Ser Tyr Val Tyr Asn Asp Glu Asp Asp Val Phe Ala Arg Glu Pro	
115 120 125	
ttt gtg gcc cag ttc tct ttg ccc agc aat gtc ctt ccc agc ctg gtg	433
Phe Val Ala Gln Phe Ser Leu Pro Ser Asn Val Leu Pro Ser Leu Val	
130 135 140	
ttg gtc ccg ctg cac acc act cct aag gcc gta gag aag gag ctg aac	481
Leu Val Pro Leu His Thr Thr Pro Lys Ala Val Glu Lys Glu Leu Asn	
145 150 155 160	

ES 2 527 096 T3

gcc ctc tac gat gtg ttt ctg gag gtc tcc cag cac tgg cag agc aag	529
Ala Leu Tyr Asp Val Phe Leu Glu Val Ser Gln His Trp Gln Ser Lys	
165 170 175	
gac gtg atc ctg ctt ggg gac ttc aat gct gac tgc gct tca ctg acc	577
Asp Val Ile Leu Leu Gly Asp Phe Asn Ala Asp Cys Ala Ser Leu Thr	
180 185 190	
aaa aag cgc ctg gac aag ctg gag ctg cgg act gag cca ggc ttc cac	625
Lys Lys Arg Leu Asp Lys Leu Glu Leu Arg Thr Glu Pro Gly Phe His	
195 200 205	
tgg gtg att gcc gat ggg gag gac acc aca gtg cgg gcc agc acc cac	673
Trp Val Ile Ala Asp Gly Glu Asp Thr Thr Val Arg Ala Ser Thr His	
210 215 220	
tgc acc tat gac cgc gtc gtg ctg cac ggg gag cgc tgc cgg agt ctg	721
Cys Thr Tyr Asp Arg Val Val Leu His Gly Glu Arg Cys Arg Ser Leu	
225 230 235 240	
ctg cac act gcg gct gcc ttt gac ttc ccc acg agc ttc cag ctc acc	769
Leu His Thr Ala Ala Ala Phe Asp Phe Pro Thr Ser Phe Gln Leu Thr	
245 250 255	
gag gag gag gcc ctc aac atc agt gac cac tac ccc gtg gag gtg gag	817
Glu Glu Glu Ala Leu Asn Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Glu	
260 265 270	
ctg aag ctg agc cag gcg cac agc gtc cag cct ctc agc ctc act gtt	865
Leu Lys Leu Ser Gln Ala His Ser Val Gln Pro Leu Ser Leu Thr Val	
275 280 285	
ctg ttg ctg cta tca ctc ctg tcc cct cag ctg tgc cct gct gcc tga	913
Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Pro Gln Leu Cys Pro Ala Ala	
290 295 300	
gcg tcc ccc tac ccc ccc agg gcc tgc tgc ctt ttg gga ctt aaa ccc	961
cag cct ccc ccg tcc atc cag ccc tgg ggc tgg ggg gct tca act ata	1009
gtt gcc ctg tga ctg tag tcc acc cct gcc tgc ctt gtt tga ttt g	1055

<210> 2

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Met His Tyr Pro Thr Ala Leu Leu Phe Leu Ile Leu Ala Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Gln Thr Phe Arg Ile Cys Ala Phe Asn Ala Gln Arg Leu Thr Leu  
 20 25 30  
 Pro Lys Val Ala Arg Glu Gln Val Met Asp Thr Leu Val Arg Ile Leu  
 35 40 45  
 Ala Arg Cys Asp Ile Met Val Leu Gln Glu Val Val Asp Ser Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Ala Ile Pro Leu Leu Arg Glu Leu Asn Arg Phe Asp Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Tyr Ser Thr Leu Ser Ser Pro Gln Leu Gly Arg Ser Thr Tyr  
 85 90 95  
 Met Glu Thr Tyr Val Tyr Phe Tyr Arg Ser His Lys Thr Gln Val Leu  
 100 105 110  
 Ser Ser Tyr Val Tyr Asn Asp Glu Asp Asp Val Phe Ala Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Phe Val Ala Gln Phe Ser Leu Pro Ser Asn Val Leu Pro Ser Leu Val  
 130 135 140  
 Leu Val Pro Leu His Thr Thr Pro Lys Ala Val Glu Lys Glu Leu Asn  
  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Tyr Asp Val Phe Leu Glu Val Ser Gln His Trp Gln Ser Lys  
 165 170 175  
 Asp Val Ile Leu Leu Gly Asp Phe Asn Ala Asp Cys Ala Ser Leu Thr  
 180 185 190  
 Lys Lys Arg Leu Asp Lys Leu Glu Leu Arg Thr Glu Pro Gly Phe His  
 195 200 205  
 Trp Tyr Ile Ala Asp Gly Glu Asp Thr Thr Val Arg Ala Ser Thr His  
 210 215 220  
 Cys Thr Tyr Asp Arg Val Val Leu His Gly Glu Arg Cys Arg Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Leu His Thr Ala Ala Ala Phe Asp Phe Pro Thr Ser Phe Gln Leu Thr  
 245 250 255  
 Glu Glu Glu Ala Leu Asn Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Glu  
 260 265 270  
 Leu Lys Leu Ser Gln Ala His Ser Val Gln Pro Leu Ser Leu Thr Val  
 275 280 285  
 Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Pro Gln Leu Cys Pro Ala Ala  
 290 295 300

REIVINDICACIONES

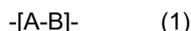
1. Uso de un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto con un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno, en el que el sujeto es sometido también a tratamiento con una ADNasa I, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es:

- (a) Un trastorno respiratorio **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;
- (b) Seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía;
- (c) Lupus eritematoso sistémico (LES); o
- (d) Un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

2. Uso de una ADNasa I en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto con un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno, en el que el sujeto es sometido también a tratamiento con un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es:

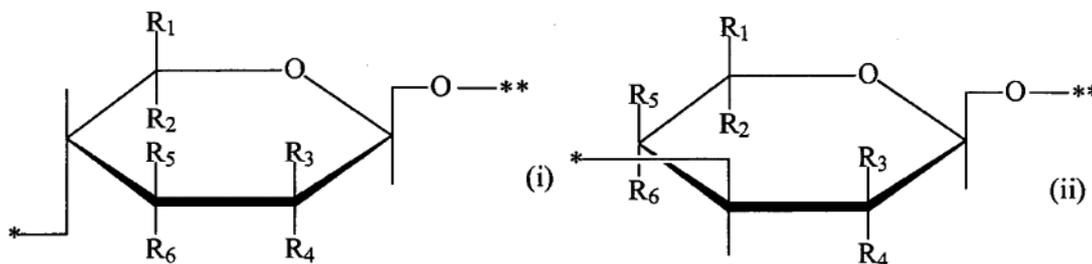
- (a) Un trastorno respiratorio **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;
- (b) Seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía;
- (c) Lupus eritematoso sistémico (LES); o
- (d) Un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el glucosaminoglucano o la sal fisiológicamente aceptable comprende unidades de disacáridos de repetición de fórmula general (1)



donde:

cada A es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (i) o (ii)



donde:

- Uno entre R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es hidrógeno, y el otro es -C<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H o -CH<sub>2</sub>OR;
- En el que R es hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H;
- Uno entre R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es hidrógeno, y el otro es -OR en el que R es hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H;
- Uno entre R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> es hidrógeno, y el otro es -OH;



(b) una actividad anticoagulante; y/o

(c) no ha sido sometido a fragmentación y/o despolimerización.

5

8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proporción entre la cantidad de glucosaminoglucano o sal del mismo y la cantidad de ADNasa I administrada es de 5.000:1 a 1:50 unidad por unidad.

10 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la proporción es de 25:1 a 1:25.

10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

(a) El glucosaminoglucano o la sal del mismo y la ADNasa I se administran al mismo tiempo;

15

(b) El glucosaminoglucano o la sal del mismo se administra antes o después de la ADNasa I; y/o

(c) El glucosaminoglucano o la sal del mismo y la ADNasa I se administran como medicamentos separados.

20 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene un VEF<sub>1</sub> de menos del 75% del valor esperado para un sujeto equivalente que no tiene el trastorno.

12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el glucosaminoglucano, o la sal y/o la ADNasa I se administran por inhalación, por vía intranasal y/o por instilación.

25

13. Una composición farmacéutica que comprende:

- Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

30

- Una ADNasa I; y

- Un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 que está en la forma de un polvo seco.

15. Productos que comprenden un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, teniendo el glucosaminoglucano o la sal del mismo un peso molecular medio de 8 a 40 kd, y una ADNasa I para su uso en el tratamiento de un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el sujeto destinado a tratamiento, donde el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I y donde los productos están destinados a administrarse de una forma simultánea, separada o en secuencia, en los que el trastorno es:

40

45 (a) Un trastorno respiratorio **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;

(b) Seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía;

(c) Lupus eritematoso sistémico (LES); o

50

(d) Un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.

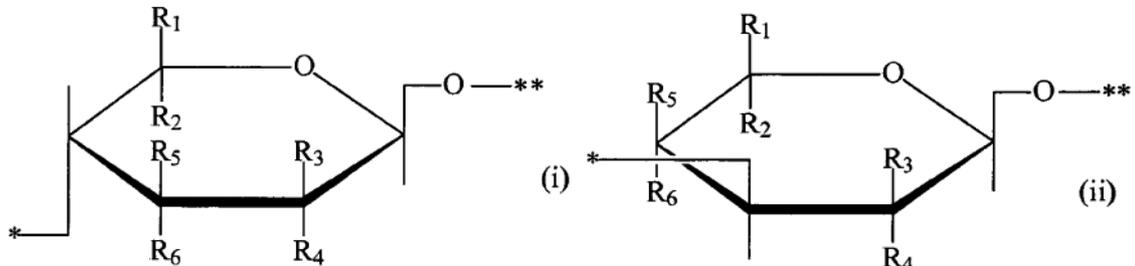
16. Productos para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en los que:

55 (A) el glucosaminoglucano o la sal fisiológicamente aceptable del mismo comprende unidades de disacáridos de repetición de fórmula general (1)

-[A-B]- (1)

donde:

cada A es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (i) o (ii)



donde:

- Uno entre  $R_1$  y  $R_2$  es hidrógeno, y el otro es  $-C_2H$ ,  $-SO_3H$  o  $-CH_2OR$ ;

- En el que R es hidrógeno o  $-SO_3H$ ;

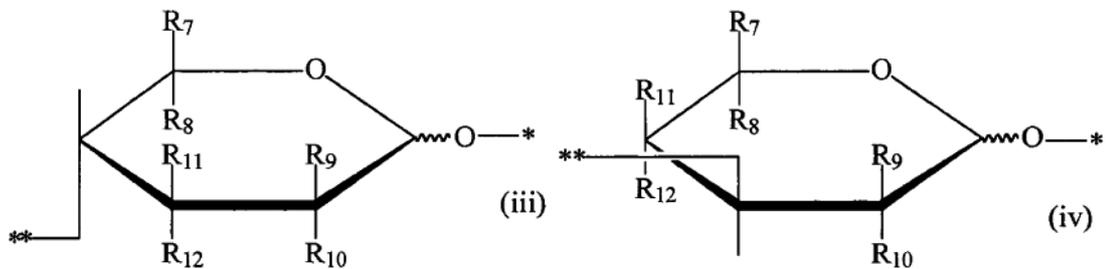
- Uno entre  $R_3$  y  $R_4$  es hidrógeno, y el otro es  $-OR$  en el que R es hidrógeno o  $-SO_3H$ ;

- Uno entre  $R_5$  y  $R_6$  es hidrógeno, y el otro es  $-OH$ ;

- \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción B adyacente; y

- \*\* representa un enlace directo con una fracción B adyacente;

cada B es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (iii) o (iv)



25 donde:

- Uno entre  $R_7$  y  $R_8$  es hidrógeno y el otro es  $-CH_2OH$  o  $-CH_2OSO_3H$ ;

- Uno entre  $R_9$  y  $R_{10}$  es hidrógeno y el otro es  $-NHAc$ ,  $-NH_2$  o  $-NHSO_3H$ ;

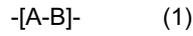
- Uno entre  $R_{11}$  y  $R_{12}$  es hidrógeno y el otro es  $-OH$  o  $-OSO_3H$ ; indica un enlace en cualquier orientación estereoquímica;

- \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción A adyacente;

- \*\* representa un enlace directo con una fracción A adyacente,

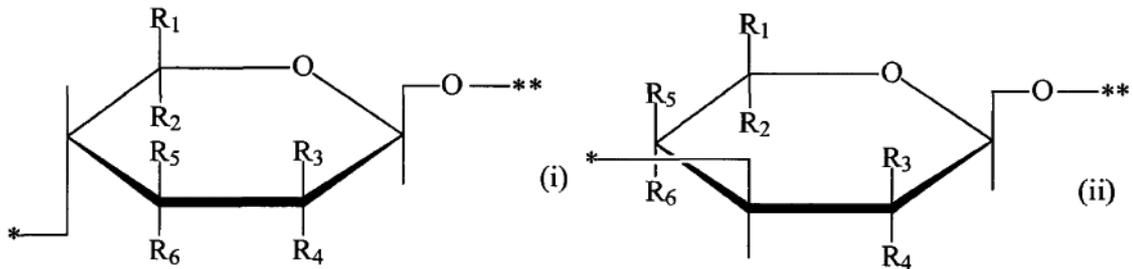
o una sal fisiológicamente aceptable del mismo; o

- (B) El glucosaminoglucano o la sal del mismo es una heparina; o
- (C) El glucosaminoglucano o la sal del mismo es condroitín sulfato A, condroitín sulfato C, condroitín sulfato D, condroitín sulfato E, ácido hialurónico, queratán sulfato o heparán sulfato; o
- 5 (D) Se usa la sal sódica de heparina o de sulfato de heparina; o
- (E) El glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 12 a 18 kd; o
- 10 (F) El glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene actividad anticoagulante; o
- (G) El glucosaminoglucano o la sal del mismo no ha sido sometido a fragmentación y/o despolimerización; o
- (H) La ADNasa I tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o es una ADNasa I con más del 65% de
- 15 identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (I) La ADNasa I es una ADNasa I de tipo humano; o
- (J) La ADNasa I es una ADNasa I recombinante; o
- 20 (K) La proporción entre la cantidad de glucosaminoglucano o sal del mismo y la cantidad de ADNasa I administrada es de 5.000:1 a 1:50 unidad por unidad; o
- (L) la proporción entre la cantidad de glucosaminoglucano o sal del mismo y la cantidad de ADNasa I que se
- 25 administrará es de 25:1 a 1:25.
17. Un agente para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno, comprendiendo el agente un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular
- 30 medio de 8 a 40 kd, en el que dicho sujeto es sometido a tratamiento con una ADNasa I y el glucosaminoglucano o la sal del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es:
- (a) Un trastorno respiratorio **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;
- 35 (b) Seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía;
- (c) Lupus eritematoso sistémico (LES); o
- (d) Un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.
- 40 18. Un agente para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno, comprendiendo el agente una ADNasa I, en el que dicho sujeto es sometido a tratamiento con un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd y el glucosaminoglucano o la sal
- 45 del mismo incrementa la actividad de la ADNasa I, en el que el trastorno es:
- (a) Un trastorno respiratorio **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en el pulmón;
- (b) Seleccionado entre fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía;
- 50 (c) Lupus eritematoso sistémico (LES); o
- (d) Un trastorno **caracterizado por** la presencia de ADN extracelular endógeno en un sitio inflamatorio.
- 55 19. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14 o un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, donde:
- (A) El glucosaminoglucano o la sal fisiológicamente aceptable del mismo comprende unidades de disacáridos de repetición de fórmula general (1)



donde:

5 cada A es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (i) o (ii)



10 donde:

- Uno entre R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es hidrógeno, y el otro es -C<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H o -CH<sub>2</sub>OR;

- En el que R es hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H;

15

- Uno entre R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es hidrógeno, y el otro es -OR en el que R es hidrógeno o -SO<sub>3</sub>H;

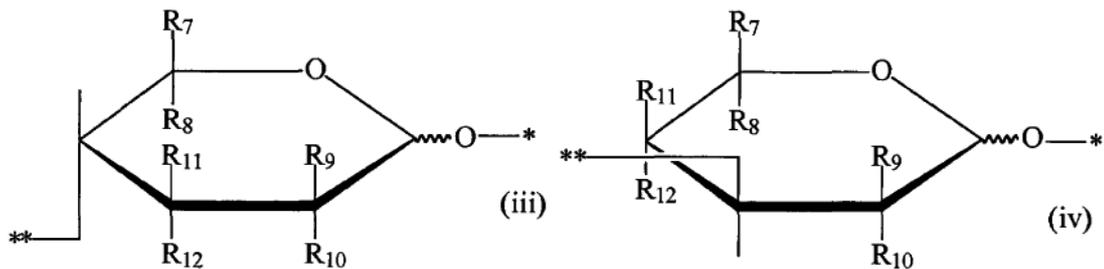
- Uno entre R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> es hidrógeno, y el otro es -OH;

20 - \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción B adyacente; y

- \*\* representa un enlace directo con una fracción B adyacente;

cada B es el mismo o diferente y representa una fracción de fórmula (iii) o (iv):

25



donde:

30 - Uno entre R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> es hidrógeno y el otro es -CH<sub>2</sub>OH o -CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H;

- Uno entre R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno y el otro es -NHAc, -NH<sub>2</sub> o -NHSO<sub>3</sub>H;

35 - Uno entre R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> es hidrógeno y el otro es -OH o -OSO<sub>3</sub>H; indica un enlace en cualquier orientación estereoquímica;

- \* representa un enlace directo con un átomo de hidrógeno o una fracción A adyacente;

- \*\* representa un enlace directo con una fracción A adyacente,

o una sal fisiológicamente aceptable del mismo; o

5 (B) El glucosaminoglucano o la sal del mismo es una heparina; o

(C) El glucosaminoglucano o la sal del mismo es condroitín sulfato A, condroitín sulfato C, condroitín sulfato D, condroitín sulfato E, ácido hialurónico, queratán sulfato o heparán sulfato; o

10 (D) Se usa la sal sódica de heparina o de sulfato de heparina; o

(E) El glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 12 a 18 kd; o

(F) El glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene actividad anticoagulante; o

15

(G) El glucosaminoglucano o la sal del mismo no ha sido sometido a fragmentación y/o despolimerización; o

(H) La ADNasa I tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o es una ADNasa I con más del 65% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

20

(I) La ADNasa I es una ADNasa I de tipo humano; o

(J) La ADNasa I es una ADNasa I recombinante; o

25 (K) La proporción entre la cantidad de glucosaminoglucano o sal del mismo y la cantidad de ADNasa I administrada es de 5000:1 a 1:50 unidad por unidad; o

(L) La proporción entre la cantidad de glucosaminoglucano o sal del mismo y la cantidad de ADNasa I que se administrará es de 25:1 a 1:25.

30

20. Un nebulizador u otro dispositivo de aerosol líquido, inhalador de polvo seco o inhalador dosificador que contiene una composición que comprende:

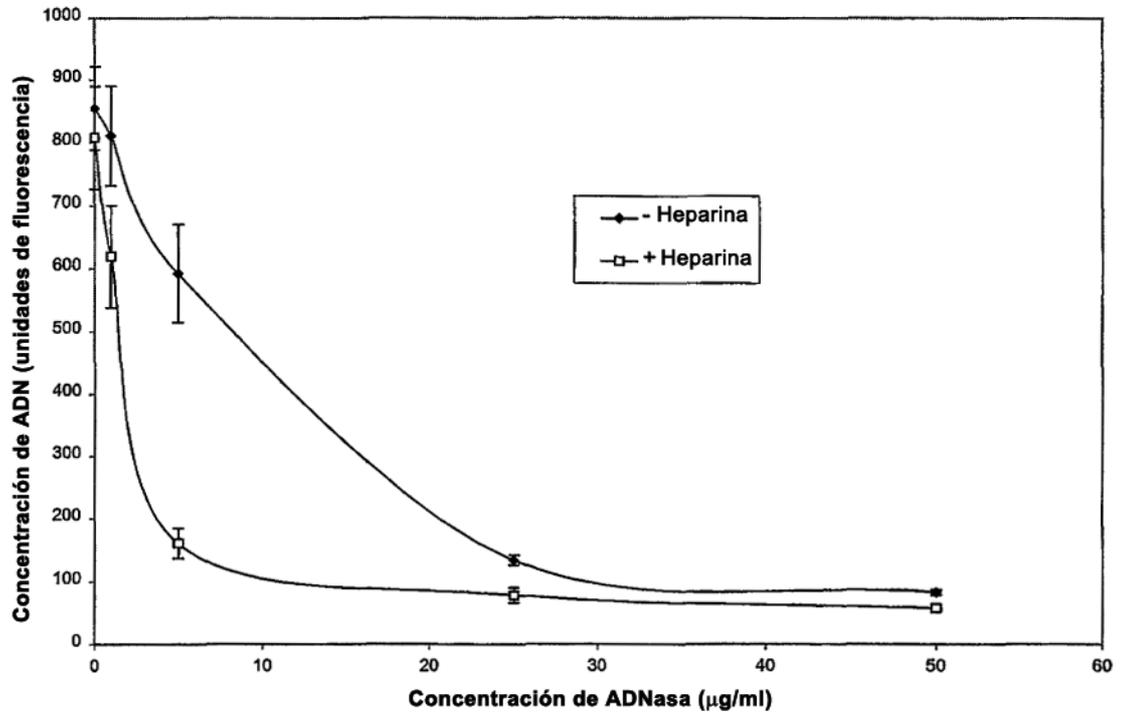
35 - Un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd;

- Una ADNasa I; y

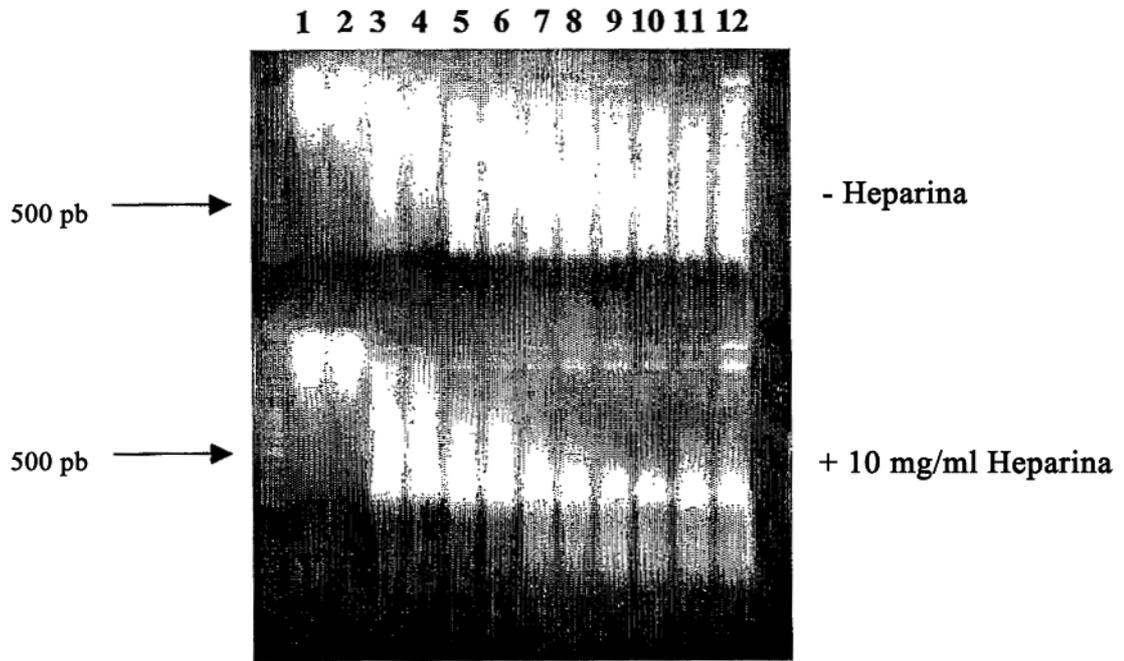
- Un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40

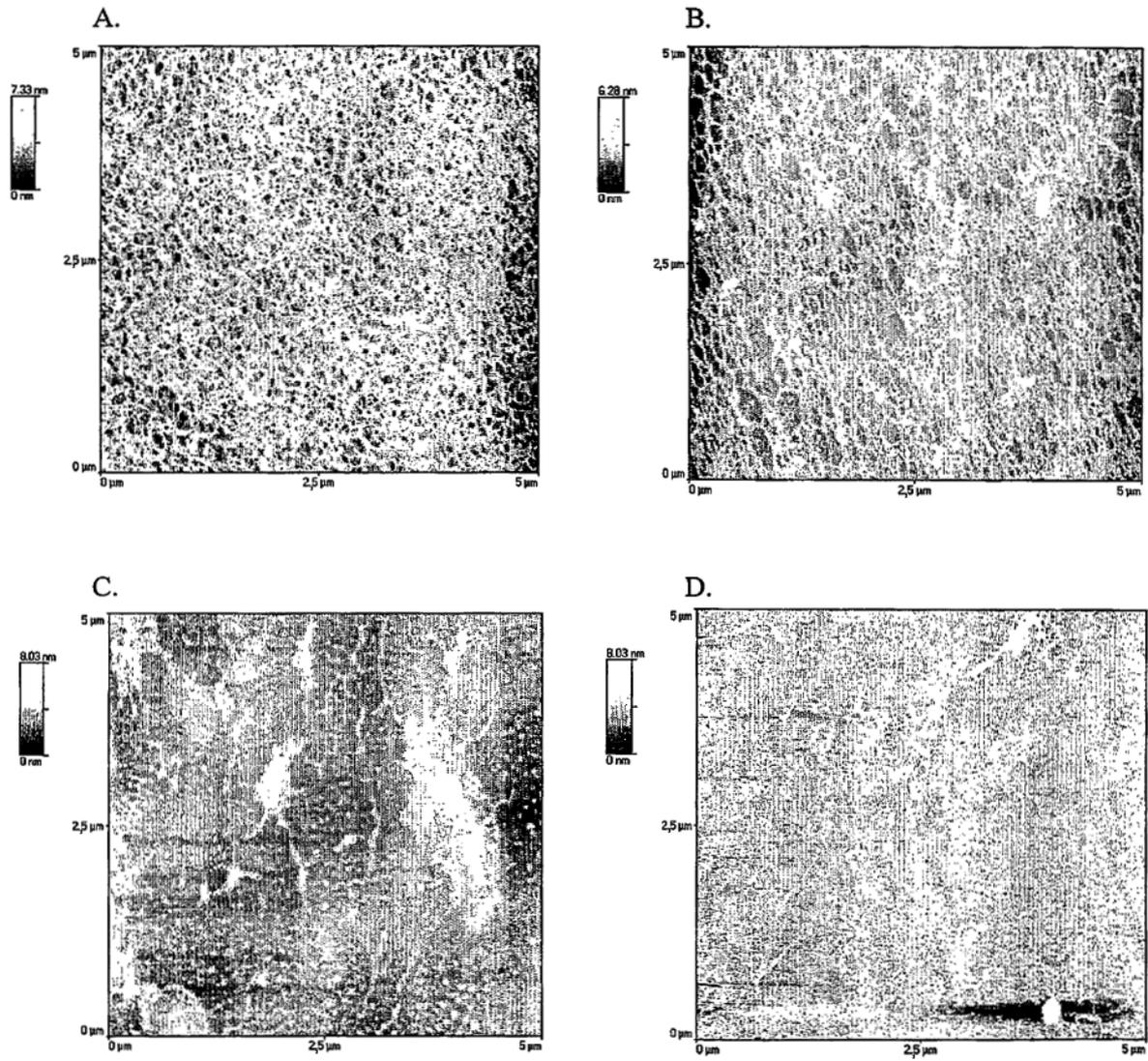
21. Uso de un glucosaminoglucano o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, tal que el glucosaminoglucano o la sal del mismo tiene un peso molecular medio de 8 a 40 kd para incrementar la actividad de una ADNasa I *in vitro*.



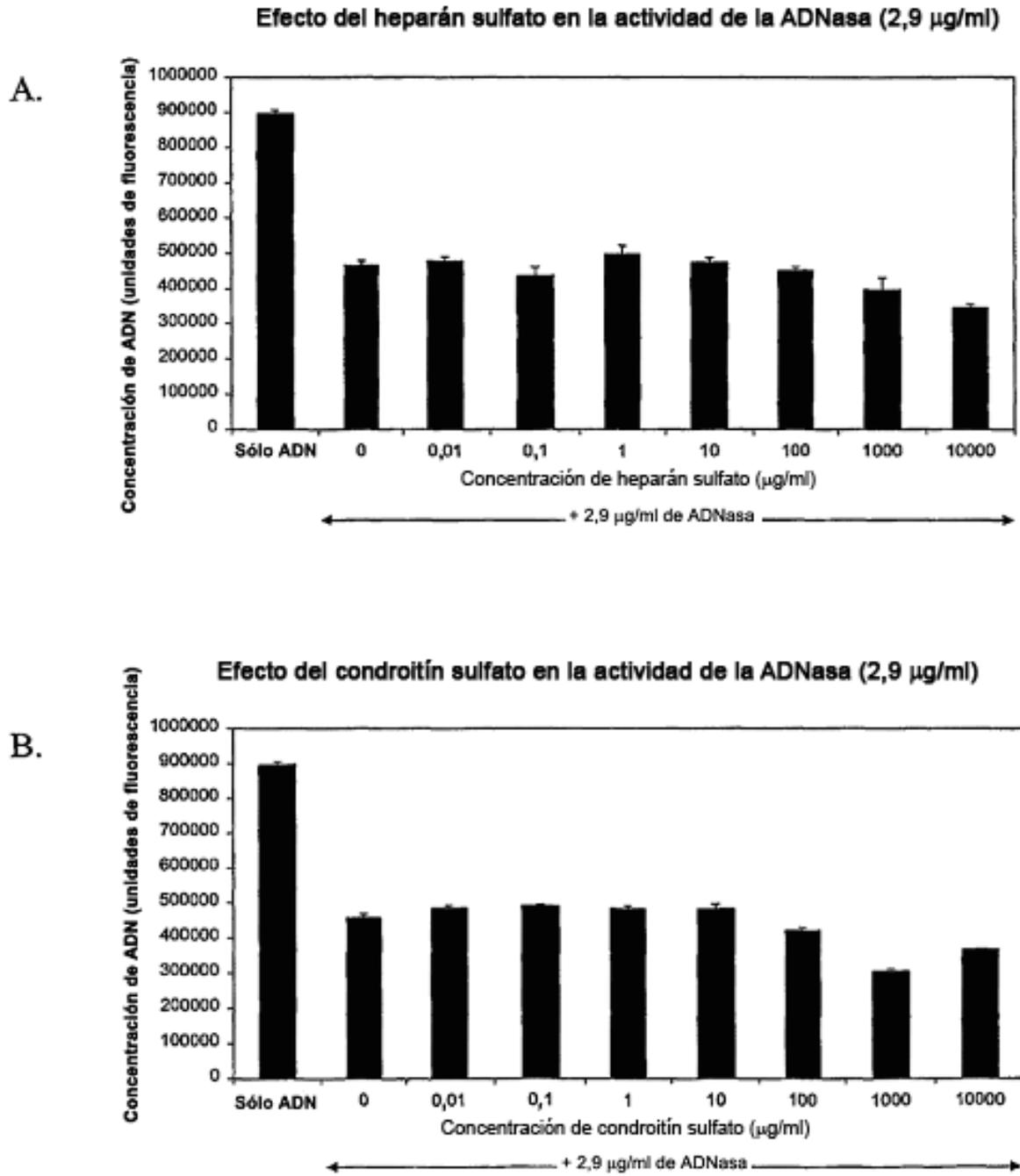
**Figura 1**



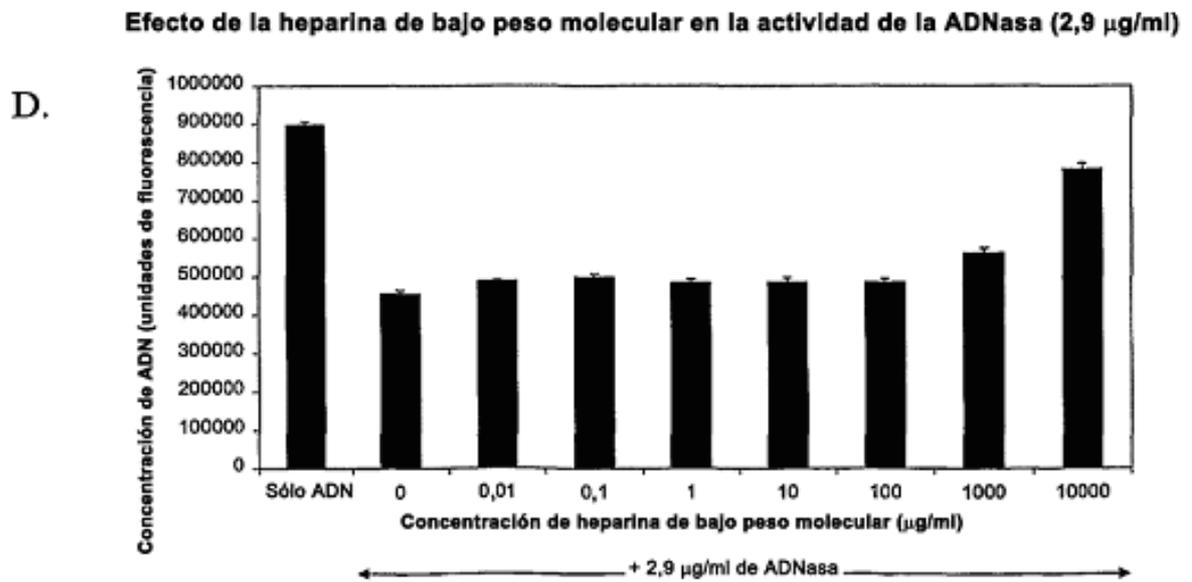
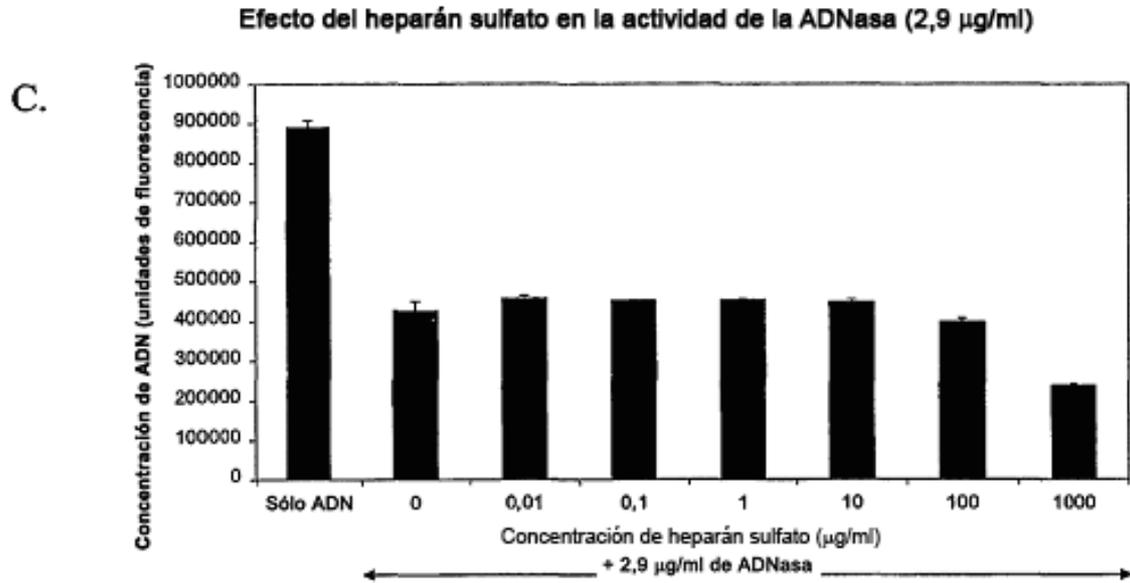
**Figura 2**



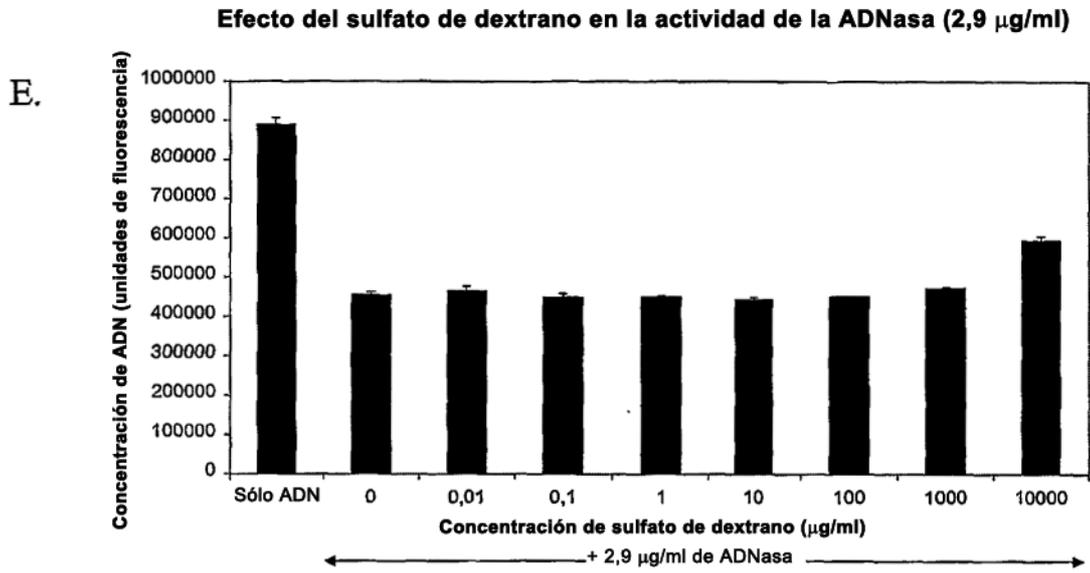
**Figura 3**



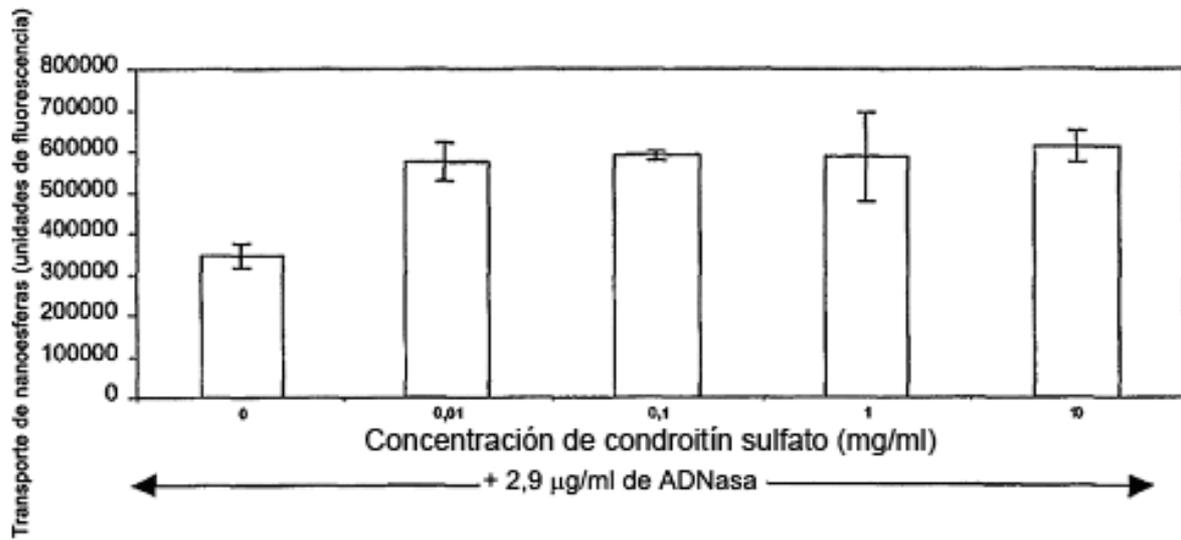
**Figura 4**



**Figura 4  
(continuación)**



**Figura 4  
(continuación)**



**Figura 5**

