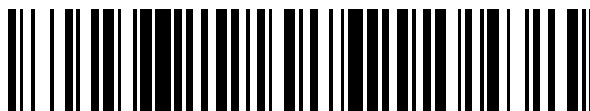


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 076**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015 PCT/EP2015/059306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15165944**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015 E 15718902 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3137099**

54 Título: **DNasa para uso en el tratamiento de crisis vaso-oclusivas**

30 Prioridad:

30.04.2014 EP 14305645

11.07.2014 EP 14306133

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS
(APHP) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BLANC-BRUDE, OLIVIER y
LEJEUNE, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 076 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

DNasa para uso en el tratamiento de crisis vaso-oclusivas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para tratar crisis vaso-oclusivas.

5 Antecedentes de la invención

La anemia de células falciformes o enfermedad drepanocítica (SCD, de sus siglas en inglés) es la primera enfermedad genética y un problema importante de salud pública en Francia. La SCD se designó en 2003 por la UNESCO como un problema prioritario de salud pública, en 2004 por el Ministerio de Salud Francés y en 2006 por la OMS. Aunque es una enfermedad rara, la afección es un reto cada vez más grave para los servicios sanitarios y sociales. Un brusco incremento en el número de pacientes pone a la anemia de células falciformes en la primera posición de enfermedades genéticas en áreas metropolitanas francesas, respecto a 5.000 a 6.000 pacientes hasta los 18 años, con una estimación de 20.000 pacientes en 2020. La frecuencia portadora alcanza el 12% en las Antillas Francesas y aumenta en los Estados Unidos y en países en desarrollo. Las tendencias demográficas y los diagnósticos sistemáticos en el nacimiento para razas en riesgo son responsables parcialmente de este incremento brusco de casos a tratar. La SCD, es la enfermedad genética más común de nuestro tiempo, se convertirá pronto en un desafío de salud pública en las Antillas Francesas y en Francia en particular.

La SCD da como resultado una mutación puntual en el gen de hemoglobina (HbS), causando la polimerización de la hemoglobina, que media el remodelado drástico e irreversible de los glóbulos rojos (RBC, de sus siglas en inglés). En la presente memoria, la anemia de células falciformes se refiere al fenotipo homocigótico HbSS.

En la anemia de células falciformes y en otras anemias hemolíticas, los RBC presentan muchas características únicas que incluyen la expresión de fosfatidilserina y de receptores de adhesión en la superficie celular que normalmente están ausentes en la superficie de RBC maduros sanos. Los RBC remodelados se pueden agregar y unir los unos a los otros, a otros tipos de células circulantes o a la pared vascular. Los agregados multicelulares de tamaño excesivo fracasan al pasar a través de vasos de pequeño tamaño, formando tapones vaso-oclusivos que detienen el flujo sanguíneo, particularmente en capilares y microvasos. Tales vaso-oclusiones e interrupciones en la perfusión causa episodios de isquemia en los tejidos posteriores. Los eventos vaso-oclusivos e isquémicos participan en una de las manifestaciones más dañinas de la enfermedad drepanocítica, la crisis vaso-oclusiva (VOC, de sus siglas en inglés), que a menudo requiere de hospitalización para ayudar a controlar el extremo dolor que causa. Pero las vaso-oclusiones participan también en el daño tisular isquémico recurrente sobre una base crónica, dando como resultado un daño progresivo del órgano y finalmente una insuficiencia orgánica múltiple.

El foco de investigación primario en la enfermedad drepanocítica en las últimas décadas ha sido la biología del eritrocito, con el objetivo de bloquear la remodelación del eritrocito para prevenir la rigidez y la agregación eritrocitaria, así como la VOC, la hemólisis intravascular y la anemia como consecuencias. Sin embargo, los mecanismos que dominan sobre la incidencia de las vaso-oclusiones aún siguen sin comprenderse. La fisiopatología de la SCD implica una compleja combinación de factores de circulación, inflamatorios y cardiovasculares que se han considerado sólo recientemente.

Se sabe poco de los mecanismos de agregación eritrocitaria, incluso en individuos sanos. Se piensa que los eritrocitos se agregan en las vénulas post-capilares, donde disminuye la tensión de cizallamiento según aumenta el diámetro del vaso, facilitando el contacto entre los eritrocitos. En el ámbito sanitario, los eritrocitos discoidales tienden a entrar en contacto con sus partes planas y permanecer unidos para formar acumulaciones. Se cree que el fibrinógeno plasmático participa en este tipo de agregación post-capilar. Sin embargo, en la enfermedad drepanocítica, la hemólisis intravascular y la descomposición de los eritrocitos frágiles liberan hemoglobina y el grupo hemo 'libre' al torrente sanguíneo, y fragmentos de la membrana eritrocitaria llamadas micropartículas (MP), que transportan también receptores en la superficie celular eritrocitaria e incluyen algunos de sus contenidos.

Actualmente no existen fármacos específicos para tratar o prevenir la VOC. El cuidado primario para la VOC es la hospitalización para controlar el dolor con analgésicos potentes, combinados con rehidratación y oxigenación. No existen fármacos específicos para prevenir la incidencia o tratar la VOC. El tratamiento con hidroxiurea a largo plazo, desde 1995, se prescribe a veces para forzar la re-expresión de hemoglobina fetal, para reducir la formación de células falciformes y finalmente reducir la hemólisis. Sin embargo, la hidroxiurea sólo es eficaz en aproximadamente el 40% de los pacientes con SCD, con presunción de carcinogénesis y baja fertilidad a largo plazo. Los casos más severos de VOC son aptos para la transfusión sanguínea, con el riesgo asociado a infección viral y hemocromatosis secundaria, y complicaciones vinculadas al trasplante. Por lo tanto, la responsabilidad de la SCD para las instituciones sanitarias está unida al acusado incremento mundial. En este momento, la medicina genética sigue siendo incapaz de corregir las mutaciones HbS en adultos. Los avances en la prevención de la hemólisis eritrocitaria se han estancado desde el descubrimiento de la hidroxiurea. Por tanto, existe una clara necesidad de estrategias de nuevos tratamientos que limiten las vaso-oclusiones para reducir la VOC, y también para reducir las manifestaciones agudas y crónicas de la enfermedad.

El aislamiento del ADN plasmático y la caracterización de técnicas se han discutido y redefinido [Jen, 2000; Stroun, 2001; Rykova, 2012]. En 2007, un estudio ha revelado la presencia inesperada de una concentración anormal de ADN libre en el plasma de pacientes [Vasavda, 2007]. En pacientes con enfermedad drepanocítica en estado estable los niveles de ADN libre circulante permanecen similares a los de los voluntarios sanos. Sin embargo, el ADN circulante aumenta hasta 10 veces durante la VOC. Posteriormente, otro grupo validó la observación de ADN circulante aumentado en el plasma de pacientes con SCD, y particularmente en VOC [Schimmel, 2013 Hematologica]. Además, sugiere que este ADN en el plasma de SCD procede básicamente de neutrófilos inflamatorios que liberan trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, de sus siglas en inglés). Sin embargo, no se ha presentado todavía un papel fisiopatológico específico en relación con la agregación RBC, la adhesión RBC o las oclusiones vasculares similares a las observadas en la anemia hemolítica crónica, y en particular en la enfermedad drepanocítica.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a métodos y a composiciones farmacéuticas para tratar crisis vaso-oclusivas. En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

En la SCD, hay una conexión admitida entre la VOC y la emergencia de ADN extracelular circulante. La significancia fisiopatológica de esta observación está poco clara. En la presente memoria, los inventores han demostrado que el ADN extracelular *in vitro* causa agregación RBC en sangre en pacientes con enfermedad drepanocítica, pero no en voluntarios sanos. Los inventores han demostrado que la sangre de pacientes con enfermedad drepanocítica presenta signos de agregación RBC aumentada durante la VOC. Los autores han demostrado que la adición de DNasa a dicha sangre agregada disocia rápidamente y restablece la fluidez sanguínea *in vitro*. Los inventores han demostrado también un método práctico para administrar DNasa para obtener una reperusión rápida de los tejidos sometidos a vaso-oclusiones en un modelo murino experimental de vaso-oclusiones en ratones con enfermedad drepanocítica. La invención representa, por tanto, una técnica nueva para tratar pacientes con enfermedad drepanocítica, otros síndromes hemolíticos graves, o enfermedades que se asocian de otra manera con la agregación RBC. La técnica ayuda a disolver los agregados RBC, permitiendo el flujo sanguíneo y la reperusión tisular, limitando de este modo la duración de la VOC y la hospitalización, así como limitando las complicaciones asociadas con el daño vascular y los episodios isquémicos. La invención también puede ser útil como un planteamiento profiláctico para ayudar a prevenir la incidencia de la agregación RBC y las crisis vaso-oclusivas. La invención se puede combinar también con otras estrategias terapéuticas actuales para la VOC, que incluyen programas de transfusión sanguínea e hidroxiurea.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un uso de la DNasa como se define en las reivindicaciones en un método para tratar una crisis vaso-oclusiva, en un sujeto que padece la enfermedad drepanocítica, que comprende administrar al sujeto una cantidad de DNasa eficaz terapéuticamente.

Como se emplea en la presente memoria el término enfermedad drepanocítica tiene su significado general en la técnica e incluye la enfermedad drepanocítica homocigótica (enfermedad de la hemoglobina SS), la enfermedad de hemoglobina C drepanocítica doble heterocigótica (enfermedad de la hemoglobina SC) y las β -talasemias.

El método de la presente invención es adecuada particularmente para mejorar la reperusión tisular con sangre, por ejemplo, en pulmón, riñón, corazón, o tejido cerebral.

Como se emplea en la presente memoria, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se emplea en la presente memoria, abarca a cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, y puede incluir: (a) prevenir la aparición de una enfermedad o un síntoma de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que no se le ha diagnosticado por tenerla aún (por ejemplo, incluyendo enfermedades que se pueden asociar o causar por una enfermedad primaria); (b) inhibir la enfermedad o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar el retroceso de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento es un tratamiento profiláctico. Los términos “profilaxis” o “uso profiláctico” y “tratamiento profiláctico” como se emplean en la presente memoria, se refieren a cualquier procedimiento médico o de salud pública cuyo propósito es prevenir una enfermedad. Como se emplea en la presente memoria, los términos “prevenir” y “prevención” se refieren a la reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una afección dada, o la reducción o inhibición de la recurrencia de dicha afección en un sujeto que no está enfermo, que ha estado o puede estar cerca de un sujeto con la enfermedad.

El término “DNasa” tiene su significado general en la técnica y se refiere e incluye a todas las enzimas que tienen una actividad fosfodiesterasa y la capacidad de hidrolizar el ADN.

En la presente invención se puede emplear cualquier DNasa adecuada. La DNasa será más preferiblemente una DNasa I (EC 3.1.21.1). Esta puede ser, sin embargo, una DNasa II (EC 3.1.22.1). Las DNasas aparecen en varias especies y se puede emplear en la invención cualquier DNasa capaz de descomponer el ADN. La DNasa puede ser de una fuente animal tal como de origen bovino o porcino. Ésta puede ser de origen vegetal, fúngico, o microbiano. Sin embargo, normalmente y lo más preferible es la DNasa de origen humano y es preferiblemente una DNasa humana recombinante. En realizaciones de la invención se pueden emplear preparaciones de DNasas disponibles comercialmente, tales como Dornase™ y Pulmozyme™.

En algunas realizaciones, la DNasa tiene actividad hidrolítica, por ejemplo, en el caso de la DNasa I puede hidrolizar ADN para dar nucleótidos 5'-fosfato y en el caso de la DNasa II puede hidrolizar el ADN para dar nucleótidos 3'-fosfato. Se puede emplear un ensayo basado en fluorescencia, por ejemplo, la Tinción Hoechst, tal como la que se detectó por Labarce y Paiden, 1980, Anal. Biochem., 102:344-352 para ensayar la hidrólisis de ADN. La actividad hidrolítica se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica que incluyen poliacrilamida analítica y electroforesis en gel de agarosa, ensayo de hipercromicidad (Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:349-362, (1950); Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:363-377 (1950)) o el ensayo de verde metilo (Kurnick, Arch. Biochem. 29:41-53 (1950); Sinicropi, et al., Anal. Biochem. 222:351-358 (1994)). La rotura de las moléculas de ADN a formas de mayor a menor peso molecular se puede controlar preferiblemente mediante técnicas tales como la electroforesis en gel de agarosa. Se pueden realizar experimentos de control en ausencia de la enzima y/o en presencia de una proteína conocida por poseer actividad DNasa.

Las DNasas son conocidas por ser propensas a la desaminación. Los restos de asparagina y en particular la asparagina en las posiciones de aminoácidos 7 y 74 de la DNasa humana madura son propensas a la desaminación. Este proceso convierte a los restos de asparagina en cuestión a restos de ácido aspártico o isoaspartato. La desaminación reduce la actividad de la enzima y este es particularmente el caso para la desaminación en la asparagina en el aminoácido en posición 74 de la DNasa I humana madura. Hay disponibles técnicas para eliminar las formas desaminadas de las enzimas y éstas se pueden utilizar para preparar DNasas para usar en la invención. Estas técnicas pueden incluir la tecnología de tentáculo de intercambio catiónico (TCX, de sus siglas en inglés) o la purificación por afinidad empleando ADN para purificar las formas aminadas de la enzima que aún son capaces de unir ADN. Una preparación de DNasa para emplear en la invención puede comprender normalmente del 85 hasta el 100% aminado, preferiblemente del 90 al 100%, más preferiblemente del 95 al 100% e incluso más preferiblemente del 99 al 100%, o parcialmente aminado, de enzima en peso. Estas figuras en particular se refieren a la cantidad de enzima aminada completamente, es decir, con todos los restos aminados que se aminan de manera natural. Normalmente tendrán más del 95%>, preferiblemente más del 99%> e incluso más preferiblemente más del 99,9% de la DNasa en una forma aminada. En particular, estos valores se refieren al tiempo de producción o a sus valores desde un mes hasta un año, preferiblemente de dos a seis meses y más preferiblemente de tres meses a cuatro meses después de la producción. Pueden referirse al valor durante cualquier punto de la vida media del producto.

En la invención se pueden emplear variantes de DNasas que aparecen de manera natural o DNasas conocidas. Por tanto, el término DNasa abarca tales variantes. El término "variantes" se refiere a polipéptidos que tienen el mismo carácter esencial o funcionalidad biológica básica que las DNasas. El carácter esencial de una DNasa es la actividad fosfodiesterasa y la capacidad para hidrolizar el ADN. Los ensayos para medir la escisión del ADN se describen en la presente memoria y éstos se pueden emplear para determinar si una variante tiene actividad hidrolítica.

La secuencia de la DNasa se puede modificar para prolongar la vida media. Por ejemplo, la secuencia de la enzima se puede cambiar para eliminar las secuencias de reconocimiento por determinadas proteasas y en particular por aquellas que derivan de células inflamatorias.

La DNasa empleada en la invención se puede modificar también químicamente para alterar sus propiedades, tal como, por ejemplo, su vida media biológica. Para conseguir estas modificaciones covalentes se pueden introducir haciendo reaccionar restos de aminoácidos marcados de la DNasa nativa o variante con un agente orgánico de derivación que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos o con los restos N- o C-terminales. Agentes de derivación y métodos adecuados son bien conocidos en la técnica. Los restos que se pueden derivar en particular incluyen los restos de cisteinilo (lo más comúnmente mediante reacción con α -haloacetatos), restos histidilo (lo más comúnmente mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0), restos lisinilo y amino terminales (mediante reacción con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico), restos de arginilo (mediante reacción con reactivos tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina). Los grupos carboxilo laterales (aspartilo o glutamilo) se pueden modificar selectivamente mediante reacción con carbodiimidas o se pueden convertir a restos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio. El enlace covalente de agentes tales como polietilenglicol (PEG) o albúmina sérica humana a las DNasas puede reducir su inmunogenicidad y/o toxicidad de la variante y/o prolongar su vida media y, por tanto, se puede emplear en la invención. En algunas realizaciones de la invención la DNasa se puede conjugar directamente al glicosaminoglicano o unirse a través de una molécula intermediaria.

En algunas realizaciones, el agente es una molécula que interfiere con la capacidad de la molécula de ácido desoxirribonucleico para unirse a los receptores en las superficies del glóbulo rojo. Estas moléculas pueden ser moléculas que se unen y bloquean los receptores o moléculas que se unen y bloquean moléculas de ácido

desoxirribonucleico. Las moléculas que bloquean el receptor pueden ser de bajo peso molecular, por ejemplo, dímeros desoxirribonucleótidos, fosfodesoxirribosil pirofosfato (PdRPP), desoxirribonucleótidos o iones metálicos, o de alto peso molecular tal como péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos o glicoproteínas. Moléculas que se unen o bloquean moléculas de ácido desoxirribonucleico pueden ser péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas que se unen a ADN, proteínas nucleares (como histonas, protaminas) o anticuerpos.

Por una "cantidad eficaz terapéuticamente" del agente significa una cantidad suficiente del agente para tratar una crisis vaso-oclusiva en el sujeto. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total del agente se decide por el médico tratante dentro del alcance del juicio médico sensato. El nivel de dosificación eficaz terapéuticamente específica para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración; la vía de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos empleados en combinación o coincidente con el agente específico; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es adecuado que el experto en la técnica comience a dosis del compuesto más bajas que las requeridas para alcanzar el efecto terapéutico deseado e incremente gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria del agente puede variarse a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del agente para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

El agente se puede combinar con excipientes aceptables farmacéuticamente, y opcionalmente con matrices de liberación sostenida, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "aceptable farmacéuticamente" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción secundaria cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según proceda. Un transportador o excipiente aceptable farmacéuticamente se refiere a un sólido, semi-sólido o relleno líquido, diluyente, material de encapsulación o material auxiliar de cualquier tipo, no tóxico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, en solitario o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Formas de administración unitaria adecuadas comprenden las formas de la vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son aceptables farmacéuticamente para una formulación capaz de inyectarse. Éstas pueden estar en disoluciones salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), isotónicas o estériles particulares, o composiciones secas, especialmente composiciones liofilizadas la cual se incorpora además, dependiendo del caso, de agua esterilizada o suero fisiológico, que permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe de ser estéril y debe ser fluida para prolongar la fácil jeringabilidad existente. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe de conservar frente a la acción de contaminación de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Disoluciones que comprenden compuestos de la invención como una base libre o como sales aceptables farmacológicamente se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Se pueden preparar dispersiones en glicerol, glicoles de polietileno líquido, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo las condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El agente se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Sales aceptables farmacéuticamente incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el empleo de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el empleo de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede llevarse a cabo mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Se puede llevar a cabo la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el empleo en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Disoluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado a vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución estéril previamente filtrada de la misma.

En la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea eficaz terapéuticamente. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero se pueden emplear también cápsulas de liberación retardada y similares.

Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debe tamponar adecuadamente si es necesario y se debe agregar el primer diluyente líquido isotónico con suficiente suero salino o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son adecuadas especialmente para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, el medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de disolución NaCl isotónica y o bien añadir a 1000 ml de líquido de hipodermoclisis o bien inyectarse en el lado opuesto de infusión. Ocurrirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

El agente se puede formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso de aproximadamente 10 miligramos por dosis. Se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticas aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación retardada; y cualquier otra forma usada en la actualidad.

La invención se ilustrará además mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: Adhesión de eritrocitos a NETs.

Figura 2: Agregación RBC mediada por ADN.

Figura 3: DNasa-1 sobre eventos vaso-oclusivos inducidos por MP.

Ejemplos

Material y métodos

Animales: Se emplearon ratones C57b16J de 10-14 semanas de edad a menos que se indique lo contrario. Criamos ratones transgénicos SAD obtenidos del Dr Beuzard (9) y que tienen un transgen en la cadena β de la hemoglobina humana con 3 mutaciones (β S β^0 Val, β S-Antillas β^{23} Ile y D-Punjab β^{121} Glu). El genotipo se confirmó a través de caracterización electroforética de hemoglobinas sanguíneas en el departamento de hematología del Hospital Europeo George Pompidou en París. Los animales de tipo salvaje (wt) fueron las camadas de control de las colonias anteriores, o se obtuvieron a través de Charles River, Francia. Todos los procedimientos para el cuidado y la eutanasia de estudio animal siguieron los estándares de la Comunidad Europea (autorización #00577). Los protocolos se validaron por el comité ético Inserm local.

Crisis vaso-oclusivas en ratones: Caracterizamos la inducción de VOC en ratones transgénicos SAD (18,19) según nuestro método publicado previamente [Bonnin, 2008; Saboa, 2008; Cannus, 2012], en respuesta a la administración intravenosa de MP purificado derivado de RBC (50000 a 100000 MP/ratón) [Camus, 2012]. En resumen, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se controlaron para prevenir cualquier depresión cardiorrespiratoria. Los ratones se afeitaron y se colocaron en posición decúbite sobre una manta eléctrica (38°C). Empleamos un ecógrafo Vivid 7 (GE Medical Systems®, Horten, Noruega) equipado con un transductor lineal 12-MHz (12L). La sonda ultrasónica se colocó en el lado izquierdo del abdomen para la examinación de las arterias renales, o en el lateral izquierdo decúbite para el registro del resultado cardíaco con el transductor en el pecho. Los datos se transfirieron on line hasta una estación de trabajo de análisis de imágenes ultrasónicas EchoPAC (GE Medical Systems®). Dos imágenes ultrasónicas bidimensionales del abdomen en modo-B longitudinal del lado izquierdo permitieron tomar medidas de la anchura y del peso del riñón. La detección del flujo sanguíneo codificado con colores mediante Doppler permitió localizar a las arterias renales. Se registraron un espectro Doppler pulsado y el pico sistólico, la media del tiempo medio y del final sistólico BFV en la arteria renal, con corrección del ángulo del haz Doppler. Para calcular el resultado cardíaco, se analizaron los perfiles de flujo espacial en imágenes en modo B del eje longitudinal paraesternal de la arteria pulmonar y del BFV como anteriormente. Se aplicó la siguiente fórmula: $CO = [(V^{media}.60). (\pi. (Dpa/2)^2)]$, donde CO es el resultado cardíaco en ml/minute, V^{media} es la media del tiempo medio BFV en cm/s y Dpa es el diámetro de la arteria pulmonar en cm. Se determinaron el tamaño y el BFV del riñón por el mismo investigador, como media de 5 a 8 mediciones. Se verificó la repetibilidad para las mediciones del resultado cardíaco. Controlamos y confirmamos que el tamaño del riñón era similar entre los ratones SAD y los de tipo salvaje. Después del sacrificio, los riñones se disecaron, deshidrataron, se colocaron en parafina, se dividieron y tiñeron mediante tinción tricrómica de Masson. La congestión vascular se observó mediante microscopio de contraste de fases, como grandes agregados de eritrocitos que ocluyen capilares y grandes vasos renales. En algunos experimentos, se inyectaron MP de RBC de ratones SDA (50000 a 500000 MP/ratón) para inducir vaso-oclusiones renales como se enunció anteriormente [Camus, 2012]. En algunos experimentos, se controló mediante eco-Doppler la DNasa-1 purificada inyectada en el seno retro-orbital en el tiempo indicado (de 5 a 20 minutos) después de la administración de MP y después del descenso de la perfusión renal. En este modelo, se piensa que la reperfusión renal espontánea ocurre dentro de los 45 a 120 minutos después de la administración de MP. En la presente memoria, nos dirigimos a controlar la reperfusión acelerada de los riñones después de la administración de DNasa.

Resultados:

Los RBC en la SCD se adhieren preferentemente a NETs (trampas extracelulares de neutrófilos, fabricadas de extensiones de ADN externalizadas), en vez de a los neutrófilos con el núcleo intacto, y se adhieren poco a neutrófilos completos de cromatina descondensada (Figura 1A). Al contrario de los RBC en la SCD, los RBC sanos no se adhieren a los neutrófilos hemo-activados. Además, el tratamiento con DNasa-1 de los neutrófilos hemo-activados degrada el ADN externalizado, y desencadena una reducción concomitante de la adhesión de RBC en la SCD (Figura 1B).

En otros experimentos, el ADN se pro-agrega en individuos con SCD y no en individuos sanos (Figura 2A y 2B). El ADN se pro-agrega en SCD en un estado estable, no durante la VOC (ya máxima) (Figuras 2A y 2B). Esto era evidente particularmente como un incremento en la fuerza que une a los eritrocitos entre sí (conocida como Gamma en Disco mínimo en la Figura 2A). La DNasa-1 es anti-agregante en SCD (Figuras 2A y 2B). El ADN es pro-agregante a pesar del tratamiento de los pacientes con hidroxiurea (HU) (Figuras 2C y 2D). La DNasa-1 es anti-agregante en la sangre de pacientes con SCD durante la VOC, incluso bajo HU (Figuras 2C y 2D). Las micropartículas RBC (MP) inducen crisis vaso-oclusivas dentro de los 5 a 15 minutos (Figura 3). Posteriormente, la administración de DNasa-1 acelera la reperfusión renal, en comparación con los controles (Figura 3).

Referencias

A través de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la cual esta invención pertenece.

Bonnin, P., Sabaa, N., Flamant, M., Debbabi, H., y Tharaux, P.L. 2008. Ultrasound imaging of renal vaso-occlusive events in transgenic sickle mice exposed to hypoxic stress. *Ultrasound Med Biol* 34:1076-1084.

Camus S, Gausserès B, Bonnin P, Loufrani L, Grimaud L, Charue D, De Moraes JA, Renard JM, Tedgui A, Boulanger CM, Tharaux PL, Blanc-Brude OP. 2012. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease *Blood* 120(25):5050-8.

Jen J1, Wu L, Sidransky D (2000). An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann N Y Acad Sci* 906:8-12.

Kunitz (1950), Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J. Gen. Physiol.* 33:349-362.

Kunitz (1950), Crystalline desoxyribonuclease; digestion of thymus nucleic acid; the kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.* 33:363-377.

- Kurnick (1950). The determination of desoxyribonuclease activity by methyl green application to serum. *Arch. Biochem.* 29:41-53.
- Labarce & Paiden (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102:344-352.
- 5 Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, Vlassov VV, Laktionov PP (2012). Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther* 12 Suppl 1:S141-53.
- Sabaa, N., de Franceschi, L., Bonnin, P., Castier, Y., Malpedi, G., Debbabi, H., Galaup, A., Maier-Redelsperger, M., Vandermeersch, S., Scarpa, A., et al. 2008. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse mode of sickle-cell disease. *J Clin Invest* 118:1924-1933.
- 10 Schimmel M1, Nur E, Biemond BJ, van Mierlo GJ, Solati S, Brandjes DP, Otten HM, Schnog JJ, Zeerleder S; Curama Study Group (2013). Nucleosomes and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Haematologica* 98(11):1797-803.
- Sinicropi D1, Baker DL, Prince WS, Shiffer K, Shak S (1994). Colorimetric determination of DNase I activity with DNA-methyl green substrate. *Anal. Biochem.* 222:351-358.
- 15 Stroun M1, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P (2001). Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cell? *Ann N Y Acad Sci* 945:258-64.
- Vasavda N, Ulug P, Kondaveeti S, Ramasamy K, Sugai T, Cheung G, Rees DC, Awogbade M, Bannister S, Cunningham J, Menzel S, Thein SL (2007). Circulating DNA: a potential marker of sickle cell crisis. *Br J Haematol* 139(2):331-6.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Una DNasa para usar en un método para el tratamiento curativo de una crisis vaso-oclusiva en un sujeto que padece la enfermedad drepanocítica.
- 5 2. La DNasa para usar según la reivindicación 1 en donde el sujeto padece la enfermedad drepanocítica homocigótica, la enfermedad de hemoglobina C drepanocítica doble heterocigótica o β -talasemia.
3. La DNasa para usar según la reivindicación 1 para mejorar la reperusión tisular con sangre en tejido del pulmón, riñón, corazón, o cerebro.
4. La DNasa para usar según la reivindicación 4 en donde la DNasa es una DNasa-I (EC 3.1.21.1) o una DNasa-II (EC 3.1.22.1).
- 10 5. La DNasa para usar según la reivindicación 4 en donde la DNasa es de origen humano y preferiblemente es una DNasa humana recombinante.

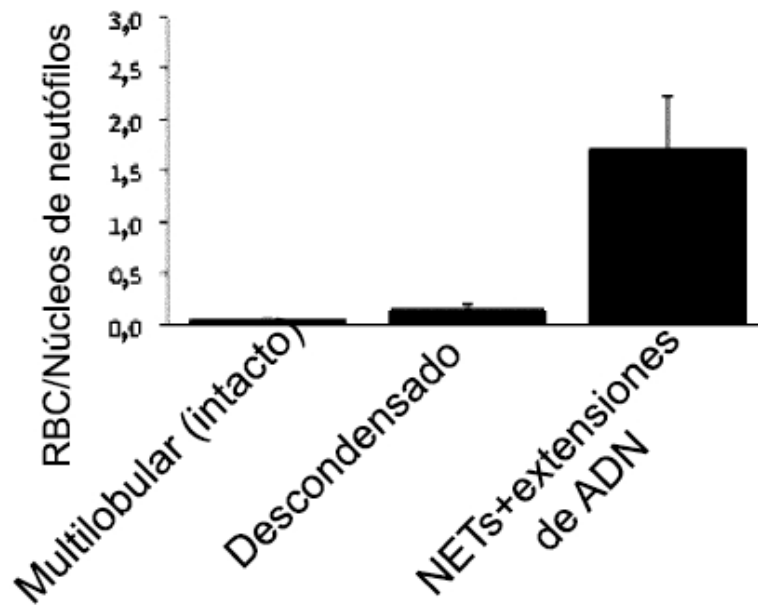


Figura 1A

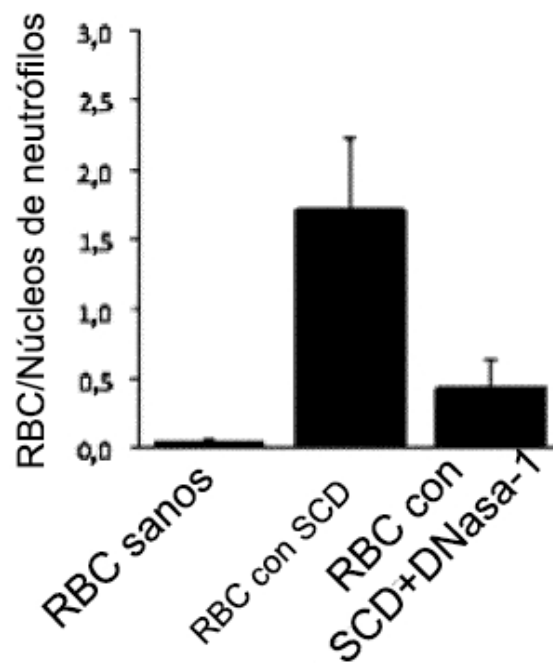


Figura 1B

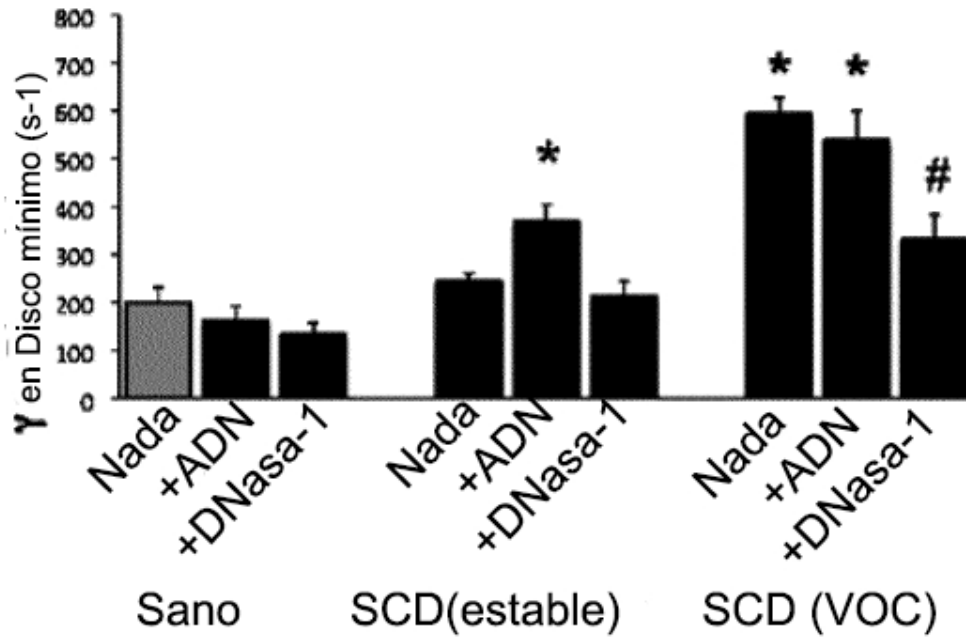


Figura 2A

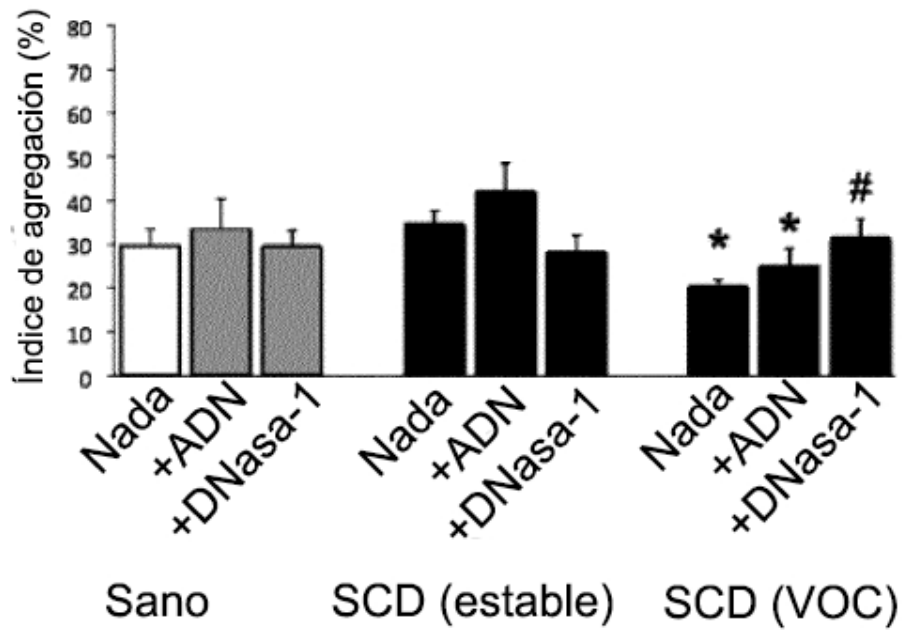


Figura 2B

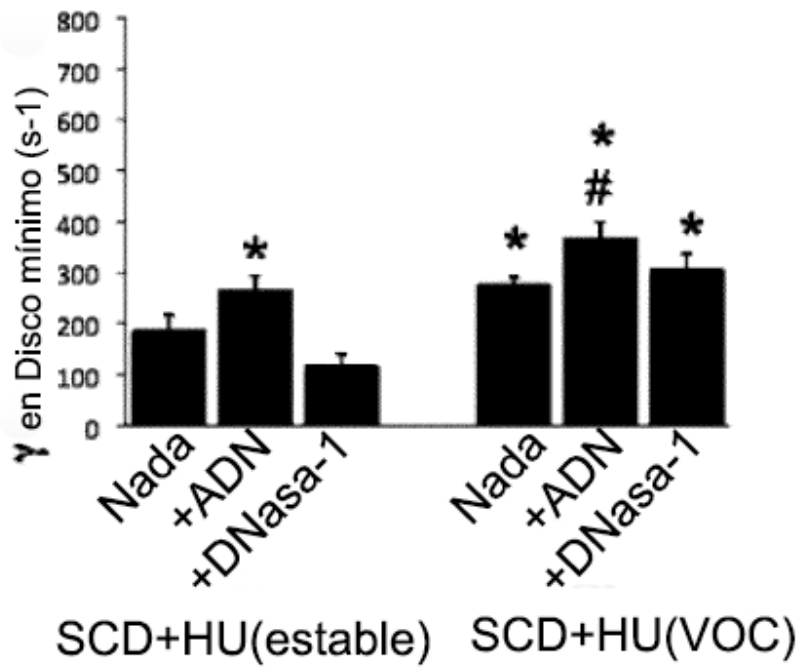


Figura 2C

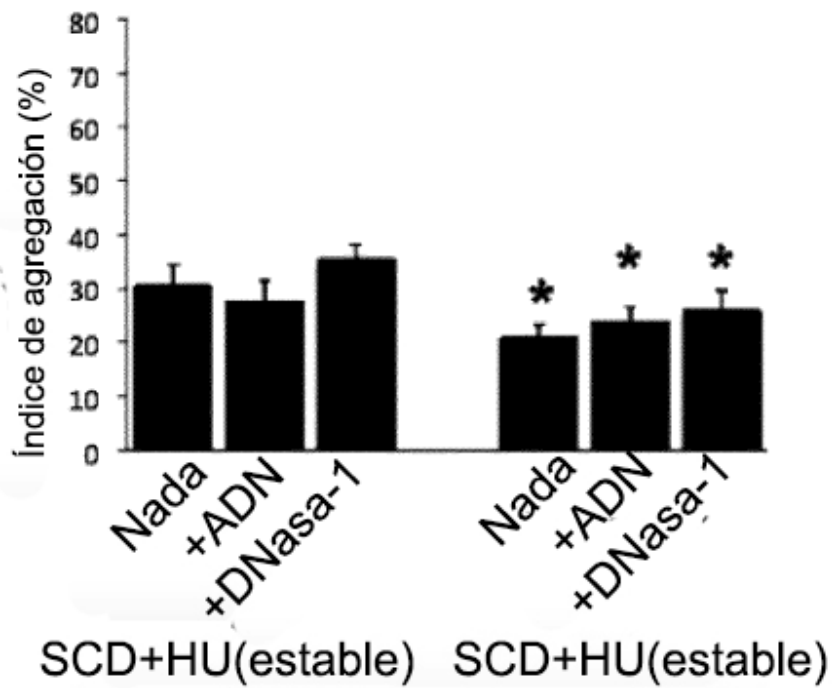


Figura 2D

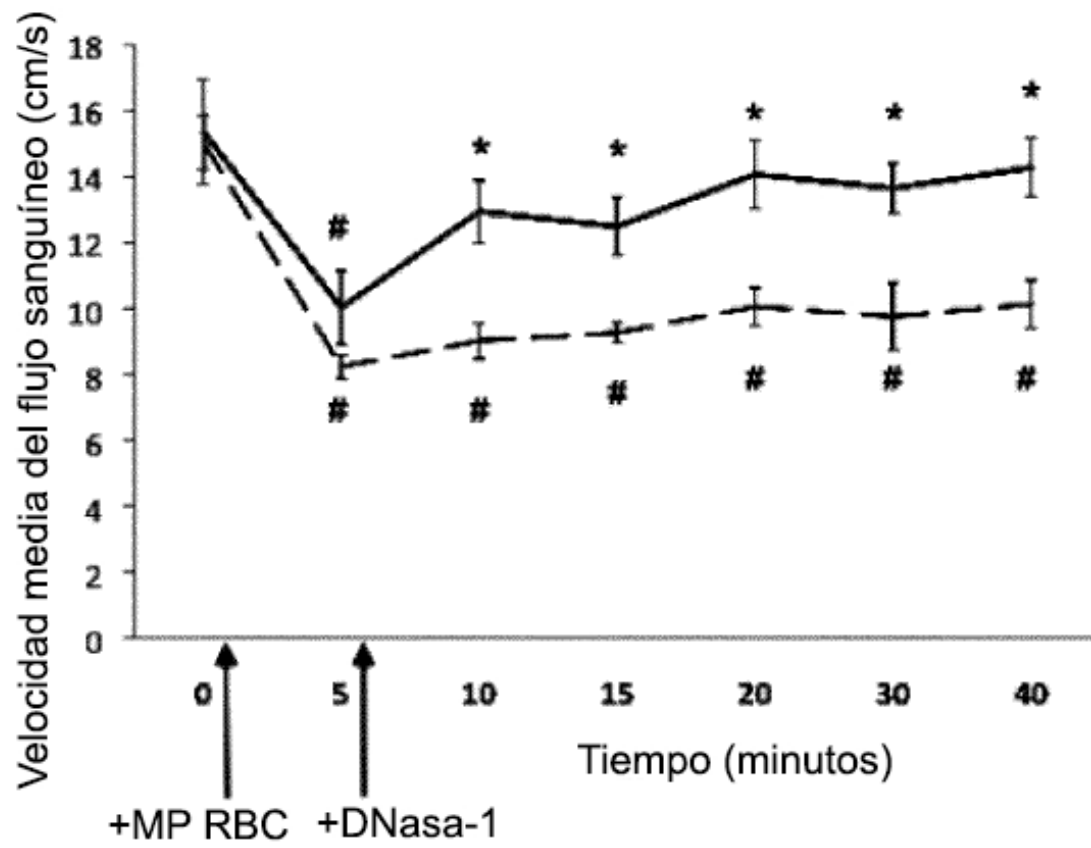


Figura 3