

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 515**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46	(2006.01)
A61P 25/16	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
A61K 47/61	(2007.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61P 25/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2016 PCT/RU2016/000284**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16190780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2016 E 16800375 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3297657**

54 Título: **ADN extracelular como una diana terapéutica en la neurodegeneración**

30 Prioridad:
22.05.2015 US 201562165255 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2020

73 Titular/es:
**GENKIN, DMITRY DMITRIEVICH (33.3%)
Konstantinovsky pr., 26-1
St.Petersburg, 197110, RU;
TETS, GEORGY VIKTOROVICH (33.3%) y
TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH (33.3%)**

72 Inventor/es:
**GENKIN, DMITRY DMITRIEVICH;
TETS, GEORGY VIKTOROVICH y
TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH**

74 Agente/Representante:
**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 799 515 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

ADN extracelular como una diana terapéutica en la neurodegeneración

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N.º 62/165.255, presentada el 22 de mayo de 2015.

10 Campo de la invención

La invención se refiere al uso de la enzima desoxirribonucleasa (ADNasa) para inhibir la progresión y para la prevención y tratamiento de la neurodegeneración.

15 Antecedentes de la invención

La neurodegeneración es una afección patológica clínica aparte con pérdida progresiva de la estructura y/o función neuronal, que incluye la muerte de neuronas. Las rutas moleculares que conducen a la neurodegeneración son altamente específicas de la enfermedad (por ejemplo, acumulación de proteínas beta-amiloides plegadas anormalmente y de proteínas tau en pacientes de la enfermedad de Alzheimer; acumulación de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson; acumulación de Huntingtina mutante en la enfermedad de Huntington; acumulación de los agregados de proteína TDP-43 y FUS en la esclerosis lateral amiotrófica (ALS; del inglés, Amyotrophic Lateral Sclerosis); acumulación de mutaciones de ADN mitocondrial y mecanismos de división mitocondrial estropeados en el envejecimiento) y dan como resultado la muerte celular neuronal en etapas avanzadas de la progresión de la enfermedad. La muerte celular programada, incluyendo la apoptosis, parece jugar un papel clave en la progresión de la neurodegeneración en una etapa de la enfermedad tardía, como se demostró por estudios sobre modelos animales y líneas celulares (Radi E., et al., J Alzheimers Dis. 2014; 42).

Las enfermedades que implican síntomas clínicos referidos a la neurodegeneración afectan a casi 30 millones de individuos y conducen a discapacidad y muerte. La neurodegeneración normalmente conduce a la disfunción progresiva del sistema nervioso y se asocia a menudo con la atrofia de estructuras centrales o periféricas afectadas del sistema nervioso. La neurodegeneración se asocia con un gran grupo de afecciones neurológicas con expresiones clínicas y patológicas heterogéneas que afectan a subgrupos específicos de neuronas en sistemas anatómicos funcionales específicos. A continuación, se presenta la lista no limitativa de trastornos en la que la neurodegeneración tiene un impacto considerable en el cuadro clínico y patológico:

- Enfermedad de Alzheimer
- Demencia senil similar al Alzheimer
- Enfermedad de Pick (atrofia lobular)
- Enfermedad de Huntington
- Atrofia multisistémica que combina demencia con ataxia y/o manifestaciones de la enfermedad de Parkinson
- Parálisis progresiva supranuclear (Steel-Richardson-Olszewski)
- Enfermedad difusa con cuerpos de Lewy
- Degeneración corticodentatonigral
- Enfermedad de Hallervorden-Spatz
- Epilepsia mioclónica familiar progresiva
- Parálisis agitante (enfermedad de Parkinson)
- Degeneración estriatonigral
- Parálisis supranuclear progresiva
- Distonía de torsión (espasmo de torsión; distonía muscular deformante)
- Tortícolis espasmódica y otras disquinesias
- Temblor familiar
- Síndrome de Gilles de la Tourette
- Degeneración cortical cerebelar
- Atrofia olivopontocerebelosa (OPCA; del inglés, Olivopontocerebellar atrophy)
- Degeneración espinocerebelar (ataxia de Friedreich y trastornos relacionados)
- Síndrome del fallo del sistema nervioso autónomo central (síndrome de Shy-Drager)
- Esclerosis lateral amiotrófica
- Atrofia muscular espinal
- Esclerosis lateral primaria
- Paraplejía espástica hereditaria
- Atrofia muscular peroneal (Charcot-Marie-Tooth)
- Polineuropatía intersticial hipertrófica (Dejerine-Sottas)
- Diversas formas de neuropatía progresiva crónica
- Degeneración pigmentaria de la retina (retinitis pigmentosa)
- Atrofia óptica hereditaria (enfermedad de Leber)

- Trastorno bipolar
- Epilepsia
- Migraña
- Esquizofrenia.

5 Tradicionalmente, las búsquedas de nuevas modalidades terapéuticas para la neurodegeneración se centraron en la modulación de las rutas moleculares dentro de las células neuronales, para evitar la muerte celular neuronal y para mejorar la funcionalidad de las células neuronales. Los activadores de histona acetiltransferasa (documento US 20150119466), inhibidores de proteínquinasa 5 dependiente de ciclina (documento US 20150119348), miméticos de neurotrofina (documento US 20150111903), bloqueadores semaforina-4D (documento US 20150110800), inhibidores de prostaglandina E sintasa-1 microsomal (documento US 20150087646), inhibidores del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), se han propuesto como agentes útiles para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos. El inhibidor del receptor de NMDA memantina se ha utilizado clínicamente para el tratamiento de muchos trastornos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades de Parkinson y Huntington. La memantina también resulta prometedora como tratamiento para otras enfermedades asociadas con la activación excesiva del receptor de NMDA en el sistema nervioso central (SNC; en inglés, CNS), incluyendo glaucoma, esclerosis múltiple, epilepsia y dolor neuropático (J. Johnson et al., Current Opinion in Pharmacology, 2006, V6, págs. 61-67).

20 Los ácidos nucleicos de circulación extracelular (también denominados "libres de células") se descubrieron hace más de 60 años (Anker P., Circulating DNA in plasma or serum, Clin Chim Acta. 2001; 313(1-2): 143-6). Los niveles de ADN en muestras de plasma normales son bastante bajos con concentraciones que varían de 3,6 a 5,0 ng/ml. Las muestras de plasma normal contienen principalmente fragmentos de ADN de aproximadamente 180 pb y en mucha menor medida, fragmentos mayores (por ejemplo, fragmentos de 500 pb o mayores). El ADN extracelular circulante se ha descrito como una diana terapéutica en diversas enfermedades y afecciones, incluyendo el cáncer, infección, diabetes, hipersensibilidad de tipo retardada y fertilidad (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N°. 8.916.151; 8.871.200; 8.796.004; 8.710.012; 8.535.663; 8.431.123; 8.388.951; 7.612.032; PCT/IL2007/001250; PCT/IB2013/056321).

30 Sumario de la invención

Tal como se ha descrito en la sección anterior de Antecedentes, hay una gran necesidad en la técnica de desarrollar nuevas composiciones y métodos para tratar la neurodegeneración. La presente invención aborda esta y otras necesidades proporcionando composiciones y métodos basados en la enzima ADNasa.

35 Específicamente, en un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir, tratar y/o inhibir la progresión de la neurodegeneración (por ejemplo, la neurodegeneración primaria) en un paciente que lo necesita (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un modelo experimental animal), que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima ADNasa.

40 En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una enzima ADNasa para utilizar en la prevención, tratamiento y/o inhibición de la progresión de la neurodegeneración (por ejemplo, la neurodegeneración primaria).

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un uso de una enzima ADNasa para prevenir, tratar y/o inhibir la progresión de la neurodegeneración en un paciente que lo necesita.

50 En una realización, la neurodegeneración se asocia con un nivel incrementado de ADN extracelular (por ejemplo, procariótico y/o humano) en sangre o en líquido cefalorraquídeo o en intestino del paciente, cuyo nivel es más elevado que el del nivel de control (por ejemplo, el nivel de ADN extracelular en líquido cefalorraquídeo o en sangre o en intestino de un individuo de la misma edad sano o un nivel promedio de ADN extracelular en sangre o en líquido cefalorraquídeo o en intestino de varios individuos de la misma edad sanos). En una realización, la neurodegeneración se asocia con un trastorno neurodegenerativo. Entre los ejemplos no limitativos de los trastornos neurodegenerativos abarcados se incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío), enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington. En una realización, la neurodegeneración se asocia a disfunción del sistema nervioso tal como, por ejemplo, la esquizofrenia o el trastorno bipolar.

60 En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima ADNasa es suficiente para destruir dicho ADN extracelular (por ejemplo, es suficiente para disminuir el peso molecular promedio de dicho ADN extracelular [por ejemplo, como se midió mediante electroforesis en gel]) en sangre o en líquido cefalorraquídeo o en intestino del paciente.

65 En una realización, dicha ADNasa es una ADNasa recombinante. En una realización, dicha ADNasa es una ADNasa I. En una realización, dicha ADNasa tiene una semivida prolongada (por ejemplo, se conjuga con ácido polisialílico o está protegida de la unión a actina mediante la modificación del sitio de unión a actina; véase, por ejemplo, Gibson et

al., (1992) J. Immunol. Methods, 155, 249-256).

En una realización, dicha ADNasa se administra por ruta intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una realización específica, dicha ADNasa es ADNasa I y se administra en la cantidad de al menos 0,04 mg por kg por día o 0,05 - 10000 unidades Kunitz por kg por día durante al menos un día.

En otra realización, dicha ADNasa se administra de forma enteral (por ejemplo, oral). En una realización específica, dicha ADNasa es ADNasa I y se administra en la cantidad de al menos 0,04 mg por kg por día o 0,05 - 10000 unidades Kunitz por kg por día durante al menos un día.

En todavía otra realización, dicha ADNasa se administra en el líquido cefalorraquídeo. En una realización específica, dicha ADNasa es una ADNasa I y se administra en la cantidad de al menos 0,1 mg por día.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia en la descripción, reivindicaciones y dibujos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la acumulación de ADN extracelular marcado en parénquima cerebral de rata tras su inyección en la arteria carótida.

La **Figura 2** muestra electroforegramas de ADN extracelular de sangre de un paciente antes de la administración de ADNasa (columna izquierda) y un mes después del comienzo del tratamiento con ADNasa (columna derecha). Las **Figuras 3A-B** son imágenes de IRM (en inglés, MRI) T1 que muestran la atrofia y la gliosis extensa de la región frontoparietal izquierda en el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer grave. Las imágenes **(A)** y **(B)** representan la pérdida de volumen en la enfermedad de Alzheimer en etapa terminal con cambios leves en la materia blanca periventricular. **(A)** IMR T1 coronal que muestra una atrofia cortical progresiva marcada de las regiones parietales. **(B)** IMR T1 transversa que muestra una atrofia bilateral marcada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en un descubrimiento inesperado de que el ADN extracelular (tanto eucariótico como procarriótico) está presente en niveles elevados en sangre y en líquido cefalorraquídeo (LCR; en inglés, CSF) de pacientes que sufren neurodegeneración (por ejemplo, neurodegeneración asociada con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, esquizofrenia y trastorno bipolar) y que dicho ADN extracelular atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE; en inglés, BBB) y ejerce toxicidad neuronal. Como se demuestra adicionalmente en el presente documento, la administración de enzimas ADNasa da como resultado un tratamiento/mejoría de la neurodegeneración y se acompaña por la reducción del nivel de ADN extracelular circulante.

Definiciones

El término "neurodegeneración" se utiliza en el presente documento para referirse a una afección patológica clínica aparte con pérdida progresiva de la estructura y/o función neuronal, que incluye la muerte de neuronas. La neurodegeneración puede ser primaria o secundaria. Entre los ejemplos no limitativos de enfermedades que implican neurodegeneración primaria se incluyen, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (DFT; en inglés, FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), encefalopatía traumática crónica (ETC; en inglés, CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (AMS; en inglés, MSA), degeneración corticobasal (DCB; en inglés, CBD), enfermedad de Pick, atrofia olivopontocerebelosa (OPCA), demencia senil similar al Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva (Steel-Richardson-Olszewski), degeneración corticodentatonigral, enfermedad de Hallervorden-Spatz, epilepsia mioclónica familiar progresiva, degeneración estriatonigral, distonía de torsión (por ejemplo, espasmo de torsión; distonía muscular deformante), tortícolis espasmódica y otras disquinesias, temblor familiar, síndrome de Gilles de la Tourette, degeneración cortical cerebelar, degeneración espinocerebelar (por ejemplo, ataxia de Friedreich y trastornos relacionados), síndrome de Shy-Drager, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica hereditaria, atrofia muscular peroneal (Charcot-Marie-Tooth), polineuropatía intersticial hipertrófica (Dejerine-Sottas), neuropatía progresiva crónica, degeneración pigmentaria de la retina (retinitis pigmentosa) y atrofia óptica hereditaria (enfermedad de Leber). La neurodegeneración secundaria se debe principalmente a la necrosis. Entre los ejemplos no limitativos de las afecciones, que pueden resultar en neurodegeneración secundaria, se incluyen la destrucción de neuronas por neoplasma, edema, hemorragia, ictus, traumatismo, ataque inmune, hipoxia, envenenamiento, defectos metabólicos e infecciones.

Las expresiones "ADN extracelular" y "ADN libre de células" se utilizan de forma intercambiable para referirse a ADN extracelular (de origen eucariota o procarriota) encontrado en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o intestino de un paciente.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "desoxirribonucleasa" y "ADNasa" se utilizan para referirse a cualquier enzima que cataliza la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en el esqueleto de ADN. Se conoce una amplia variedad de desoxirribonucleasas y pueden utilizarse en los métodos de la presente invención. Entre los ejemplos no limitativos de ADNasa útiles se incluyen, por ejemplo, ADNasa I (por ejemplo, ADNasa I recombinante humana o ADNasa I pancreática bovina), análogos de la ADNasa I (tales como, por ejemplo, ADNasa X, ADNasa gamma y DNAS1L2), ADNasa II, fosfodiesterasa I, lactoferrina y acetilcolinesterasa. La ADNasa I escinde ADN preferentemente en los enlaces fosfodiéster adyacentes a un nucleótido de pirimidina, produciendo polinucleótidos terminados en fosfato 5'5' con un grupo hidroxilo libre en la posición 3', produciendo por regla general tetranucleótidos. La ADNasa I actúa sobre ADN monocatenario, ADN bicatenario y cromatina.

El término "aproximadamente" significa, dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de una desviación estándar aceptable, según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta un $\pm 20\%$, preferentemente hasta un $\pm 10\%$, más preferentemente hasta un $\pm 5\%$ y todavía más preferentemente hasta un $\pm 1\%$ de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede querer decir dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro del doble, de un valor. Cuando se describan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique de otra manera, el término "aproximadamente" está implícito y en este contexto significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor en particular.

En el contexto de la presente invención en la medida en que se refiere a la neurodegeneración de cualquiera de las afecciones de enfermedad específica enumeradas en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares, quieren decir que alivian o mitigan al menos un síntoma asociado con tal afección o que ralentizan o revierten la progresión de tal afección. Dentro del sentido de la presente invención, el término "tratar" también indica detener, retrasar el inicio (es decir, el período de manifestación clínica de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollo o empeoramiento de la enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "terapéuticamente eficaz" aplicado a una dosis o cantidad, se refiere a la cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que es suficiente para dar como resultado una actividad deseada tras la administración a un sujeto que lo necesita. Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "terapéuticamente eficaz" se utiliza en conexión con el uso de la desoxirribonucleasa (ADNasa) para prevenir, tratar y/o inhibir la progresión de la neurodegeneración o una enfermedad específica asociada con dicha neurodegeneración, se refiere a una cantidad de ADNasa o una composición farmacéutica que contiene ADNasa que es eficaz para aliviar o mitigar al menos un síntoma asociado con la neurodegeneración o tal enfermedad o ralentizar o revertir la progresión de la neurodegeneración de tal enfermedad. Obsérvese que cuando se administra una combinación de ingredientes activos (por ejemplo, una combinación de ADNasa y otro compuesto eficaz para prevenir, tratar y/o inhibir la progresión de una enfermedad asociada con la neurodegeneración) la cantidad eficaz de la combinación puede o no incluir cantidades de cada ingrediente que serían eficaces si se administraran individualmente.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en conexión con composiciones de la invención, se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son tolerables fisiológicamente y que no producen típicamente reacciones adversas cuando se administran a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un humano). Preferentemente, como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que se ha aprobado por un organismo de control del gobierno federal o estatal o que está en la lista de la Farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en mamíferos y más particularmente, en seres humanos.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier mamífero. En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

Como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Según la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de farmacología y biología molecular dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en el presente documento, "Sambrook *et al.*, 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription and Translation* (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); entre otros.

Métodos terapéuticos de la invención

5 Como se demuestra en la sección de Ejemplos, más adelante, el nivel de ADN extracelular tanto eucariótico como procariótico en sangre y en líquido cefalorraquídeo (LCR) se incrementa con el empeoramiento del estado neurológico en pacientes con demencia senil, enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Como se demuestra adicionalmente en el presente documento, una gran parte de ADN extracelular en sangre y LCR es ADN bacteriano intestinal (por ejemplo, derivado de la microbiota gastrointestinal). Por lo tanto, la monitorización de ADN extracelular de origen eucariota y procariota puede ser útil para la prognosis o la monitorización de la progresión de la neurodegeneración. La monitorización puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: determinación de la cantidad de ADN extracelular, determinación del tipo de ADN extracelular (procariótico o eucariótico, por ejemplo, determinado basándose en ARNr), determinación de la presencia y/o cantidad de fragmentos de ADN específicos (por ejemplo, motivos CpG, motivos similares a CpG, regiones hiperconservadoras de 16S, rpoD, por ejemplo, determinados utilizando RT-PCR o análisis metagenómicos).

15 Como se describe adicionalmente en el presente documento, el ADN extracelular de intestino, sangre y LCR de pacientes que sufren de trastornos neurodegenerativos puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Esto resulta inesperado, dado que el BHE se ha considerado siempre como impermeable para moléculas de ácidos nucleicos grandes (Evers MM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. Adv Drug Deliv Rev. 2015).

20 Como se describe adicionalmente en el presente documento, el ADN extracelular de intestino, sangre y LCR de pacientes que sufren de trastornos neurodegenerativos provoca la muerte de células neuronales y apoptosis. El tratamiento con ADNasa que destruye tal ADN extracelular mejora considerablemente la función del sistema nervioso en estos pacientes. La evaluación de la mejoría se realizó según criterios de diagnóstico clínico ampliamente aceptados de declive cognitivo tales como MMSE, PANSS, función física y/o actividades funcionales (véase, por ejemplo, Holmes et al., (1999) The British Journal of Psychiatry, 174(1), 45-50; Os et al., (2006) Acta Psychiatrica Scandinavica, 113(2), 91-95; O'Shea et al., (2002) Physical therapy, 82(9), 888-897; Rochester et al., (2004) 85(10), 1578-1585).

30 En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir, tratar y/o inhibir la progresión de la neurodegeneración en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho método en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima ADNasa (por ejemplo, ADNasa I, análogos de la ADNasa I [tales como, por ejemplo, ADNasa X, ADNasa gamma, DNAS1L2], ADNasa II, fosfodiesterasa I, lactoferrina o acetilcolinesterasa), en la que dicha cantidad de enzima ADNasa es eficaz para prevenir o mejorar al menos un síntoma de la neurodegeneración.

35 Las dosis de ADNasa útiles en los métodos de la invención dependen de la gravedad y curso de la neurodegeneración, terapia previa o concomitante, la historia clínica del paciente y la respuesta a la ADNasa, así como a discreción del médico tratante. Preferentemente, tales dosis están en el intervalo de 0,5 a 20 mg/kg/día o de 500 a 20000 unidades Kunitz (KU)/kg/día.

40 La administración de una enzima ADNasa según los métodos de la invención se puede realizar mediante cualquier ruta adecuada. Entre los ejemplos no limitativos de rutas de administración útiles se incluye la intravenosa, subcutánea, intramuscular, suministro en líquido cefalorraquídeo (LCR), enteral (por ejemplo, oral), rectal (por ejemplo, mediante enema) e intranasal.

45 Según los métodos de la invención, la ADNasa se puede administrar sola o junto con otros tratamientos útiles para inhibir la progresión o tratar las enfermedades neurodegenerativas u otras disfunciones del sistema nervioso abarcadas (por ejemplo, trastorno bipolar, migraña, esquizofrenia, epilepsia). Entre los ejemplos no limitativos de tales tratamientos adicionales se incluyen, por ejemplo, activadores de histona acetiltransferasa, inhibidores de proteínquinasa 5 dependiente de ciclina, miméticos de neurotrofina, bloqueadores de semaforina-4D, inhibidores de prostaglandina E sintasa-1 microsomal, levodopa e inhibidores del receptor de N-metil-d-aspartato (NMDA) (por ejemplo, memantina).

Composiciones farmacéuticas de la invención

55 En ciertas realizaciones, una enzima ADNasa se puede formular en una composición farmacéutica con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Las formulaciones utilizadas en los métodos de la invención se pueden presentar de manera conveniente en forma de administración unitaria y se pueden preparar mediante los métodos conocidos en la técnica. La cantidad de principios activos que se pueden combinar con un material de vehículo para producir una forma de administración única variará dependiendo del sujeto a tratar y del modo particular de administración. La cantidad de ingredientes activos que se pueden combinar con un material de vehículo para producir una forma de administración única será habitualmente esa cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

65 En general, las formulaciones se pueden preparar con un vehículo líquido o con un vehículo sólido dividido finamente o con ambos y después, si es necesario, dándole forma al producto.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender la ADNasa junto con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Entre los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se incluyen el agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas inyectables de depósito se pueden generar formando matrices de microencapsulación de uno o más principios activos en polímeros biodegradables tales como la polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de principio activo respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del principio activo. Entre los ejemplos de otros polímeros biodegradables se incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o mediante microemulsiones que con compatibles con el tejido corporal.

Las formulaciones para administración oral pueden ser en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso (por ejemplo, como un colutorio, como una composición para que sea tragada o como un enema) o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite y similares, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada de uno o más principios activos.

En formas sólidas de administración para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más principios activos (por ejemplo, ADNasa y opcionalmente otro compuesto para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa) se puede(n) mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardadores de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcillas de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tamponadores. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares.

Las suspensiones, además de uno o más principios activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

Las composiciones de ADNasa de la invención pueden comprender agentes adicionalmente, que facilitan la entrega de ADNasa a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Entre los ejemplos no limitativos de tales agentes útiles se incluyen, por ejemplo, un reservorio implantable (reservorio Omayá), polisialación de ADNasa, nanovehículos funcionalizados (por ejemplo, nanopartículas revestidas con anticuerpos de transferrina o de receptores de transferrina [TR]), exosomas, liposomas (por ejemplo, liposomas revestidos con moléculas dirigidas tales como anticuerpos, liposomas de caballos de Troya [THL; del inglés, Trojan Horses Liposomes]), anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti receptor de transferrina [TR] o receptor de insulina [HIR], anticuerpos de dominio único de Llama que transmigran la BHE (sdAb)), péptidos quiméricos (por ejemplo, Angiopeps derivado de proteínas que expresan el dominio Kunitz), proteínas 1 y 2 relacionadas con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1 y 2), receptor de toxina diftérica (DTR), células madre mesenquimatosas, proteína asociada a receptores, apolipoproteína E, melano transferrina/p97, etc.

65 Ejemplos

La presente invención también se describe y demuestra por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier sitio en la memoria descriptiva es solo ilustrativo y no limita de ninguna manera el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. De manera análoga, la invención no se limita a cualquier realización preferida concreta descrita aquí. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la materia tras leer esta memoria descriptiva y dichas variaciones se pueden realizar sin apartarse de la invención en espíritu o alcance. La invención se limita por tanto solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance total de los equivalentes a los cuales tienen derecho dichas reivindicaciones.

10 Ejemplo 1. El ADN circulante extracelular de sangre y BHE promueve la muerte de células neuronales

Para los cultivos neuronales, se extrajeron las cortezas cerebrales a partir del día embrionario (E) 15-17 de embriones de rata Sprague Dawley. Los explantes corticales se diseccionaron en piezas de aproximadamente 200-400 µm² utilizando agujas finas y se disociaron en el sistema de disociación Papain (Worthington Biochemicals) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se mantuvieron además en medio esencial mínimo helado (Gibco). Las neuronas se situaron en cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro revestidos primero con poli-D-lisina (10 µg/ml en PBS) seguido de laminina (10 µg/ml en PBS) (Gibco) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada 8 % CO₂ (v/v) durante 24-48 h en medio Neurobasal con 1 % (v/v) de Antibiótico-Antimicótico (Gibco).

Se extrajo el ADN extracelular de plasma y BHE de un paciente en una etapa grave de la enfermedad de Alzheimer utilizando un kit de ácidos nucleicos circulantes QIAamp de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evaluar el efecto biológico de tal ADN extracelular sobre las neuronas, se añadieron muestras de ADN extracelular a cultivos neuronales corticales. La muerte de células neuronales se determinó en neuronas corticales disociadas cultivadas durante 48 horas. Tras el periodo inicial, se aplicaron las muestras de ADN extracelular (niveles de dosis de 100 y 200 mkg/ml) durante 24 h adicionales. La muerte de células neuronales se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega). Se midió la luminiscencia proporcional al número de células muertas utilizando un luminómetro GloMax 96 de Promega y se expresó en unidades de luminiscencia relativas (RLU; del inglés, relative luminescence units).

La inducción del marcador de apoptosis caspasa 3 se determinó en neuronas corticales disociadas cultivadas durante 48 horas. Tras el periodo inicial, se aplicaron las muestras de ADN extracelular (niveles de dosis de 100 y 200 mkg/ml) durante 24 h adicionales. A continuación, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo caspasa 3 escindido (Abcam) diluido 1:500 en PBS. Las células se lavaron e incubaron durante 1 hora con anticuerpos Alexa Fluor 488 policlonales de cabra anticonejo para caspasa 3 (Invitrogen) en PBS antes del lavado y el recuento.

Tabla 1

	ADN extracelular 0		ADN extracelular 100 mkg/ml		ADN extracelular 200 mkg/ml	
	RLU	% Caspasa positiva	RLU	% Caspasa positiva	RLU	% Caspasa positiva
ADN extracelular (sangre)	1 100	3 %	4 650	10 %	12 700	32 %
ADN extracelular (LCR)	700	6 %	6 250	15 %	9 100	25 %
ADN extracelular (sangre) + ADNasa I* (5 mkg/ml)	900	2 %	2 300	5 %	3 200	9 %
ADN extracelular (LCF) + ADNasa I* (5 mkg/ml)	1050	3 %	1 700	8 %	4 500	7 %

*La ADNasa I utilizada fue DNASE 1 recombinante humana fabricada por Catalent (Madison, EE.UU.).

A partir de los datos de la Tabla 1, se deduce que el ADN extracelular tanto de sangre como de LCR induce citotoxicidad y la regulación al alza del marcador de apoptosis de la caspasa 3 en neuronas cultivadas, en una forma dependiente de la dosis. La ADNasa I protege a las neuronas de la toxicidad inducida por el ADN extracelular.

Ejemplo 2. Evaluación de ADN extracelular bacteriano en sangre y LCR de un paciente con enfermedad de Alzheimer

Se extrajo el ADN extracelular de plasma y de BHE de un paciente en una etapa grave de la enfermedad de Alzheimer y de un voluntario sano (de la misma edad y sexo) utilizando un kit de ácidos nucleicos circulantes QIAamp de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN extracelular bacteriano se realizó utilizando un sistema de detección CFX96 Touch™ de PCR en tiempo real. Los inventores han utilizado para la PCR los cebadores universales bacterianos de ADN 1369F y 1492R (ARNr 16S bacteriano).

1369F (SEQ ID NO: 1)	CGGTGAATACGTTTCYCGG
1492R (SEQ ID NO: 2)	GGWTACCTTGTTACGACTT

Los ciclos umbral se presentan en la tabla, a continuación:

Tabla 2

Grupo	Muestra	Cq
Enfermedad de Alzheimer	Suero	16,45
	LCR	18,10
Voluntarios sanos	Suero	31,12
	LCR	29,09

5 Como se deduce de los datos de la tabla 2, el suero y el LCR de un paciente en una etapa grave de la enfermedad de Alzheimer contiene considerablemente más ADN bacteriano en comparación con un voluntario sano.

10 Ejemplo 3. El ADN extracelular circulante de sangre penetra la barrera hematoencefálica

10 El ADN extracelular se extrajo de plasma de un paciente diagnosticado con demencia senil utilizando el kit de ácidos nucleicos circulantes QIAamp. Se realizó la iodización del ADN extracelular utilizando el reactivo Iodo-Gen como está descrita (Piatyszek A., et al., Analytical Biochemistry, 1988, V172, págs. 356-359). La actividad específica del ADN extracelular marcado fue de aproximadamente 30 mkCi/mkg. La preparación de ADN extracelular marcado en 1 ml de solución de PBS (3,0 mkCi, 100 ng, aprox.) se infundió lentamente (0,1 ml/mn) en la arteria carótida de una rata Sprague Dawley hembra anestesiada. En una hora, la rata se sacrificó con cloroformo, se extrajo el cerebro y se fijó en solución de formalina. Las secciones de parafina se tiñeron con emulsión Ilford L4. La acumulación del ADN extracelular marcado en el cerebro se estudió utilizando la técnica histoautorradiográfica visual estándar (Figura 1). La acumulación del ADN extracelular inyectado en el parénquima cerebral de rata indica que penetra la barrera hematoencefálica (BHE).

20 Ejemplo 4. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la demencia senil

25 Paciente K., edad 72, varón que fue diagnosticado de demencia senil hace 4 años con desarrollo gradual de bradiquinesia, deterioro de la memoria a corto plazo y de la atención. Los síntomas siguientes fueron progresando de forma gradual: espontaneidad, falta de iniciativa, inestabilidad emocional, somnolencia. El paciente ha estado tomando levodopa durante 3 años. Se observó un efecto positivo moderado. Sin embargo, durante los últimos 18 meses anteriores, los síntomas se han vuelto más pronunciados, además de que empezaron a manifestarse hipoquinesia y trastornos posturales.

30 Se administró al paciente ADNasa I pancreática bovina (Samson Med, Rusia) en una cantidad de 2500 unidades Kunitz/kg tres veces al día oralmente en cápsulas. La efectividad del tratamiento con ADNasa se evaluó utilizando la escala del minexamen de estado mental (MMSE; del inglés, minimental state examination scale) tras 14 y 30 días. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Puntos de la escala MMSE		
D0	D14	D30
16	19	23

40 El ADN plasmático de sangre humana del paciente se cuantificó utilizando en ensayo de PCR en tiempo real (RT-PCR) para tres secuencias de marcadores diferentes: ALU (J1), c-MYC y b-GLOB (el cebador de ALU fue GTCAGGAGATCGAGACCATCCC (SEQ ID NO: 3), el cebador de c-MYC fue AAACACAACTTGAACAGCTAC (SEQ ID NO: 4), el cebador de b-GLOB fue GGTGGCCAATCTACTCCAGG (SEQ ID NO: 5), dos meses antes del tratamiento con ADNasa y justo antes del inicio del tratamiento con ADNasa. Los ciclos umbral se presentan en la tabla, a continuación.

Tabla 4

	ADNlc total		
	Alu	C-myc	β-Glob
- 60 días	14,47±0,109	28,62±0,294	29,49±0,161
Antes de comenzar el tratamiento	14,6±0,012	29,42±0,021	31,86±0,817

En la Figura 2 se presentan los electroforegramas de ADN extracelular de sangre del paciente antes del tratamiento con ADNasa (columna izquierda) y un mes después del comienzo del tratamiento (columna derecha).

50 Como se demostró anteriormente, la progresión de los síntomas clínicos en un paciente con demencia senil se acompaña de la elevación del nivel de ADN extracelular circulante en sangre. El tratamiento de ADNasa que destruye ADN extracelular de sangre tiene un efecto clínico positivo sobre los síntomas de demencia.

Ejemplo 5. Alivio de la exacerbación del trastorno bipolar utilizando ADNasa

Paciente: M., edad 63, varón. Diagnóstico: enfermedad primaria - exacerbación del trastorno bipolar, episodio maníaco. Al comienzo del tratamiento, se quejó de estar irritable, de tener deseo de gritar, pesadillas. El examen reveló que el paciente estaba muy activo, podía dejar la habitación de pronto, manifestaba desinhibición (preguntaba constantemente, empezaba a cantar a menudo) e irritabilidad (se irritaba fácilmente por las preguntas repetitivas).

Antes del inicio del tratamiento con ADNasa, la puntuación total de evaluación utilizando el componente de excitación de la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS-EC; del inglés, Excited Component of the Positive and Negative Syndrome Scale) ascendió a 29. El paciente recibió una inyección única de ADNasa I recombinante humana (Catalent, Madison, EE.UU.) en la cantidad de 50 unidades Kunitz/kg durante 3 horas. Tras el tratamiento con ADNasa, se observó una mitigación considerable de los síntomas, la puntuación total de PANSS-EC ascendió a 8, no se observó agitación psicomotora.

Por tanto, la administración de ADNasa tiene un efecto positivo cuando se trata la exacerbación del trastorno bipolar.

Ejemplo 6. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la esquizofrenia

Paciente: L. edad 38, mujer. Diagnóstico: esquizofrenia, tipo paranoide, curso paroxístico de la enfermedad, síndrome paranoide-alucinatorio. Antes del tratamiento con ADNasa, la paciente se quejaba de escuchar voces "dentro de su cabeza", también creía que sus compañeros intentaban envenenarle. La paciente se sentaba en una postura antinatural, se observó también un temblor pronunciado de las extremidades superiores, el temblor remitía con el movimiento. Se descubrieron trastornos emocionales, así como trastornos de pensamiento (pensamiento lento, descarrío, falta de lógica). La puntuación total de evaluación utilizando la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS) ascendió a 24 y 22, respectivamente.

La paciente comenzó tomando ADNasa I pancreática bovina (Samson Med, Rusia) en una cantidad de 3000 unidades Kunitz (KU)/kg tres veces al día oralmente en cápsulas. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Grupo	Puntuación según la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS)	
	Escala de síntomas positivos, puntuación total ± desviación estadística	Escala de síntomas negativos, puntuación total ± desviación estadística
Antes del tratamiento	24	22
El día 2 del tratamiento	13	18
El día 5 del tratamiento	11	13

Por tanto, la administración de ADNasa tiene un efecto positivo cuando se trata la esquizofrenia.

Ejemplo 7. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Paciente G., edad 77, varón. El paciente fue diagnosticado de enfermedad de Alzheimer basándose en datos clínicos y en cambios de IRM. Empezando desde el mes 14 después del diagnóstico, el paciente comenzó tomando Memantine. Sin embargo, los síntomas clínicos continuaron deteriorándose: progresaron los deterioros de memoria, empezaron a manifestarse deterioros del habla y de coordinación, así como la desorientación. En el mes 20 después del diagnóstico, el paciente tenía todos los síntomas mencionados antes progresando y dejó de salir por su cuenta. Para cuando comenzó la administración de ADNasa, el paciente estaba en estupor, también se observaron incontinencia urinaria y fecal.

Se administró ADNasa I pancreática bovina (Samson Med, Rusia) oralmente en cápsulas en una cantidad de 4000 unidades Kunitz/kg tres veces por cada 24 horas. La eficacia se evaluó utilizando la escala del MMSE, 5 y 30 días después del inicio del tratamiento con ADNasa. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

Día de comienzo del tratamiento	Tratamiento	Escala MMSE (puntos)
Antes del tratamiento con ADNasa	Memantine	3
5	ADNasa	15
30	ADNasa	19

El ADN plasmático de sangre humana del paciente se cuantificó utilizando en ensayo convencional de PCR en tiempo real (RT-PCR) para tres secuencias de marcadores diferentes: ALU (J1), c-MYC y b-GLOB (el cebador de ALU fue GTCAGGAGATCGAGACCATCCC (SEQ ID NO: 3), el cebador de c-MYC fue AACACAAACTTGAACAGCTAC (SEQ ID NO: 4), el cebador de b-GLOB fue GGGTGGCCAATCTACTCCAGG (SEQ ID NO: 5) en la fracción total de ADN

extracelular del paciente, un mes antes del tratamiento con ADNasa, justo antes del inicio del tratamiento y 30 días después de inicio del tratamiento con ADNasa. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7.

	ADNc total		
	Alu	C-myc	β -glob
30 días antes del tratamiento con ADNasa	10,52 \pm 0,095	27,32 \pm 0,239	29,07 \pm 0,326
Justo antes del tratamiento con ADNasa	11,72 \pm 0,056	27,86 \pm 0,161	30,2 \pm 0,345
30 días después del tratamiento con ADNasa	10,48 \pm 0,027	26,78 \pm 0,129	29,2 \pm 0,379

5 Ya en el día 5 tras el inicio del tratamiento con ADNasa, se observó una mejoría considerable de las funciones cognitivas. El habla y el pensamiento regresaron a la normalidad, el paciente fue capaz de levantarse, vestirse y salir sin ayuda.

10 Por tanto, la administración de ADNasa tiene un efecto positivo sobre el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El efecto clínico positivo del tratamiento con ADNasa se desarrolla junto con la reducción del nivel del ADN extracelular circulante en la sangre.

15 **Ejemplo 8. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer**

A un varón de 77 años caucásico se le diagnosticó demencia supeditada a la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, 30 meses antes de su presentación en la clínica, mostrando trastornos comportamentales, declive cognitivo y disminución de la capacidad para participar en actividades de la vida diaria. Aproximadamente 14 meses después del diagnóstico inicial, el paciente comenzó el tratamiento con 10 mg de memantina por día (Reisberg et al., N Engl J Med. 2003; 348:1333-1341; Danysz et al., Br J Pharmacol. 2012; 167:324-352), aunque su afección cognitiva continuó deteriorándose, progresando rápidamente hasta incluir tales cambios comportamentales como agresividad y desinhibición, además de un síndrome de amnesia progresiva, afasia, bradiquinesia, caminar arrastrando los pies, pérdida de equilibrio e incontinencia urinaria. Adicionalmente, el paciente experimentó una pérdida de peso de 20 libras, que normalmente es indicativo de un pronóstico malo en pacientes que sufren de enfermedad de Alzheimer (Soto et al., Journal of Alzheimer's Disease (2012) 28:647-654; Soto et al., J Am Geriatr Soc. 2015; 63:651-658; White et al., J Am Geriatr Soc. 1998; 46:1223-1227). El análisis de IRM craneal reveló pérdidas propias de la edad en volumen y cambios leves de la materia blanca periventricular (Figuras 3A-B).

30 Tras trece meses desde el inicio del tratamiento con memantina, las puntuaciones en la escala del miniexamen de estado mental (MMSE) y en la escala de evaluación funcional (FAST; del inglés, Functional Assessment Staging Test) fueron de 10 y 5 puntos, respectivamente. Perdió puntos en orientación temporal y espacial, atención, memoria y construcción visuospacial y el paciente fue notablemente más lento en completar las tareas. El paciente experimentó dificultad adicional para dificultad para sortear curvas y esquinas al caminar, dando como resultado caídas reiteradas y exhibió niveles fluctuantes de conciencia, alterando entre periodos de franca confusión y lucidez. Sin embargo, no experimentó alucinaciones visuales o auditivas.

40 Tres meses más tarde y 16 meses en total tras el inicio del tratamiento con memantina, el paciente experimentó un deterioro adicional de la función cognitiva. El paciente tuvo un nivel de conciencia fluctuante. Su cognición fluctuó entre periodos de franca confusión y lucidez, sin embargo, no experimentó alucinaciones visuales o auditivas. Fue incapaz de recordar su nombre, la fecha del calendario, día de la semana, año o lugar y no pudo reconocer a los miembros de la familia. Entre los deterioros adicionales se incluyeron dificultad para hablar, afasia expresiva, pérdida de control del(la) intestino/vejiga y falta de coordinación marcada por una incapacidad para sentarse, estar de pie o caminar sin asistencia. El paciente dejó de responder a estímulos, con una puntuación del MMSE de 3 y una puntuación de la FAST de 7.

50 Un mes después, los familiares del paciente proporcionaron el consentimiento informado para tratar con 40 mg de ADNasa I recombinante humana (1500 KU/mg; Samson Med, Rusia) proporcionada oralmente 3 veces al día junto con su terapia continuada de memantina (10 mg diariamente). Toleró bien la ADNasa I y no se registraron reacciones adversas o imprevistas.

55 El paciente mostró una mejoría cognitiva considerable en el segundo día de tratamiento con ADNasa, volviendo a orientarse parcialmente en tiempo y espacio y de nuevo reconociendo y recordando los nombres de los miembros de la familia. Adicionalmente, volvió a ser capaz de vestirse por sí mismo, incluyendo atarse los cordones de los zapatos y abrocharse los botones, así como a caminar de forma independiente, alimentarse por sí mismo y utilizar una bicicleta de ejercicio. Las anomalías neurológicas que afectan a la marcha se redujeron considerablemente. Su puntuación del MMSE se incrementó enormemente de 3 a 16 y su puntuación de la FAST se redujo de 7 a 5. Sin embargo, siguió teniendo una puntuación baja en el MMSE en cuanto a las medidas de orientación temporales y espaciales, memoria y construcción visuospacial.

60

Dos meses después del inicio del tratamiento con ADNasa (19 meses tras el inicio con tratamiento de memantina), el paciente presentó una puntuación del MMSE de 18 y una puntuación de la FAST de 4. Se observaron mejorías moderadas en la memoria, aunque la construcción visuospatial continuó decayendo. Fue más capaz de hablar e interactuar con otros, reconocer a familiares y atender a programas de televisión. El paciente fue capaz además de realizar cálculos, tocar el piano, jugar al ajedrez y caminar de manera independiente.

Los datos anteriores demuestran que la administración de ADNasa tiene un efecto positivo sobre el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El tratamiento con ADNasa en el presente caso permitió al paciente apartarse de un estado terminal y tuvo como resultado mejorías considerables en la función cognitiva y conductual, incluyendo la capacidad para caminar y realizar tareas cotidianas con casi independencia. Se observó una recuperación considerable en todas las áreas de la función cognitiva y motora, indicando la posibilidad de una diana sensible a la ADNasa implicada en la generación de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. El ADN libre de células, incluyendo el ADN derivado de bacterias, podría ser tal diana (Holdenrieder et al., Clin Chem. 2005; 51:1544-1546).

15 **Ejemplo 9. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

Paciente S., edad 58, mujer, ha sufrido la enfermedad de Parkinson desde los 7 años. Durante los últimos 5 años ha seguido un tratamiento con levodopa. Un mes antes del estudio, hubo un deterioro considerable en la afección de la paciente, en concreto: incremento considerable del temblor de la mano derecha, aparición de movimientos de manos involuntarios en forma de coreoatetosis generalizada, rigidez de las extremidades, dificultades para levantarse de la cama por la mañanas, micciones nocturnas frecuentes (6-7 veces).

La paciente comenzó tomando ADNasa I pancreática bovina (Samson Med, Rusia) en una cantidad de 1500 unidades Kunitz/kg tres veces al día oralmente en cápsulas. La evaluación se realizó utilizando la escala unificada de valoración de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS; del inglés, unified Parkinson's disease rating scale), la observación se realizó durante 6 meses.

El ADN plasmático de sangre humana de la paciente se cuantificó utilizando en ensayo convencional de PCR en tiempo real (RT-PCR) para la secuencia ALU (TPALU1: GTAAGAGTTCCGTAACAGGACAGCT (SEQ ID NO: 6)) en la fracción total del ADN extracelular de la paciente un mes antes del tratamiento con ADNasa, justo antes del tratamiento y 3 meses después del inicio del tratamiento. Los ciclos umbral se presentan en la tabla 8, a continuación.

Tabla 8.

Tiempo de observación, meses	Cantidad de ADN _{ic} (ALU)	UPDRS (puntos)
0	9,56±0,047	22
1	9,43±0,012	17
3	8,93±0,042	16
12	-	14
24	-	12

En el mes 6 tomando la ADNasa I, se observó una mejoría considerable de la afección de la paciente: la aquinesia matinal, la rigidez de movimientos y el temblor de manos descendieron; el número de micciones nocturnas disminuyó hasta solo una vez por noche.

De ello se deriva que, la administración de ADNasa tiene un efecto positivo sobre el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Este efecto positivo se desarrolla junto con la reducción del nivel del ADN extracelular circulante en la sangre.

Ejemplo 10. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

Los estudios se realizaron sobre ratones con knockout de la enzima SOD1, con hiperexpresión de la proteína G93A-hSOD1, que es un modelo aceptado habitualmente de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Gurney, New England Journal of Medicine (1994) 331: 1721-1722). Se formaron dos grupos de animales, consistiendo cada uno en 10 animales (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Se alojó a los animales en una habitación con un ciclo de 12 horas de luz y se les proporcionó acceso libre a agua y comida. La ADNasa polisialada se preparó como se describe en el documento PCT/GB2007/002839. Brevemente: se disolvió un exceso de 20 molar de ácido polisialílico (PSA) de 26 kDa oxidado en tampón y el pH se ajustó a 6.0. Se añadió ADNasa de ADNasa I recombinante humana (Catalent) y a continuación, cianoborohidruro sódico 50 mM (concentración final), se reajustó el pH y la mezcla de reacción se llevó al volumen requerido. Las reacciones se llevaron a cabo a 37±1 °C con agitado suave durante 18 horas. Los conjugados de ADNasa-PSA se purificaron utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC; del inglés, hydrophobic interaction chromatography) - matriz de Fenil-sepharose, conteniendo el tampón de inicio sulfato amónico 2,0 M, la elución en el tampón sin sulfato amónico. Las fracciones de elución se aplicaron a continuación a la matriz de intercambio iónico Fast Flow de Q-sepharose y se eluyeron con tampón que contiene cloruro sódico. La purificación de los conjugados se confirmó mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alta resolución (SE-HPLC).

Los ratones del Grupo 1 no recibieron tratamiento (el grupo control); los ratones del Grupo 2 recibieron ADNasa I recombinante polisialada humana dosificada a 50 mg/kg subcutáneamente una vez al día. El tiempo de supervivencia de los animales se utilizó como un criterio de evaluación. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

5

Tabla 9.

Día del estudio	Porcentaje de animales supervivientes dentro del grupo (%)	
	Grupo 1	Grupo 2
60	70	100
90	50	100
120	20	100
150	0	70
180	0	60
210	0	50
240	0	20

Se deduce que la administración de ADNasa I tiene un efecto positivo sobre la supervivencia de los ratones que sufren ALS.

10 **Ejemplo 11. Uso de la ADNasa para el tratamiento de la atrofia del SNC sistémica**

Se eligió la enfermedad de Huntington como un ejemplo de atrofas sistémicas del sistema nervioso central. Los estudios se realizaron sobre ratones transgénicos R6/2 que expresan el exón 1 del gen que codifica la glutamina, que se acepta habitualmente como modelo de la enfermedad de Huntington (Miller et al., Neuroscience (2008) 153: 329-337). Se formaron tres grupos de animales, consistiendo cada uno en 10 animales (Charles River Laboratories). Se alojó a los animales en una habitación con un ciclo de 12 horas de luz y se les proporcionó acceso libre a agua y comida. Los ratones del Grupo 1 no recibieron tratamiento; los ratones del Grupo 2 recibieron ADNasa I recombinante humana (Catalent, Madison, EE.UU.) en la cantidad de 25000 mg/kg (2 veces por 24 horas, intramuscularmente); los ratones del Grupo 3 recibieron ADNasa en la cantidad de 25 mg/kg (una vez a la semana, en el LCR, utilizando la técnica de inyección en bolo ICV). El tiempo de supervivencia de los animales se utilizó como un criterio de evaluación. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

15

20

Tabla 10.

Seman a	Supervivencia en los grupos (%)		
	Grupo1	Grupo 2	Grupo3
6	100	100	100
9	70	100	100
12	10	100	100
15	0	100	100
18	0	100	90
21	0	70	60
24	0	50	40

25 Por tanto, la administración de ADNasa I tiene un efecto positivo sobre el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una enzima ADNasa para su uso en un método de prevención, tratamiento y/o inhibición de la progresión de la neurodegeneración, en la que dicha neurodegeneración se asocia con un nivel incrementado de ADN extracelular en sangre o en líquido cefalorraquídeo o en intestino.
2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la neurodegeneración es neurodegeneración primaria.
- 10 3. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho ADN extracelular es de origen procariótico.
4. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho ADN extracelular es de origen humano.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la ADNasa es para administrarse en una cantidad suficiente para destruir ADN extracelular en sangre o en líquido cefalorraquídeo o en intestino de un paciente.
- 20 6. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la ADNasa es para administrarse en una cantidad suficiente para disminuir el peso molecular promedio de dicho ADN extracelular como se midió mediante electroforesis en gel.
- 25 7. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha ADNasa se selecciona de una ADNasa recombinante, ADNasa I o ADNasa que tiene una semivida prolongada.
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha ADNasa se conjuga con ácido polisialílico.
- 30 9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha ADNasa se protege de la unión a actina mediante la modificación del sitio de unión de actina.
10. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha ADNasa se administra por ruta intravenosa, subcutánea o intramuscular.
- 35 11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha ADNasa es ADNasa I que es para administrarse en la cantidad de al menos 0,04 mg por kg por día durante al menos un día.
- 40 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha ADNasa es ADNasa I que es para administrarse en la cantidad de 0,05 - 10000 unidades Kunitz por kg por día durante al menos un día.
13. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha ADNasa es para administrarse de forma enteral u oral o en el líquido cefalorraquídeo.
- 45 14. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que dicha neurodegeneración se asocia con la enfermedad de Alzheimer, tal como una enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, esquizofrenia o trastorno bipolar.

FIGURA 1

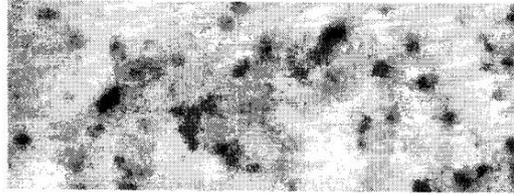


FIGURA 2

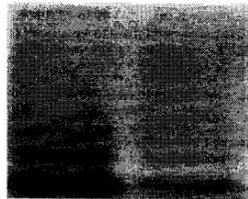


FIGURA 3A

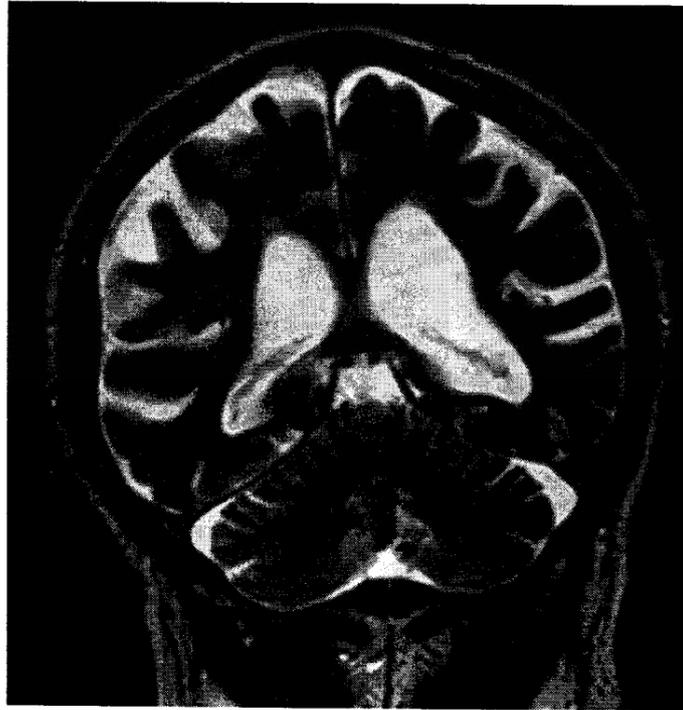


FIGURA 3B

