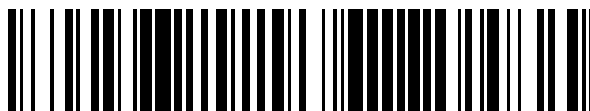


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 757**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005 E 08015799 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2072040**

54 Título: **Uso terapéutico de microesferas de ácido nucleico**

30 Prioridad:

12.05.2004 US 570273 P

05.11.2004 US 625311 P

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

13.09.2013

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)

One Baxter Parkway DF2-2W

Deerfield, IL 60015, US y

BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

SCOTT, TERENCE L.;

LAFRENIERE, DEBRA;

BISKER-LEIB, VERED y

BROWN, LARRY R.

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 422 757 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

Uso terapéutico de microesferas de ácido nucleico

Campo de la invención

5 En general, la presente invención se refiere a la preparación de microesferas de ácidos nucleicos y a su administración, en particular para inducir tolerancia a las células dendríticas al abordar cuestiones médicas. Más particularmente, la invención se refiere a una tecnología de administración de fármacos por medio de microesferas fabricadas empleando condiciones acuosas. Las microesferas pueden incorporar ARN interferente, ADN plásmido, oligonucleótidos antisentido (AS) u otros ácidos nucleicos. Estas microesferas se utilizan para alterar funciones celulares *in vivo e in situ*.

Antecedentes de la invención

10 Las micropartículas, microesferas y microcápsulas son partículas sólidas o semisólidas con un diámetro inferior a un milímetro, preferentemente inferior a 100 micras, que se pueden formar con diversos materiales, incluyendo polímeros sintéticos, proteínas y polisacáridos. Las microesferas se han utilizado en muchas aplicaciones diferentes, principalmente separaciones, diagnósticos y administración de fármacos.

15 Para la producción de estas microesferas a partir de polímeros sintéticos, polímeros naturales, proteínas y polisacáridos se pueden utilizar diversas técnicas diferentes, incluyendo separación de fases, evaporación de disolventes, emulsión y secado por pulverización. En general, los polímeros forman la estructura soporte de estas microesferas y el fármaco de interés se incorpora a la estructura polimérica. Ejemplos de polímeros utilizados para la formación de microesferas incluyen homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) tal como los descritos en la Patente US n° 5.213.812, de Ruiz, Patente US n° 5.417.986, de Reid y col., Patente US n° 4.530.840, de Tice y col., Patente US n° 4.897.268, de Tice y col., Patente US n° 5.075.109, de Tice y col., Patente US n° 5.102.872, de Singh y col., Patente US n° 5.384.133, de Boyes y col., Patente US n° 5.360.610, de Tice y col., y la Publicación de Solicitud de Patente Europea Número 248.531, del Southern Research Institute; copolímeros en bloque tales como tetronic 908 y poloxámero 407 como los descritos en la Patente US n° 4.904.479, de Illum; y polifosfacenos tal como los descritos en la Patente US n° 5.149.543, de Cohen y col.. Las microesferas producidas utilizando tales polímeros muestran una baja eficiencia de carga y con frecuencia sólo pueden incorporar un pequeño porcentaje del fármaco de interés en la estructura polimérica. Por consiguiente, a menudo se deben administrar cantidades sustanciales de microesferas para lograr un efecto terapéutico.

30 Las perlas o partículas esféricas se han comercializado durante muchos años como una herramienta para los bioquímicos. Por ejemplo, los anticuerpos conjugados con perlas crean partículas relativamente grandes específicas para ligandos particulares. Las partículas grandes revestidas con anticuerpos se utilizan habitualmente para reticular receptores sobre la superficie de una célula para la activación celular, se unen a una fase sólida para la purificación de inmunoafinidad y pueden utilizarse para administrar un agente terapéutico que se libera lentamente con el tiempo utilizando anticuerpos de tejido o específicos de tumores conjugados con las partículas para dirigir el agente al lugar deseado.

35 Un método habitual para unir de forma covalente un anticuerpo a una matriz en fase sólida es derivar una perla con un agente de conjugación química y después unir el anticuerpo a la perla activada. El uso de una perla polimérica sintética en lugar de una molécula proteínica permite emplear unas condiciones de derivación mucho más rigurosas de lo que pueden admitir muchas proteínas, es relativamente económica y, con frecuencia, genera un enlace que es estable frente a una amplia gama de condiciones desnaturalizantes. Existe una serie de perlas derivadas comerciales, todas ellas con diversos constituyentes y tamaños. Existen perlas formadas a partir de polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida, poliacrilato, poliestireno o látex, comercialmente disponibles de numerosas fuentes, como Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.) y LKB Produkter (Estocolmo, Suecia). También existen perlas formadas a partir de macromoléculas y partículas naturales, tales como agarosa, agarosa reticulada, globulina, ácido desoxirribonucleico y liposomas, comercialmente disponibles de fuentes tales como Bio-Rad Laboratories, Pharmacia (Piscataway, N. J.) e IBF (Francia). Existen perlas formadas a partir de copolímeros de poliacrilamida y agarosa comercialmente disponibles de fuentes tales como IBF y Pharmacia. Existen perlas magnéticas comercialmente disponibles de fuentes tales como Dynal Inc. (Great Neck, N. Y.).

50 Una desventaja de las micropartículas o perlas actualmente disponibles es que son difíciles y costosas de producir. La micropartículas producidas por estos métodos conocidos tienen una amplia distribución de tamaño de partícula, frecuentemente carecen de uniformidad y no tienen una cinética de liberación a largo plazo cuando la concentración de los principios activos es alta. Además, los polímeros utilizados en estos métodos conocidos se disuelven en disolventes orgánicos para formar las micropartículas. Por consiguiente, se deben producir en instalaciones especiales diseñadas para manipular disolventes orgánicos. Estos disolventes orgánicos podrían desnaturalizar las proteínas o péptidos contenidos en las micropartículas. Los disolventes orgánicos residuales podrían ser tóxicos al ser administrados a humanos o animales.

Además, las micropartículas disponibles casi nunca tienen un tamaño lo suficientemente pequeño para caber a través de la abertura del tamaño de la aguja habitualmente utilizada para administrar agentes terapéuticos o como para ser útiles en una administración vía inhalatoria. Por ejemplo, las micropartículas preparadas utilizando ácido glicólico-poliláctico (PLGA) son grandes y tienen tendencia a agregarse. Es necesario un paso de selección por tamaño, que conduce a una pérdida de producción, para eliminar aquellas partículas demasiado grandes para la inyección. Las partículas de PLGA de tamaño adecuado para la inyección deben ser administradas a través de una aguja de gran calibre para alojar estas grandes partículas, lo que frecuentemente produce molestias al paciente.

En general, muchas de las micropartículas actualmente disponibles se activan para liberar sus contenidos en medios acuosos y, por tanto, deben liofilizarse para evitar una liberación prematura. Además, aquellas partículas tales como las preparadas utilizando el sistema PLGA tienen una cinética de liberación basada tanto en la erosión como en la difusión. En este tipo de sistema se observa una descarga inicial o liberación rápida del fármaco. Este efecto de descarga rápida puede dar lugar a efectos secundarios no deseados en los pacientes a los que se les han administrado las partículas.

También se conocen micropartículas preparadas utilizando lípidos para encapsular fármacos diana. Por ejemplo, se pueden utilizar lípidos dispuestos en membranas bicapa que rodean múltiples compartimentos acuosos para formar partículas a utilizar en la encapsulación de fármacos solubles en agua para su administración posterior, tal como se describe en la Patente US nº 5.422.120, de Sinil Kim. En general, estas partículas tienen tamaños superiores a 10 micrómetros y están diseñadas para la administración intraarticular, intratecal, subcutánea y epidural. Alternativamente también se utilizan liposomas para la administración intravenosa de moléculas pequeñas. Los liposomas son partículas esféricas compuestas por un fosfolípido simple o múltiple y bicapas de colesterol. Los liposomas tienen un tamaño de 30 micrómetros o más y pueden portar diversos fármacos solubles en agua o en lípidos. La tecnología de liposomas se ha visto obstaculizada por varios problemas, incluyendo la pureza de los componentes lipídicos, la posible toxicidad, la heterogeneidad y estabilidad vesicular, la absorción excesiva y las dificultades de fabricación y vida útil en almacenamiento.

Un objetivo para la comunidad médica es suministrar ácidos nucleicos en las células de un sujeto, incluyendo, de forma no exclusiva, un animal o mamífero, para tratarlo. Por ejemplo, es posible suministrar ácidos nucleicos a células en cultivo (*in vitro*) de forma relativamente eficaz, pero las nucleasas conducen a una alta tasa de degradación del ácido nucleico cuando éste se administra a animales (*in vivo*).

Además de proteger el ácido nucleico frente a la digestión por nucleasa, el vehículo de suministro del ácido nucleico debe tener una baja toxicidad, debe absorberse eficientemente en las células y debe tener una formulación bien definida y de fácil fabricación. Tal como han demostrado los ensayos clínicos, los vectores virales para la administración pueden conducir a una respuesta inmunitaria *in vivo* gravemente adversa, incluso fatal. Además, este método tiene potencial para producir efectos mutagénicos *in vivo*. En general, la administración mediante la inclusión de un ácido nucleico en complejos de lípidos de diferentes formulaciones (como liposomas o complejos de lípidos catiónicos) ha sido ineficaz *in vivo* y puede tener efectos tóxicos. Los complejos de ácidos nucleicos con diversos polímeros o con péptidos han dado resultados irregulares y la toxicidad de estas formulaciones todavía no ha sido resuelta. También se han encapsulado ácidos nucleicos en matrices poliméricas para su administración, pero en estos casos las partículas tienen una amplia gama de tamaños y su eficacia para una aplicación terapéutica no se ha demostrado.

Por consiguiente, existe la necesidad de abordar los problemas de administración de ácidos nucleicos y proporcionar formulaciones de ácidos nucleicos eficaces. Además, sigue habiendo una necesidad de desarrollar microesferas y nuevos métodos para producir microesferas. En las patentes US nº 6.458.387, de Scott y col., nº 6.268.053, nº 6.090.925, nº 5.981.719 y nº 5.599.719, de Woiszwilllo y col., y nº 5.578.709, de Woiszwilllo, se describen microesferas y sus procedimientos de preparación. El documento WO 00/41679 describe microesferas que contienen citoquina producidas mediante coacervación basada en polianiones y policationes. En el documento US 2002146459 se describe una microesfera de ADN-PLGA condensada con polilisina. El documento WO 94/18947 se refiere a un proceso para proporcionar un complejo de protamina-ADN de alta pureza que consiste esencialmente en varios pasos. En el caso del documento US 2004/014698 se conjugaron poliornitina y poliarginina con ADN codificador de GFP y alginato y se formularon en nanopartículas. El documento US 6268053 se refiere a micropartículas que comprenden macromoléculas (hormonas, proteínas) y polímeros, siendo la concentración de las macromoléculas en la micropartícula de al menos un 40% e inferior al 100% en peso. Los polímeros incluyen polivinilpirrolidona, polietilenglicol, dextrano, etoxilatos de nonilfenol, alcohol polivinílico. El documento US 6458387 se refiere a un método para formar una microesfera que consiste en: (1) obtener una mezcla acuosa que contiene: (a) una proteína portadora, (b) un polímero soluble en agua, (c) un primer agente formador de complejos de polisacárido polianiónico y (d) un segundo agente formador de complejos de catión metálico divalente seleccionado entre calcio y magnesio, (2) dejar que se formen las microesferas en la mezcla acuosa y (3) estabilizar las microesferas poniéndolas en contacto con un agente reticulante bajo condiciones adecuadas para su estabilización. El documento US 6475995 describe una nanopartícula sólida inferior a 5 micras que incluye un coacervado de un polication polimérico y un polianión, seleccionándose el polication polimérico entre gelatina y quitosano y consistiendo el polianión en ácidos nucleicos codificadores de un antígeno, con lo que se expresa el antígeno y éste provoca una respuesta inmunitaria en el mamífero. El documento US 2003059474 proporciona detalles y métodos de producción de microesferas que incluyen (1) una macromolécula, (2) un polímero soluble en agua y (3) un agente formador de complejos policationico.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan microesferas para su utilización en terapia según la reivindicación 1 y un proceso para producir microesferas según la reivindicación 17. La presente invención se refiere a microesferas consistentes en agentes biológicamente activos, como ADN, ARNsi (ARN silencioso, también conocido como ARN bicatenario) ARNm, ARNt y todos los demás ácidos nucleicos, incluyendo, de forma no exclusiva, oligonucleótidos, y a métodos para la preparación y el uso de los mismos. Se cree que la propuesta de administración de microesferas de la presente invención evita o dificulta el acceso de los ácidos nucleicos administrados a las nucleasas celulares, evitando así la degradación prematura de dichos ácidos nucleicos terapéuticos.

El ácido nucleico que contiene microesferas puede utilizarse para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo, de forma no exclusiva, enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, psoriasis, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, fibromialgia, enfermedad de Grave, tiroiditis Hashimoto, liquen plano, miastenia gravis, trombocitopenia púrpura idiopática, fiebre reumática, artritis reumatoidea, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa y vitíligo. Además, las microesferas pueden utilizarse para tratar otras enfermedades relacionadas con las células dendríticas o macrófagos u otras enfermedades o afecciones basadas en células fagocíticas, incluyendo las que pueden ser tratadas, mediadas o mitigadas mediante métodos de oligonucleótidos antisentido o ARNsi o similares.

La administración aquí descrita de oligonucleótidos AS en microesferas a un sujeto se lleva a cabo para inducir tolerancia a las células dendríticas en relación con el tratamiento del comienzo de diabetes de tipo 1 en un individuo. Los oligonucleótidos AS que contienen microesferas se producen utilizando condiciones acuosas. Estas microesferas se utilizan para inhibir la expresión genética y prevenir una afección de tipo diabetes autoinmune en un sujeto. Las microesferas de la presente invención pueden utilizarse para tratar afecciones en desarrollo o como terapia preventiva.

Las microesferas de la presente invención también pueden consistir en múltiples agentes biológicamente activos, incluyendo oligonucleótidos.

Preferentemente se sintetizan tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86 y se prepara una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos, que se combina con una solución polimérica. Después del procesamiento se obtienen microesferas que contienen los oligonucleótidos.

La preparación de las microesferas de la presente invención se puede llevar a cabo con o sin agente reticulante, un polícatión, un polianión y/o una fuente de energía, como calor.

Las microesferas según la invención son especialmente adecuadas para su administración *in vivo* y en un procedimiento *in situ*, por ejemplo en una administración subcutánea directa. Una aplicación a este respecto es el tratamiento de tumores bajo la piel y el tratamiento de infecciones virales. Las microesferas se pueden administrar por vías de administración diversas, incluyendo, de forma no exclusiva, la vía oral, pulmonar, nasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, ocular, intradérmica, intraperitoneal y administración con supositorios, así como combinaciones de las mismas.

Las microesferas de la presente invención también pueden utilizarse con fines diagnósticos, incluyendo, de forma no exclusiva, diagnósticos genéticos.

Estos y otros aspectos, objetos, características y ventajas de la presente invención, incluyendo las diversas combinaciones, se evidenciarán y entenderán claramente a partir de la siguiente descripción detallada.

40 Breve descripción de las figuras

En esta descripción se hará referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

- Fig. 1: es una ilustración esquemática de la función de las células dendríticas en la destrucción autoinmune de células beta pancreáticas productoras de insulina en la diabetes de tipo 1;
- Fig. 2: diagrama del vector de ADN plásmido que contiene el gen de beta-galactosidasa;
- 45 Fig. 3: microfotografías que muestran la transfección de células de fibroblasto NIH 3T3 con las microesferas de ADN plásmido (ADNp) que contiene el gen de beta-galactosidasa;
- Fig. 4: microfotografía de un gel de electroforesis de agarosa de ADNp desnudo y dos formulaciones de microesferas de ADNp de acuerdo con la invención, en cada caso después de exposición a ADNasa;
- Fig. 5: gráfico de barras de la actividad de beta-galactosidasa en cuatro aplicaciones de transfección de ADN plásmido diferentes;
- 50 Fig. 6-9: microfotografías electrónicas de barrido de microesferas de oligonucleótidos AS y polícatión de poli-L-lisina;
- Fig. 10-13: microfotografías electrónicas de barrido de microesferas compuestas por oligonucleótidos AS y polícatión de poli-L-ornitina;

- Fig. 14 y 15: microfotografías electrónicas de barrido de microesferas de oligonucleótidos AS formadas sin componente policatiónico;
- Fig. 16: gráfico resumiendo la incidencia de la diabetes en tres grupos de ratones NOD tratados con microesferas de la presente invención y de acuerdo con otros procedimientos para administrar oligonucleótidos AS dirigidos a tres transcritos primarios; y
- Fig. 17: micrografía electrónica de barrido (SEM) de microesferas de ARNsi de acuerdo con la invención.

Descripción de las realizaciones preferentes

Aquí se describen realizaciones detalladas de la presente invención como es requisito. No obstante, se ha de entender que las realizaciones indicadas son simplemente ejemplos de la invención, que se puede realizar de diferentes formas. Por consiguiente, los detalles específicos aquí descritos no deben interpretarse como limitativos, sino simplemente como una base para las reivindicaciones y como una base representativa para enseñar a los expertos en la técnica a emplear la presente invención de diversos modos, prácticamente de cualquier forma adecuada.

En general, las microesferas de la presente invención están formadas por uno o más agentes activos, preferentemente son esencialmente esféricas y tienen una distribución de tamaño básicamente reducida dentro del intervalo de tamaños adecuado para la absorción celular. Las microesferas se pueden suministrar mediante métodos de administración opcionales, incluyendo una administración parenteral, vía oral, vía pulmonar, vía ocular, utilizando un sistema de depósito u otras vías de administración.

Las microesferas comprenden agentes activos de ácidos nucleicos, como ADN, ARN, ARNsi, ARNm, ARNt y otros tipos de ácidos nucleicos, incluyendo, de forma no exclusiva, oligonucleótidos de ARN o ADN, y combinaciones de los mismos. Microesferas preferentes de la presente invención son las formadas por uno o más oligonucleótidos. Las microesferas son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades y/o como herramientas para tareas diagnósticas, incluyendo, de forma no exclusiva, genómica funcional. Por ejemplo, las microesferas de oligonucleótidos antisentido pueden interrumpir la fase de traducción del proceso de producción de proteínas, impidiendo que el ARNm llegue al ribosoma. Las microesferas antisentido son suministradas a la célula enferma, virus o bacteria, donde se une (híbrida) específicamente con su ARNm diana. Como resultado, el ARNm se degrada y no es traducido por el ribosoma en una proteína funcional. En consecuencia, las microesferas antisentido son una herramienta eficaz para luchar contra enfermedades relacionadas con la sobreexpresión y/o la subexpresión de proteínas en el cuerpo, tal como ocurre en las enfermedades autoinmunes.

Ventajas importantes de los oligonucleótidos antisentido son su alta especificidad, ya que inhiben la expresión de un gen. Además, los oligonucleótidos antisentido son universales, ya que en teoría es posible desarrollar un oligonucleótido AS contra cualquier gen y su ARNm; la secuencia de ADN es la única información necesaria para el diseño del nucleótido AS. Los oligonucleótidos AS también son eficaces en células cultivadas de animales y humanos. Por otro lado, las microesferas de oligonucleótidos antisentido de la presente invención son "verificables", siendo útiles para el diagnóstico ya que tienen sitios muy específicos y se pueden marcar con un marcador fluorescente.

Es sabido que los oligonucleótidos se deterioran fácilmente por calor, agitación y otros tratamientos mecánicos y químicos, de modo que ya no se pueden adherir a un ácido nucleico diana y bloquear su acción. También es sabido que las proteínas, péptidos, oligonucleótidos y similares tienen una vida útil muy corta (entre unos minutos y unas horas) *in vivo*, requiriendo un suministro eficaz a la célula y, en algunas circunstancias, directamente al núcleo, para evitar la degradación enzimática. Así, normalmente estos agentes no pueden ser administrados con éxito "desnudos", sino que deben ser protegidos o formulados de modo que permita su administración *in vivo*.

Los oligonucleótidos de la presente invención mantienen su actividad biológica por su incorporación en las microesferas. Además, las microesferas también proporcionan altas capacidades de carga. Dicho de otro modo, permiten administrar a un sujeto dosis mayores de ácidos nucleicos terapéuticos mediante la dosificación de microesferas altamente concentradas (por ejemplo, 30-100% en peso de ácido nucleico, con respecto al peso total de las microesferas). A no ser que se especifique aquí de otro modo, los porcentajes son porcentajes en peso con respecto al peso total de la composición. Las microesferas proporcionan una herramienta de suministro no viral de oligonucleótidos antisentido y otros tipos de moléculas de ácidos nucleicos.

Las microesferas incluyen el compuesto biológicamente activo en una forma esencialmente esférica. Típicamente, las microesferas tienen una distribución de tamaño de partícula básicamente reducida, con un tamaño de partícula medio no superior a 50 micrómetros. Típicamente, el tamaño de partícula es inferior a 10 micrómetros, más típicamente inferior a 5 micrómetros. Preferentemente tienen una distribución de tamaño reducida, con un tamaño de partícula medio entre aproximadamente 0,04 y aproximadamente 8 micras, o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4 micras, o entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 4 micras, o entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 4 micras, y, en las aplicaciones en las que son deseables microesferas de aproximadamente 1 micra, entre aproximadamente 1 micra y aproximadamente 3 micras. El tamaño de partícula medio puede ser de aproximadamente 2 micras, por ejemplo, y el intervalo de tamaño de partícula se puede ajustar para adaptarlo a la aplicación deseada.

Las microesferas incluyen preferentemente ácidos nucleicos que son esencialmente amorfos o no cristalinos, es decir se encuentran en forma amorfa o semicristalina. Tal como se utiliza aquí, el término “amorfo” se refiere a una forma sólida generalmente aleatoria de ácido nucleico en la que la microesfera carece de redes cristalinas del o los ácidos nucleicos, refiriéndose el término “semicristalino” a una forma sólida generalmente aleatoria de ácido nucleico en la que el contenido de ácido nucleico de la microesfera es inferior a un 50% en forma de red cristalina del o los ácidos nucleicos.

La administración del compuesto biológicamente activo en forma de microesferas con el tamaño deseado puede aumentar la eficacia del fármaco y reducir los residuos. También puede reducir los efectos negativos causados por altas dosis del agente activo. El tamaño de la microesfera puede determinar el órgano al que está dirigida. Además, es importante el control óptimo del tamaño de partícula de las microesferas para la administración de agentes biológicos *in vivo*, ya que las células diana sólo puede absorber microesferas con un tamaño particular. Una microesfera con un tamaño superior al aquí descrito puede activar macrófagos y otros mecanismos inmunitarios que degradan la partícula biológica, mientras que con un tamaño inferior se puede disolver con demasiada rapidez.

Para producir las microesferas, el agente biológico deseado, normalmente un oligonucleótido u otro compuesto de ácido nucleico, se disuelve en una solución acuosa. Ésta se combina con uno o más polímeros solubles en agua, como polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG), y combinaciones de los mismos. Los polímeros solubles en agua no constituyen una parte esencial de las microesferas, si es que forman parte de éstas, pero ayudan a su preparación. Los ácidos nucleicos pueden constituir hasta el 100 por cien en peso de la composición de microesferas. Normalmente representarán al menos un 20 por ciento en peso, típicamente al menos aproximadamente un 30 por ciento en peso, preferentemente al menos aproximadamente un 50 por ciento en peso, de forma especialmente preferente al menos un 70 por ciento en peso y de forma totalmente preferente al menos aproximadamente un 90 por ciento en peso. Los ácidos nucleicos pueden constituir al menos aproximadamente un 95 por ciento en peso de las microesferas. Normalmente es preferible formar las microesferas en una mezcla de uno o más polímeros acuosos/solubles en agua a pH moderadamente ácido. Por ejemplo, con frecuencia el o los polímeros se disuelven en una solución tampón, como acetato de sodio, a un pH de aproximadamente 5,3. Mediante esta técnica general también se pueden producir microesferas con otros polímeros, como polisacáridos, incluyendo polisacáridos de carga positiva y negativa y otros polímeros biocompatibles. El orden de adición de los componentes se puede variar para formar microesferas con diferentes propiedades químicas y físicas, como el tamaño, la morfología y/o la carga superficial.

En algunas preparaciones de microesferas es preferible combinar los ácidos nucleicos con un polication antes de formar la microesfera. Sin embargo, en algunos casos puede resultar ventajoso evitar el uso de policationes, ya que algunos cationes pueden asociarse a problemas de toxicidad. Para producir estas microesferas también se puede emplear un polianión, un agente reticulante de polianión u otro agente reticulante. Los policationes preferentes son, por ejemplo, polilisina y poliornitina. Otros incluyen polietilenimina (PEI), prolamina, protamina, polivinilpirrolidona (PVP), poliarginina, vinilamina, y sus combinaciones.

Cuando se incluye un componente de polication en la preparación de las microesferas y también en las propias microesferas, éste puede estar presente a un nivel entre aproximadamente un 0 y aproximadamente un 80 por ciento en peso con respecto a la composición formadora de microesferas total. Las microesferas preparadas con policationes pueden contener al menos aproximadamente un 2 por ciento en peso, o pueden contener al menos aproximadamente un 5 por ciento en peso, o pueden contener al menos aproximadamente un 10 por ciento en peso, o pueden contener al menos aproximadamente un 20 por ciento en peso, o pueden contener al menos aproximadamente un 30 por ciento en peso del polication, siendo el resto generalmente el ácido nucleico.

En algunas aplicaciones de producción de microesferas se suministra energía (por ejemplo en forma de calor u otras fuentes de energía) a la composición para facilitar la formación de microesferas. Se ha descubierto que la adición de energía puede resultar útil para producir algunos tipos de microesferas de la presente invención.

Las composiciones de microesferas pueden contener múltiples compuestos biológicamente activos. Por consiguiente, las microesferas, bien individualmente, bien colectivamente como grupo de microesferas, pueden contener más de un ácido nucleico, por ejemplo uno o más oligonucleótidos. Además, también es posible añadir otras moléculas a la superficie de las microesferas de ácido nucleico después de su formulación, incluyendo, de forma no exclusiva, anticuerpos, ligandos de receptores o quimiotácticos.

Aunque existen numerosas técnicas que pueden ser útiles para la preparación de las microesferas de la presente invención, se ha comprobado que la siguiente técnica resulta particularmente útil.

Primero se prepara una solución acuosa de la mezcla de ácidos nucleicos que incluye un polication en relaciones volumétricas polication:ácido nucleico de entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 4:1. Entonces se preparan soluciones poliméricas de polivinilpirrolidona y/o polietilenglicol y se combinan con la solución que contiene el ácido nucleico. El cambio de la temperatura de la solución combinada por calentamiento o enfriamiento, o combinaciones de éstos, y múltiples pasos de centrifugado y lavado proporcionan una suspensión condensada acuosa que normalmente se congela y liofiliza para formar un polvo seco de microesferas que comprende el o los nucleótidos y el polication. La temperatura de la mezcla antes de la formación de las microesferas se puede reducir o aumentar desde temperatura

ambiente a una velocidad entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 400°C/minuto. Para las aplicaciones de enfriamiento, la mezcla se enfría normalmente a una temperatura entre aproximadamente 35 y aproximadamente -196°C. Para las aplicaciones de calentamiento, la mezcla se calienta a una temperatura entre aproximadamente 4 y aproximadamente 100°C.

- 5 También es posible añadir otros excipientes a la composición final o a la pre-mezcla de formación de microesferas, como polisacáridos, polisacáridos de carga positiva o negativa y otros polímeros preferiblemente biocompatibles. También se puede cambiar el orden de adición, lo que puede conducir a la formación de microesferas con diferentes propiedades químicas y/o físicas. Otras fracciones pueden ser añadidas a la superficie para que actúen como quimiotácticos o como ligandos de receptores, por ejemplo.
- 10 Las microesferas según la invención son vehículos de suministro no virales útiles para ADN plásmido, oligonucleótidos antisentido y otras moléculas de ácido nucleico.

Las composiciones de microesferas se pueden presentar en forma de suspensión líquida (preferentemente acuosa), en forma de polvo seco, en suspensión en disolventes orgánicos o microencapsuladas en forma sólida dentro de otros polímeros.

- 15 Tal como se ha indicado anteriormente, las microesferas de la presente invención se pueden dosificar por diversas vías de administración. Los clínicos especializados determinarán la cantidad de dosis real de agente activo, la concentración de la formulación y el volumen de la formulación a dosificar, que generalmente dependerán de diversos factores, incluyendo, de forma no exclusiva, la enfermedad o afección a tratar, la edad el sexo y el peso del sujeto a tratar, la potencia del ácido nucleico para el tratamiento de la diana particular, la concentración de ácido nucleico en la formulación de dosificación, etc. Tal como se utiliza aquí, el concepto "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de
- 20 microesferas de la presente invención que evita, trata o mejora una enfermedad o afección en un sujeto.

- Las microesferas según la invención tienen una característica especialmente protectora. Los estudios *in vitro* utilizando microesferas de beta-galactosidasa indican que la forma de microesferas protegía el ADN frente a las nucleasas. Con frecuencia, el ADN y los oligonucleótidos se someten a tioación con el fin de ralentizar la degradación. Por ejemplo, los
- 25 oligonucleótidos AS normalmente están en forma tioada. Gracias a las características protectoras de las microesferas, la necesidad de dicha forma tioada se puede reducir o eliminar por completo.

- Un método preferente de la presente invención se refiere a la prevención o la mejoría de la diabetes autoinmune insulino-dependiente mediante la formulación e inyección de las microesferas de oligonucleótidos antisentido (AS) aquí descritas, que están dirigidas a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86. Estos oligonucleótidos han sido
- 30 diseñados para inducir una tolerancia inmunitaria en un intento de prevenir la destrucción de las células beta productoras de insulina en el modelo de ratón NOD. La Fig. 1 ilustra los sucesos que conducen a la destrucción de estas células beta. Dicha figura ilustra cómo se manifiesta la diabetes tipo 1 mediante la destrucción autoinmune de células beta productoras de insulina pancreática en el ratón NOD y también en humanos. En el momento del inicio clínico de la diabetes, los humanos conservan un 10-20% de su masa de células beta residuales. El uso moderado de esta masa residual puede conducir a mantener los niveles de insulina adecuados para regular los niveles de glucosa. Algunas microesferas preferentes de la invención están previstas para interferir en la destrucción autoinmune de las células beta ilustrada en la Fig. 1.

- Se observará que las células dendríticas (DC) se pueden activar para convertirlas en potentes células presentadoras de antígeno que se encuentran en todos los tejidos y que están muy concentradas bajo la piel. Estas células dendríticas presentadoras de antígeno funcionan como activadores de la respuesta inmunológica mediante la activación de las
- 40 células T, en particular en los ganglios linfáticos.

- La Fig. 2 ilustra un vector plásmido que contiene el gen de beta-galactosidasa, que puede ser utilizado para transfectar células de fibroblasto NIH 3T3. La demostración *in vitro* de la transfección de células de fibroblasto NIH 3T3 con las microesferas de ADN plásmido se muestra en la Fig. 3 y consiste en la aparición de células teñidas de color azul en
- 45 respuesta a la adición del sustrato de beta-galactosidasa X-gal.

- La Fig. 4 ilustra la capacidad *in vitro* de las microesferas para proteger ADN en solución. La figura representa un gel de electroforesis de agarosa que muestra la protección de nucleasa impartida por la fabricación de microesferas de ADN plásmido producidas generalmente tal como se indica aquí. En las muestras de plásmido 1, 2 y 3, un ADN plásmido desnudo se expuso a ADNasa, indicando las manchas la degradación de ADN plásmido en cada uno de los tres niveles
- 50 de exposición a ADNasa. En las muestras de partícula 1 y partícula 2, las formulaciones de microesferas de ADN plásmido se expusieron a ADNasa. La falta de manchas indica que las formulaciones de microesferas protegen el ADN plásmido de la degradación.

- La Fig. 5 cuantifica los niveles de expresión de actividad de beta-galactosidasa transfectada en cuatro aplicaciones de ADN plásmido diferentes. La aplicación de ADN plásmido desnudo mostraba niveles muy bajos. En el caso de la transfección compleja de ADN plásmido-lípido catiónico utilizando lipofectamina, un lípido catiónico comercial, como
- 55 vehículo de suministro, se observan niveles algo mayores. En el caso de las dos preparaciones de microesferas de ADN

plásmido, correspondiendo las microesferas 1 a la partícula 1 de la Fig. 4 y las microesferas 2 a la partícula 2 de la Fig. 4, se observa una actividad considerablemente mayor.

Los siguientes ejemplos describen características y ventajas de la invención para ilustrarla adicionalmente. Los ejemplos no deben considerarse como limitativos o restrictivos de la invención.

5 Ejemplo 1

En el centro de síntesis de ADN de la Universidad de Pittsburgh (Pittsburg, PA) se sintetizaron tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86. Las secuencias de oligonucleótidos AS, donde un asterisco indica tioación, son:

**Seq ID 1: CD 40-AS: 5'C*AC* AG*C C*GA* GG*C* AA*A
GA*C* AC*C A*T*G C*AG* GG*C* A-3'**

**Seq ID 2: CD80-AS: 5'-G*GG* AA*A G*CC* AG*G A*AT* CT*A
G*AG* CC*A A*TG G*A-3'**

**Seq ID 3: CD86-AS: 5'-T*GG* GT*G C*TT* CC*G T*AA*
GT*T C*TG* GA*A C*AC* G*T*C-3'**

- 10 Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando partes alícuotas de tres soluciones de oligonucleótido, conteniendo en cada caso un tipo de oligonucleótido, para formar una solución de 10 mg/ml de los tres tipos de oligonucleótido. Se prepararon cuatro cargas de solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos. Se prepararon 10 mg/ml de poli-L-lisina·HBr en agua desionizada (poli-L-lisina·BBr hasta 50.000, de Bachem, King of Prussia, PA). La poli-L-lisina·BBr se añadió a la solución de oligonucleótidos en relaciones volumétricas 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1, tal como se describe en la Tabla 1. Las cargas se etiquetaron con 1, 2, 3 y 4. Las mezclas se sometieron a un vórtice suave. Se preparó una solución polimérica al 25% que contenía un 12,5% de PVP (polivinilpirrolidona, 40.000 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y un 12,5% de PEG (polietilenglicol, 3.350 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) en acetato de sodio 1M (Spectrum, Gardena, CA) a pH 5,5. La solución polimérica se añadió a las cargas 1-4 en una relación volumétrica 2:1 tal como se describe en la Tabla 1, que muestra los volúmenes de oligonucleótidos AS, poli-L-lisina·HBr y PEG/PVP en las cargas 1-4:

Tabla 1

Carga	Oligonucleótido	Poli-L-lisina·HBr	25% PEG/PVP	Volumen total
1	750 µl	0,75 ml	3,0 ml	4,50 ml
2	750 µl	1,50 ml	4,5 ml	6,75 ml
3	750 µl	2,25 ml	6,0 ml	9,00 ml
4	750 µl	3,00 ml	7,5 ml	11,25 ml

- 25 Las cargas se incubaron durante 30 minutos a 70°C y después se enfriaron a 23°C. Después de enfriamiento, la solución se enturbió y se produjo precipitación. Luego se centrifugó la suspensión y se retiró el exceso de PEG/PVP. La pella resultante se lavó por su resuspensión en agua desionizada, centrifugación y retirada del sobrenadante. El proceso de lavado se repitió tres veces. La suspensión condensada acuosa se congeló y liofilizó para formar un polvo seco de microesferas que comprendían oligonucleótido y poli-L-lisina.

- 30 La Fig. 6 es micrografía electrónica de barrido (SEM) de la carga nº 1 (relación de poli-L-lisina:oligonucleótido de 1:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,5-4 µm y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 2,5 µm. También se observó la precipitación de un material desconocido. Estudios adicionales por HPLC determinaron que el precipitado estaba formado por PEG/PVP residual, principalmente PVP.

La Fig. 7 es una SEM de la carga nº 2 (relación de poli-L-lisina:oligonucleótido de 2:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-4 µm y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 1 µm.

- 35 La Fig. 8 es una SEM de la carga nº 3 (relación de poli-L-lisina:oligonucleótido de 3:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-4 µm y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 1 µm. También se observó la precipitación

de un material desconocido. Estudios adicionales por HPLC determinaron que el precipitado estaba formado por PEG/PVP residual, principalmente PVP.

La Fig. 9 es una SEM de la carga n° 4 (relación de poli-L-lisina:oligonucleótido de 4:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-6 micras. Se observa una polidispersión de tamaños, teniendo aproximadamente la mitad de las partículas un tamaño de partícula medio de 1 µm y la otra mitad de las partículas un tamaño de partícula medio de 5 µm.

Ejemplo 2

Los oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86 eran las secuencias de oligonucleótidos AS del Ejemplo 1. Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando partes alícuotas de tres soluciones de oligonucleótidos, conteniendo en cada caso un tipo de oligonucleótido, para formar una solución de 10 mg/ml de los tres tipos de oligonucleótido. Se prepararon cuatro cargas de soluciones de la mezcla de oligonucleótidos. También se prepararon 5 mg/ml de poli-L-ornitina·HBr en agua desionizada (poli-L-ornitina·HBr 11,900 (vis) de Sigma).

Después se añadió poli-L-ornitina·HBr a la solución de oligonucleótidos en relaciones volumétricas variables tal como se describe en la Tabla 2. Las cargas se etiquetaron con 1, 2, 3 y 4. Las mezclas se sometieron a un vórtice suave. Se preparó una solución polimérica al 25% que contenía un 12,5% de PVP (40.000 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y un 12,5% de PEG (3.350 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) en acetato de sodio 0,1M (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) a pH 5,5. Las soluciones poliméricas se añadieron a las cargas 1-4 en las relaciones volumétricas indicadas en la Tabla 2. Después se llevaron a cabo la incubación y los enjuagues tal como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 2 muestra los volúmenes de oligonucleótidos AS, poli-L-ornitina·HBr, PEG/PVP y PEG en las cargas 1-4:

Tabla 2

Carga	Oligonucleótido	Poli-L-ornitina·HBr	25% PEG/PVP	25% PEG	Vol. total
1	1,5 ml	1,5 ml	3 ml	-	6,0 ml
2	1,5 ml	3,0 ml	8 ml	-	12,5 ml
3	1,5 ml	1,5 ml	-	6 ml	9,0 ml
4	1,5 ml	4,5 ml	-	6 ml	12,0 ml

La Fig. 10 es una SEM de la carga n° 1 (relación de poli-L-ornitina:oligonucleótido de 1:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-8 µm y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 2 µm. También se observó la precipitación de un material desconocido. Estudios adicionales por HPLC permitieron demostrar que este precipitado estaba formado por PEG/PVP residual, principalmente PVP.

La Fig. 11 es una SEM de la carga n° 2 (relación de poli-L-ornitina:oligonucleótido de 2:1). Se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-8 µm y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 2 µm. Muchas de las microesferas estaban fusionadas entre sí. También se observó la precipitación de un material desconocido. Estudios adicionales por HPLC permitieron demostrar que este precipitado estaba formado por PEG/PVP residual, principalmente PVP.

La Fig. 12 es una SEM de la carga n° 3 (relación de poli-L-ornitina:oligonucleótido de 1:1, solo PEG). Se formó un precipitado amorfo. Esto indicaba que la presencia de PVP en la formulación desempeñaba un papel importante en la formación de microesferas.

La Fig. 13 es una SEM de la carga n° 4 (relación de poli-L-ornitina:oligonucleótido de 1:3, solo PEG). Se formaron microesferas porosas con un tamaño de 10-50 µm, microesferas rotas y cadenas de 2-10 µm de microesferas fusionadas. No se observaron microesferas individuales. Esta carga indicaba que la presencia de PVP en la formulación desempeñaba un papel importante en la formación de microesferas.

Ejemplo 3

Se sintetizaron tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86 con las secuencias de oligonucleótidos del Ejemplo 1. Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando partes alícuotas de tres soluciones de oligonucleótidos, conteniendo en cada caso un tipo de oligonucleótido, para formar una solución de 10 mg/ml de los tres tipos de oligonucleótido. Se prepararon dos cargas de solución de la mezcla de oligonucleótidos.

Se preparó una solución polimérica al 25% que contenía un 12,5% de PVP (40.000 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y un 12,5% de PEG (3.350 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) en acetato de sodio 0,1M (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) a pH 5,5. También se preparó PEG al 25% en acetato de sodio 0,1M a pH 5,5. Las soluciones poliméricas se añadieron a las cargas 1-2 en diferentes relaciones volumétricas, tal como se indica en la

Tabla 3. Después se llevaron a cabo la incubación y los enjuagues tal como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 3 muestra los volúmenes de oligonucleótidos AS, PEG/PVP y PEG en las cargas 1-2:

Carga	Oligonucleótido	25% PEG/PVP	25% PEG	Vol. total
1	1,5 ml		3,0 ml	4,5 ml
2	1,5 ml	3,0 ml		4,5 ml

5 La Fig. 14 es una SEM de la carga 1 (PEG:oligonucleótido 2:1). Se formó un precipitado amorfo. Esta carga demostró de nuevo que la presencia de PVP desempeñaba un papel importante en la formación de microesferas.

La Fig. 15 es una SEM de la carga 2 (PEG/PVP:oligonucleótido 2:1). Se produjeron microesferas con una distribución de tamaño de partícula de 0,2-6 μm y también se observaron tiras largas de una fuente no identificada. Esta carga demostró que se podían formar microesferas sin polimerización.

10 **Ejemplo 4**

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* utilizando el modelo de ratón NOD de diabetes mellitus tipo 1. La diabetes tipo 1 se manifiesta por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas productoras de insulina, tal como se ilustra en la Fig. 1. Se utilizaron oligonucleótidos AS en tres aplicaciones en un intento de interferir en la destrucción autoinmune de las células beta. El objetivo era interferir en la función de las células dendríticas estableciendo como dianas los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86, que codifican proteínas superficiales de células dendríticas necesarias para la activación de células T. Ya se sabe que las células dendríticas con niveles bajos de CD40, CD80 y CD86 promueven redes de inmunocitos supresores *in vivo*. Estas cascadas pueden conducir a una hiposensibilidad de las células T a las células beta *in vivo*.

20 En el primer grupo de animales de ensayo se propagaron células dendríticas *ex vivo* de precursores de médula ósea de ratones NOD. Se añadieron combinaciones de los tres oligonucleótidos AS dirigidos a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86 a las células en cultivo tisular. Después de la incubación, las células dendríticas transfectadas con oligonucleótido AS se inyectaron en recipientes singenéticos de 5 a 8 semanas de edad (todavía no diabéticos). Se trata de un método de suministro *ex vivo*.

25 Paralelamente se inyectaron microesferas de oligonucleótidos AS directamente en otros ratones NOD de la misma edad. A cada uno de los ratones así tratados se administró una única inyección. Otro grupo de ratones NOD no recibió tratamiento y sirvió como control.

30 La Fig. 16 muestra que todos los ratones NOD de control no tratados desarrollaron diabetes antes de llegar a las 23 semanas de edad. El grupo tratado con células dendríticas transfectadas *ex vivo* con oligonucleótido AS e incorporadas de nuevo por reinfusión (AS-ODN DC) mostró un desarrollo retrasado de la diabetes, permaneciendo un 20% "libre de diabetes", indicando que los niveles de glucosa se mantienen dentro de un intervalo no diabético. El 71% de los ratones NOD a los que se les habían inyectado microesferas directamente *in vivo* permanecía "libre de diabetes" a las 43 semanas.

Ejemplo 5

35 Se marcó con Cy3 fluorescente un ARN dúplex interferente corto, siGLO Cyclophilin B ARNsi (ratón) de Dharmacon (Lafayette, CO). La secuencia de ARN bicatenario se muestra como Seq ID 4 y su complemento, Seq ID 5:

Seq ID 4: Cyclophilin B siRNA 5'-GGAAAGACUGUUCCAA AAAAUU-3'

Seq ID 5: Complement 5'-UUUUUGGAACAGUCUUCCUU-3'

40 Se preparó una solución acuosa de ARNsi como una solución de 15 mg/ml. Además se prepararon 15 mg/ml de poli-L-lisina-HBr en agua desionizada (poli-L-lisina 30.000-70.000 MW, Sigma). La poli-L-lisina se añadió al ARNsi en una relación volumétrica 1:1, tal como muestra la Tabla 1. Las mezclas se sometieron a un vórtice suave. Se preparó una solución polimérica al 25% que contenía un 12,5% de PVP (polivinilpirrolidona, 40.000 dalton, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y un 12,5% de PEG (polietilenglicol, 3.350 dalton, Spectrum, Gardena, CA) en acetato de sodio 1M (Spectrum, Gardena, CA), pH 5,5. La solución polimérica se añadió a la mezcla de ARNsi/poli-L-lisina en una relación volumétrica 2:1 tal como se describe en la Tabla 4, que muestra los volúmenes de siGLO ARNsi dúplex, poli-L-lisina-HBr y PEG/PVP:

45

Tabla 4

Carga	siGLO ARNsi	Agua desionizada	Poli-L-lisina HBr	25% PEG/PVP	Vol. total
1	0,5 ml	0,25 ml	0,5 ml	2,5 ml	3,75 ml

5 La carga se incubó durante 30 minutos a 58°C y después se enfrió sobre hielo durante 30 minutos. Después del enfriamiento, la solución se enturbió y se produjo precipitación. Luego se centrifugó la suspensión y se retiró el exceso de PEG/PVP. La pella resultante se lavó por su resuspensión en agua desionizada, centrifugación y retirada del sobrenadante. El proceso de lavado se repitió tres veces. La suspensión condensada acuosa se congeló a -80°C y liofilizó para formar un polvo seco de microesferas que comprendían ARNsi dúplex siGLO Cyclophilin B marcado con Cy3 y poli-L-lisina.

10 La Fig. 17 es una micrografía electrónica de barrido (SEM) de la carga de las microesferas (relación de poli-L-lisina:ARNsi dúplex de 1:1). De este modo se produjeron microesferas con un tamaño de 0,2-1,4 micrómetros y un tamaño de partícula medio de aproximadamente 0,48 nanómetros.

En los siguientes párrafos numerados de la descripción se presentan aspectos preferentes de la invención:

- 15 1. Microesferas que comprenden entre aproximadamente un 20 por ciento en peso y aproximadamente un 100 por ciento en peso de uno o más ácidos nucleicos y que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 50 micrómetros.
2. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos constituyen entre aproximadamente un 30 por ciento en peso y aproximadamente un 100 por ciento en peso de las microesferas.
- 20 3. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos constituyen entre aproximadamente un 50 por ciento en peso y aproximadamente un 100 por ciento en peso de las microesferas.
4. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos constituyen entre aproximadamente un 70 por ciento en peso y aproximadamente un 100 por ciento en peso de las microesferas.
5. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos constituyen entre aproximadamente un 90 por ciento en peso y aproximadamente un 100 por ciento en peso de las microesferas.
- 25 6. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos constituyen al menos aproximadamente un 95 por ciento en peso de las microesferas.
7. Microesferas según el párrafo 1 que contienen al menos dos ácidos nucleicos diferentes.
8. Microesferas según el párrafo 1, donde al menos uno de los ácidos nucleicos es un oligonucleótido.
9. Microesferas según el párrafo 8 que contienen al menos dos oligonucleótidos diferentes.
- 30 10. Microesferas según el párrafo 1 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 2 micrómetros y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,04 micrómetros y aproximadamente 8 micrómetros.
11. Microesferas según el párrafo 7 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 2 micrómetros y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,04 micrómetros y aproximadamente 8 micrómetros.
- 35 12. Microesferas según el párrafo 8 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 2 micrómetros y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,04 micrómetros y aproximadamente 8 micrómetros.
13. Microesferas según el párrafo 1 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 1 micrómetro y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,2 micrómetros y aproximadamente 4 micrómetros.
- 40 14. Microesferas según el párrafo 7 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 1 micrómetro y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,2 micrómetros y aproximadamente 4 micrómetros.
- 45 15. Microesferas según el párrafo 8 que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 1 micrómetro y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,2 micrómetros y aproximadamente 4 micrómetros.
16. Microesferas según el párrafo 1, donde dichos ácidos nucleicos se seleccionan entre el grupo consistente en ADN, oligonucleótidos de ADN, oligorribonucleótidos de ARN, oligonucleótidos híbridos de ADN/ARN, ARNm, ARNsi, o ARNt, y combinaciones de los mismos.
- 50 17. Microesferas según el párrafo 1 que están en suspensión.
18. Microesferas según el párrafo 1 que están en una formulación en polvo seco.
19. Método para tratar a un sujeto que consiste en administrar a dicho sujeto las microesferas del párrafo 1.
20. Método según el párrafo 15, donde la vía de administración para suministrar dichas microesferas se selecciona entre el grupo consistente en las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, intradérmica, intraperitoneal, oral, pulmonar, ocular, nasal, bucal, vaginal, rectal y combinaciones de las mismas.
- 55 21. Método para proteger a un individuo frente a enfermedades autoinmunes, que consiste en inyectar vía subcutánea las microesferas del párrafo 1.

22. Método para proteger a un individuo frente a enfermedades autoinmunes, que consiste en inyectar vía subcutánea las microesferas del párrafo 7.
23. Proceso para producir microesferas biológicamente activas que comprenden ácidos nucleicos, consistente en disolver los ácidos nucleicos con un disolvente para formar una composición y en formar microesferas a partir de dicha composición, teniendo dichas microesferas un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 50 micrómetros.
24. Proceso según el párrafo 23, donde se añade al menos un polícatión a dicho disolvente.
25. Proceso según el párrafo 24, donde dicho polícatión se selecciona entre el grupo consistente en polilisina, poliornitina, polietilenimina, prolamina, protamina, polivinilpirrolidona (PVP), poliarginina, vinilamina, y combinaciones de las mismas.
26. Proceso según el párrafo 25, donde dicho polícatión es polilisina.
27. Proceso según el párrafo 25, donde dicho polícatión es poliornitina.
28. Proceso según el párrafo 23, donde se añade al menos un polícatión a dicho disolvente.
29. Proceso según el párrafo 23, donde se añade al menos un polímero a dicho disolvente.
30. Proceso según el párrafo 29, donde dicho polímero se selecciona entre el grupo consistente en un polisacárido, polietilenglicol, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.
31. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo añadiendo un agente reticulante a la composición.
32. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo aportando energía a la composición.
33. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo en ausencia de un componente de polícatión en dicha composición.
34. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo en ausencia de un componente reticulante en dicha composición.
35. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo en ausencia de un componente de polianión en dicha composición.
36. Proceso según el párrafo 23, donde dicha formación se lleva a cabo en ausencia de aplicación de una fuente de energía para formar dichas microesferas a partir de dicha composición.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Brown, Larry R; Bisker-Leib, Vered; Scott, Terrence L.; Lafreniere, Deborah.	
	<120> Microesferas de oligonucleótidos, producción y administración de las mismas	
5	<130> 6143PCT-2 (4362-0003)	
	<141> 12-5-2005	
	<160> 5	
	<210> 1	
	<211> 31	
10	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 1	
	cacagccgag gcaaagacac catgcagggc a	31
	<210> 2	
15	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 2	
	gggaaagcca ggaatctaga gccaatgga	29
20	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Mus Musculus	
	<400> 3	
25	tgggtgcttc cgtaagttct ggaacacgtc	30
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
30	<400> 4	
	ggaaagacug uuccaaaau u	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Mus musculus	
	<400> 5	
	uuuuuggaac agucuuuccu u	21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microesferas que comprenden entre un 20 por ciento en peso y un 100 por cien en peso de uno o más ácidos nucleicos y que tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 50 micrómetros, estando dichas microesferas esencialmente libres de un polímero soluble utilizado en la preparación de las microesferas, para su uso en terapia.
2. Microesferas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dichos ácidos nucleicos constituyen entre un 30 por ciento en peso y un 100 por cien en peso de las microesferas.
- 10 3. Microesferas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dichos ácidos nucleicos constituyen entre un 50 por ciento en peso y un 100 por cien en peso de las microesferas.
4. Microesferas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dichos ácidos nucleicos constituyen entre un 70 por ciento en peso y un 100 por cien en peso de las microesferas.
5. Microesferas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dichos ácidos nucleicos constituyen entre un 90 por ciento en peso y un 100 por cien en peso de las microesferas.
- 15 6. Microesferas según la reivindicación 1, en las que dichos ácidos nucleicos constituyen al menos aproximadamente un 95 por ciento en peso de las microesferas.
7. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque contienen al menos dos ácidos nucleicos diferentes.
- 20 8. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque al menos uno de los ácidos nucleicos es un oligonucleótido.
9. Microesferas según la reivindicación 8, caracterizadas porque al menos dos oligonucleótidos diferentes.
10. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 2 micrómetros y una distribución de tamaño de partículas entre aproximadamente 0,04 micrómetros y aproximadamente 8 micrómetros.
- 25 11. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque tienen un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 1 micrómetro y una distribución de tamaño de partículas entre 0,2 micrómetros y 4 micrómetros.
12. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque dichos ácidos nucleicos se seleccionan entre el grupo consistente en ADN, oligonucleótidos de ADN, oligorribonucleótidos de ARN, oligonucleótidos híbridos de ADN/ARN, ARNm, ARNsí, o ARNt, y combinaciones de los mismos.
- 30 13. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque están en suspensión.
14. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque están en una formulación en polvo seco.
- 35 15. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque son adecuadas para la administración vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, intradérmica, intraperitoneal, oral, pulmonar, ocular, nasal, bucal, vaginal y/o rectal.
16. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque son adecuadas para la inyección subcutánea.
- 40 17. Proceso acuoso para producir microesferas biológicamente activas que comprenden ácidos nucleicos, comprendiendo el proceso (a) disolver los ácidos nucleicos con un disolvente acuoso para formar una composición acuosa, añadiéndose al menos un polímero soluble en agua al disolvente acuoso, y (b) formar microesferas que comprenden ácidos nucleicos, teniendo dichas microesferas un tamaño de partícula medio no superior a aproximadamente 50 micrómetros y estando éstas esencialmente libres de dicho polímero.
- 45 18. Proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque la formación se lleva a cabo por enfriamiento de la composición.

19. Proceso según la reivindicación 18, caracterizado porque la composición se enfría a una temperatura entre aproximadamente 35°C y aproximadamente -196°C.
20. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, caracterizado porque la formación se lleva a cabo en ausencia de un componente de polimerización en la composición.
- 5 21. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-20, caracterizado porque
- la formación se lleva a cabo en ausencia de un componente reticulante en dicha composición;
 - los ácidos nucleicos son un primer polianión y la formación se lleva a cabo en ausencia de un segundo componente de polianión en la composición; o
 - la disolución se lleva a cabo en ausencia de aplicación de una fuente de energía para formar las
- 10 microesferas a partir de la composición.
22. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, caracterizado porque se añade al menos un polimerización al disolvente.
23. Proceso según la reivindicación 22, caracterizado porque el polimerización es polilisina o poliornitina.
24. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, 22 y 23, caracterizado porque
- la formación se lleva a cabo con la adición de un agente reticulante a la composición;
 - los ácidos nucleicos son un primer polianión, y al menos un segundo polianión se añade al disolvente; o
 - la disolución se lleva a cabo con adición de energía a la composición.
- 15 25. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-24, caracterizado porque los ácidos nucleicos constituyen al menos un 20 por ciento en peso de las microesferas formadas por el proceso.
- 20 26. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-24, caracterizado porque los ácidos nucleicos constituyen al menos un 50 por ciento en peso de las microesferas formadas por el proceso.
27. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-24, caracterizado porque los ácidos nucleicos constituyen al menos un 90 por ciento en peso de las microesferas formadas por el proceso.
- 25 28. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-27, caracterizado porque el tamaño de partícula medio de las microesferas oscila entre 0,04 y 5 micrómetros.
29. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-27, caracterizado porque el tamaño de partícula medio de las microesferas oscila entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 3 micrómetros.
30. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 17-30, caracterizado porque las microesferas están formadas por ácidos nucleicos amorfos o semicristalinos.
- 30 31. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 22-30, caracterizado porque la relación volumétrica polimerización:ácido nucleico en la composición oscila entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 4:1.

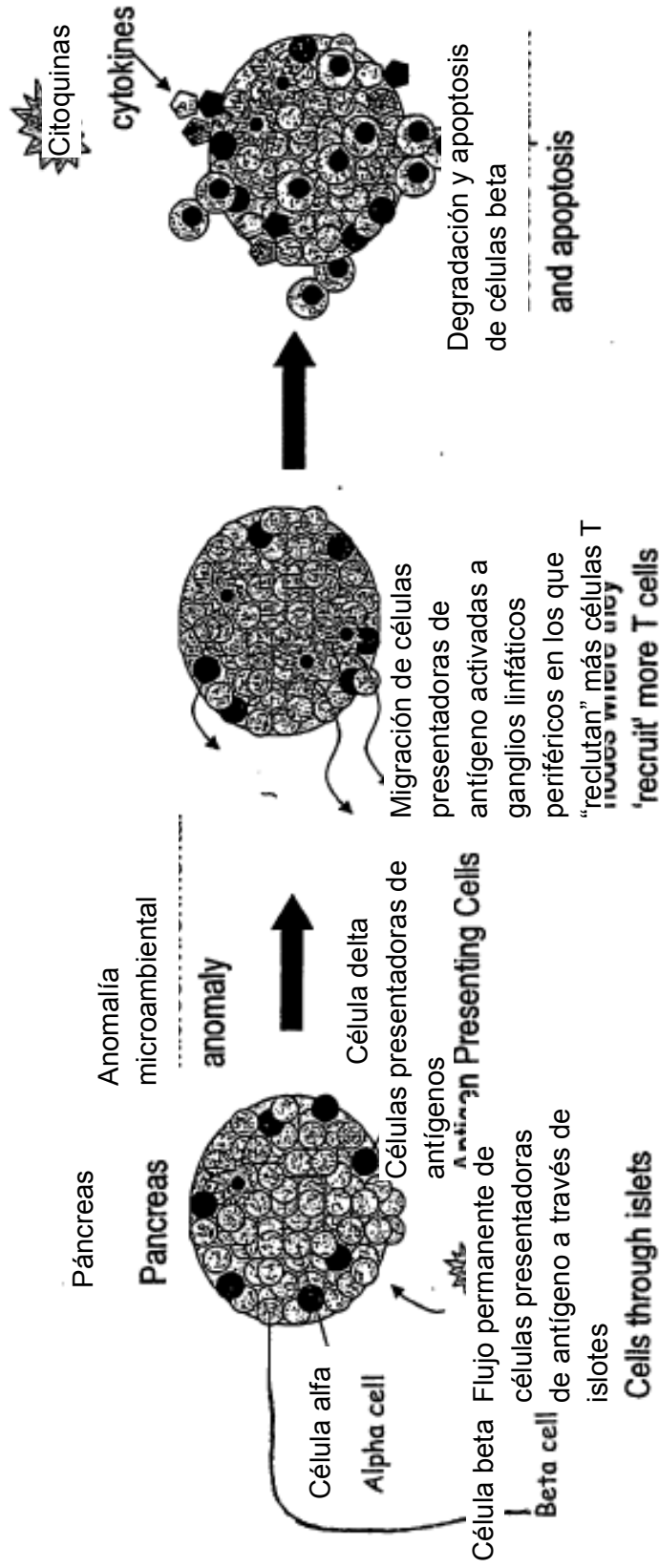


Figura 1: Función de las células dendríticas o células presentadoras de antígeno en la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas productoras de insulina en la diabetes de tipo I.
destruction of the pancreatic insulin-producing beta-cells in Type I Diabetes.

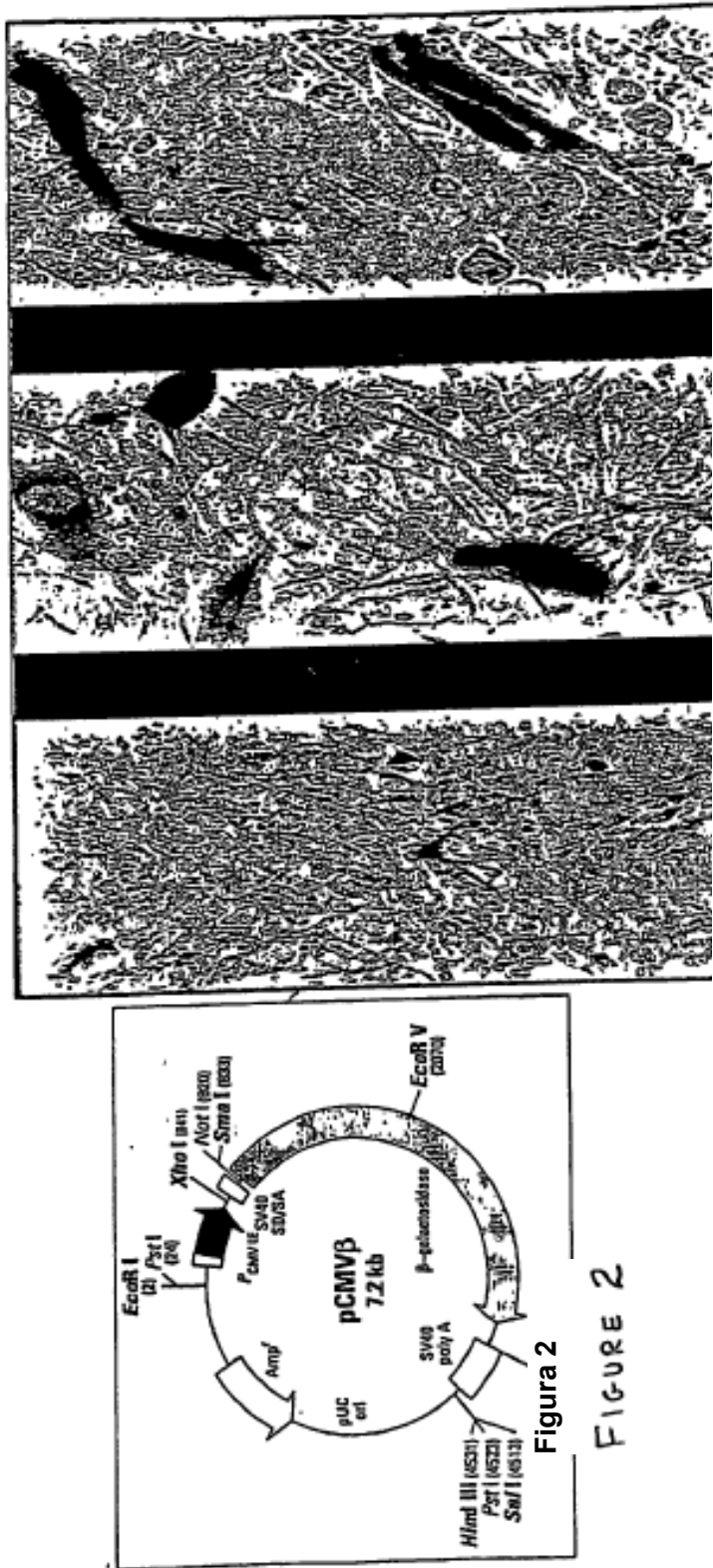


Figura 2

FIGURE 2

Figura 3: ADN plásmido PROMAXX y células transfectadas: la adición de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido a β-galactosidasa activa otorga un color azul oscuro a los fibroblastos NIH 3T3.

3T3 fibroblasts dark blue in color.

Condición de la muestra	
Sample	Condition
— Plásmido	DNasa alta
1. Plásmido	DNasa media
2. Plásmido	DNasa baja
3. Partícula 1	DNasa alta
4. Partícula 1	DNasa media
5. Partícula 1	DNasa baja
6. Partícula 2	DNasa alta
7. Partícula 2	DNasa media
8. Partícula 2	DNasa baja
9. Partícula 2	Low DNase



Figura 4: Gel de electroforesis de agarosa de ADNp desnudo y dos formulaciones de microesferas de ADNp PROMAXX expuestas a DNasa. Las microesferas PROMAXX aparentemente protegieron el ADNp frente a la degradación. La formulación 1 de ADNp PROMAXX muestra una mayor protección que la formulación 2.

degradation. PROMAXX pDNA formulation 1 shows enhanced protection over formulation 2.

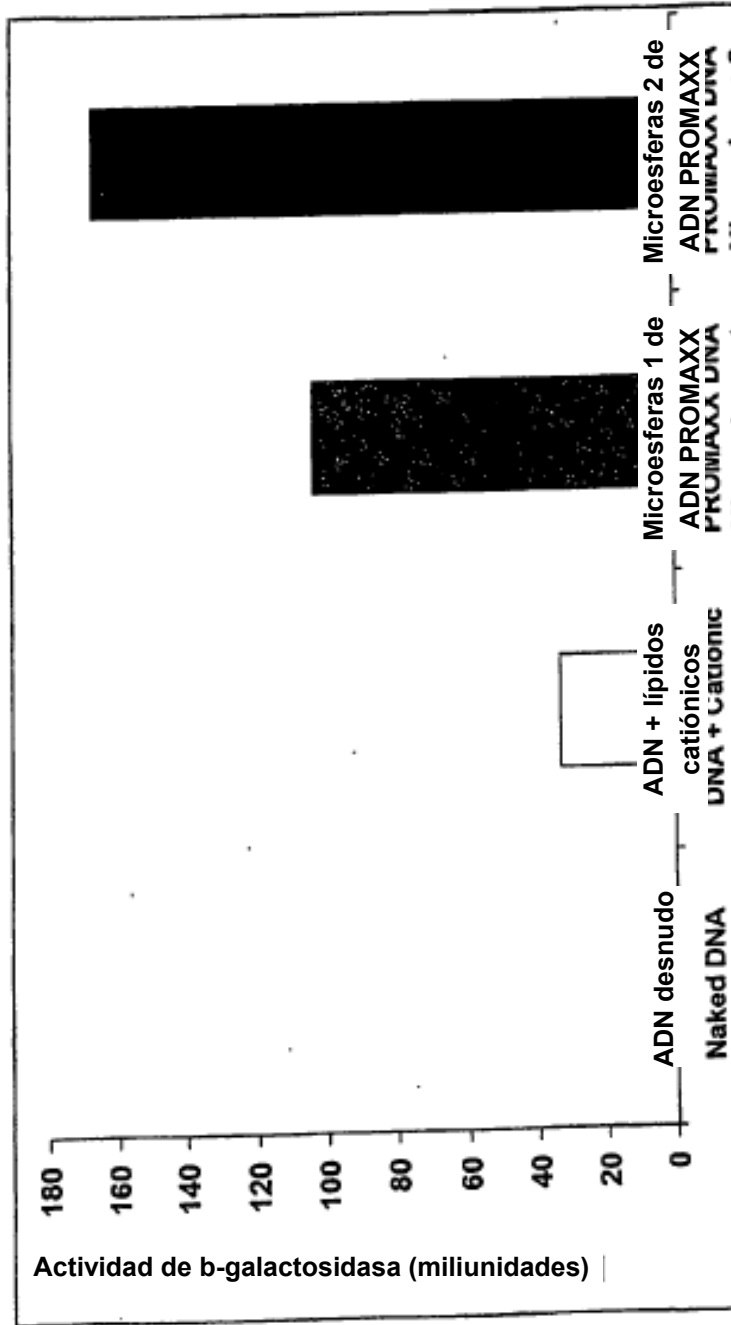


Figura 5: Actividad de β -galactosidasa en células transfectadas con microesferas de ADNp PROMAXX en comparación con la actividad de β -galactosidasa en complejo de ADNp-lípido catiónico y ADNp desnudo.

with β -Galactosidase activity in pDNA cationic lipid complex and naked pDNA.

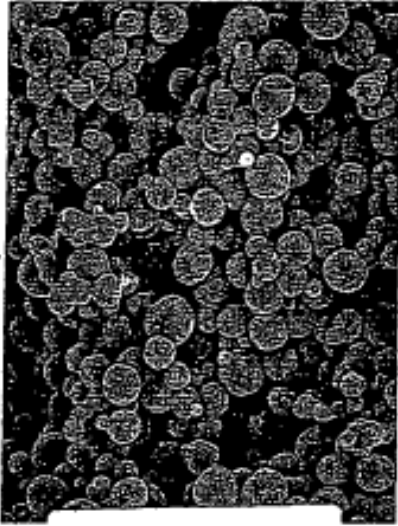


FIG. 6

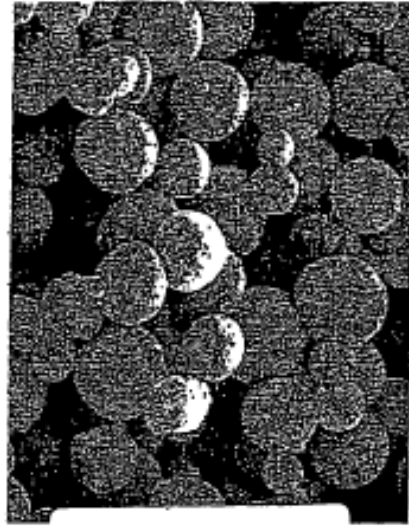


FIG. 7



FIG. 8

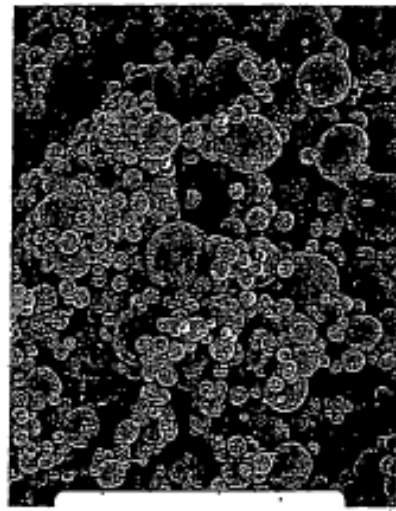


FIG. 9

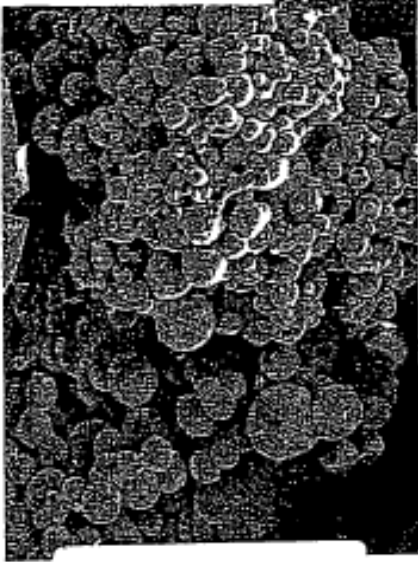


FIG. 10

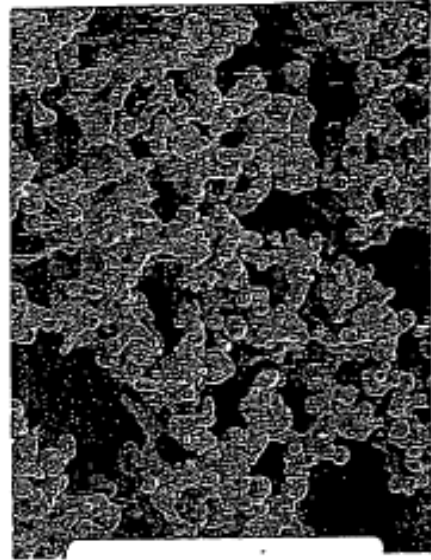


FIG. 11

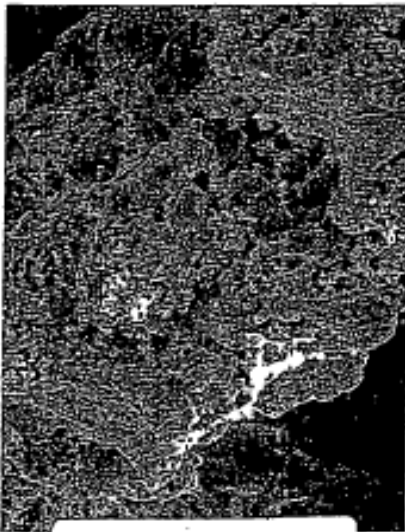


FIG. 12

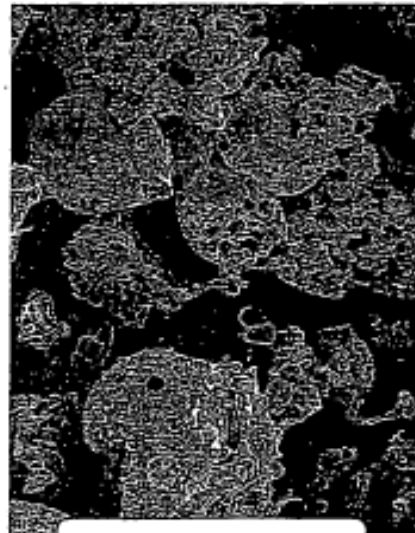


FIG. 13



FIG. 14

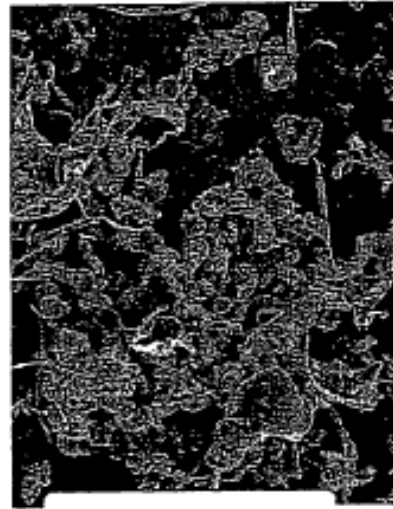


FIG. 15



FIG. 17

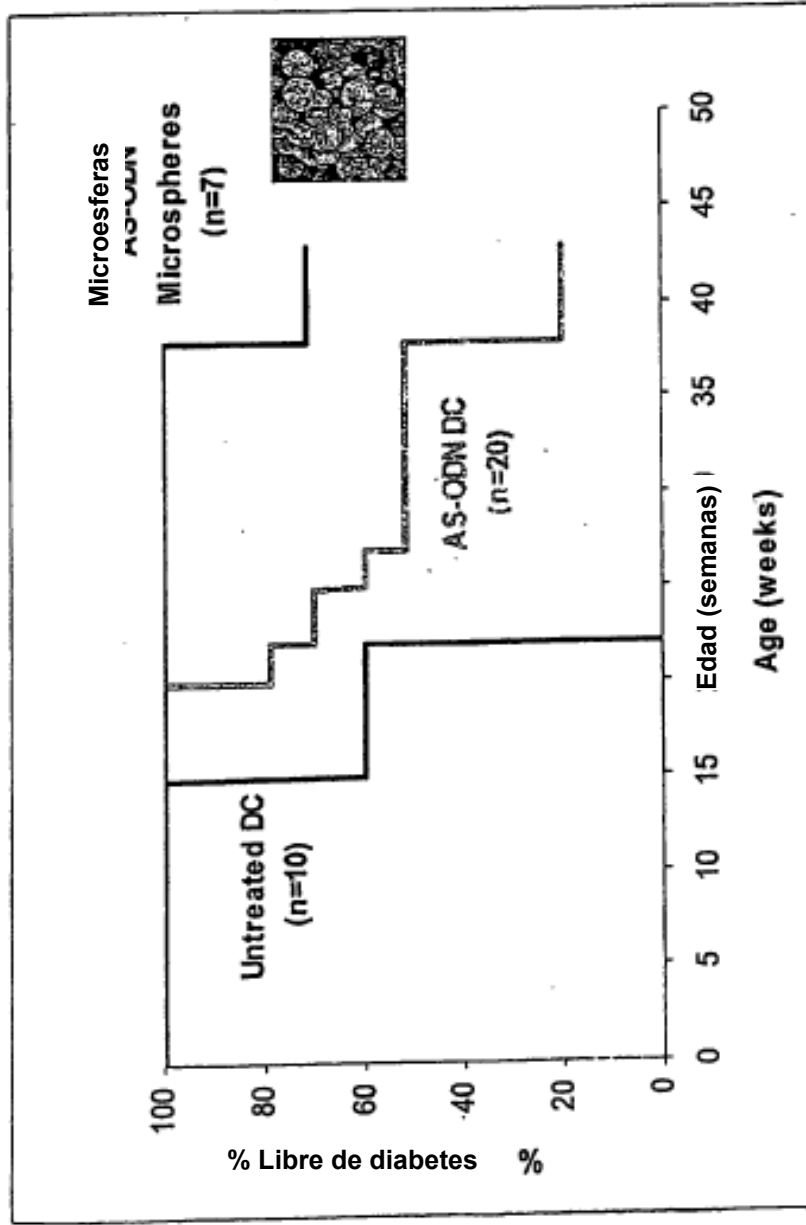


Figura 16: Resumen de la incidencia de diabetes en los tres grupos de ratones NOD tratados

Figure 16 Summary of Diabetes incidence in the three groups of treated NOD mice.