

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 115**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005 E 05749674 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1758558**

54 Título: **Microesferas que contienen oligonucleótidos, su utilización para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

12.05.2004 US 570273 P

05.11.2004 US 625483 P

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

10.02.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

One Baxter Parkway DF2-2W

Deerfield, IL 60015, US;

BAXTER HEALTHCARE S.A. (33.3%) y

UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE

COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER

EDUCATION (33.3%)

72 Inventor/es:

SCOTT, TERRENCE L.;

LAFRENIERE, DEBORAH;

GIANNOUKAKIS, NICK;

BISKER-LIEB, VERED;

BROWN, LARRY L. y

MACHEN, JENNIFER

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 442 115 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

Microesferas que contienen oligonucleótidos, su utilización para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 15 *Campo de la invención*

En general, la presente invención se refiere a la administración de microesferas de oligonucleótidos AS de acuerdo con la reivindicación 1 para inducir tolerancia de células dendríticas, en particular en un modelo de ratón diabético no obeso (NOD). En particular, la invención se refiere a la tecnología de administración de
 10 medicamentos a través de microesferas fabricadas bajo condiciones completamente acuosas, incorporando las microesferas oligonucleótidos antisentido. Estas microesferas se utilizan por un enfoque antisentido para prevenir una condición de diabetes autoinmune en ratones NOD *in vivo* e *in situ*.

Antecedentes de la invención

15 Las micropartículas, microesferas y microcápsulas son partículas sólidas o semi-sólidas con un diámetro inferior a un milímetro, preferentemente inferior a 100 micras, que se pueden obtener a partir múltiples materiales, incluyendo polímeros sintéticos, proteínas y polisacáridos. Las microesferas se han utilizado para diversos tipos de administración diferentes, en particular separaciones,
 20 diagnósticos y para la administración de medicamentos.

Para la elaboración de estas microesferas a partir de polímeros sintéticos, polímeros naturales, proteínas y polisacáridos se pueden utilizar diferentes técnicas, incluyendo separación de fases, evaporación de disolventes, emulsificación y secado por pulverización. Generalmente los polímeros forman la
 25 estructura que soporta estas microesferas y el medicamento en cuestión se incorpora a la estructura polimérica. Ejemplos de polímeros que se utilizan para la formación de microesferas incluyen homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) tal como los descritos en la patente US No. 5.213.812 de Ruiz, US No. 5.417.986 de Reid y col., patente US No. 4.530.840 de Tice y col.,
 30 patente US No. 4.897.268 de Tice y col., patente US No. 5.075.109 de Tice y col., patente US No. 5.102.872 de Singh y col., patente US No. 5.384.133 de Boyes y col., patente US No. 5.360.610 de Tice y col. y en la Solicitud de Patente Europea número de publicación 248.531 del Southern Research Institute; copolímeros en bloque como Tetronic 908 y Poloxamer 407 como los descritos en la patente US

No. 4.904.479 de Illum ; y polifosfacenos como los descritos en la patente US No. 5.149.543 de Cohen y col. Las microesferas producidas utilizando polímeros, como tales tienen una escasa capacidad de carga y, con frecuencia, sólo pueden incorporar un porcentaje pequeño del medicamento de interés en la estructura polimérica. Por ello, es necesario administrar una cantidad sustancial de microesferas para alcanzar un efecto terapéutico.

Durante muchos años los bioquímicos han tenido a su disposición comercialmente herramientas como perlas o partículas esféricas. Los anticuerpos conjugados en perlas por ejemplo, producen partículas relativamente grandes específicas para ligandos particulares.

Las partículas grandes recubiertas de anticuerpos se utilizan habitualmente para reticular receptores sobre la superficie de una célula con el fin de su activación, se enlazan a una fase sólida para una purificación de inmutafinidad y pueden utilizarse para suministrar un agente terapéutico que se libera lentamente con el tiempo, utilizando anticuerpos tisulares o específicos tumorales conjugados en las partículas para dirigir el agente al punto deseado.

Una desventaja de las micropartículas o perlas disponibles actualmente consiste en que son difíciles y caras de producir. Las micropartículas producidas por estos métodos conocidos tienen una distribución de tamaño de partícula amplia, con frecuencia carecen de uniformidad y no demuestran tener características cinéticas de liberación a largo plazo cuando la concentración de ingredientes activos es alta. Además, los polímeros utilizados con estos métodos conocidos se disuelven en disolventes orgánicos para formar las micropartículas. Éstas, por tanto, deben producirse en equipos especiales diseñados para manipular disolventes orgánicos. Estos disolventes orgánicos podrían desnaturizar las proteínas o péptidos contenidos en las micropartículas. Los disolventes orgánicos residuales pueden ser tóxicos cuando se administran al ser humano o a animales.

Además, las micropartículas disponibles raramente tienen un tamaño lo suficientemente pequeño como para atravesar la abertura de las agujas normalmente utilizadas en la administración terapéutica o para ser útiles en la administración por inhalación. Por ejemplo, las micropartículas preparadas con ácido glicólico-poliláctico (PLGA) son grandes y tienden a agregarse. Es necesario un paso de selección de tamaño, lo que conlleva pérdida de producción, con el fin de retirar las partículas demasiado grandes para ser inyectadas. Las partículas de PLGA con un tamaño adecuado para la inyección deben administrarse a través de una aguja de gran calibre para poder alojar estas

partículas de gran tamaño, lo que con frecuencia resulta incómodo para el paciente.

Generalmente muchas micropartículas actualmente disponibles están activadas para liberar su contenido en un medio acuoso y, por tanto, deben liofilizarse para
5 impedir una liberación prematura. Además, partículas tales como aquellas preparadas utilizando el sistema PLGA, muestran características de cinéticas de liberación basadas tanto en la erosión como en la difusión. En este tipo de sistema, se observa un estallido inicial o liberación rápida del medicamento. Este efecto estallido puede resultar en efectos secundarios no deseados para el
10 paciente al que se ha administrado las partículas.

Son conocidas las micropartículas preparadas con lípidos para encapsular los medicamentos de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar lípidos dispuestos en membranas bicapa que rodean múltiples compartimentos acuosos para formar
15 partículas con el fin de encapsular medicamentos solubles en agua para su administración subsiguiente según se describe en la patente US No.5.422.120, de Simil Kim. Normalmente, estas partículas tienen un tamaño superior a 10 micras y se diseñan para la administración intraarticular, intratecal, subcutánea y epidural. Alternativamente se han utilizado liposomas para la administración intravenosa de pequeñas moléculas. Los liposomas son partículas esféricas compuestas por una
20 bicapa o múltiples bicapas de fosfolípido y colesterol. Los liposomas tienen un tamaño de 30 micras o superior y pueden portar diversos medicamentos solubles en agua o en lípidos. La tecnología de liposomas se ha visto obstaculizada por problemas, incluyendo la pureza de los componentes lipídicos, posible toxicidad, heterogeneidad vesicular, absorción excesiva y dificultades de elaboración o de
25 vida en almacenaje.

Un objetivo para la comunidad médica es la administración de ácidos nucleicos a las células de un animal para el tratamiento de la diabetes. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden administrarse a las células en cultivos (*in vitro*) de forma relativamente eficaz, pero las nucleasas provocan una alta proporción de
30 degradación del ácido nucleico cuando éste se suministra a animales (*in vivo*).

Además de proteger el ácido nucleico de la digestión por nucleasas, el vehículo de suministro del ácido nucleico debe tener baja toxicidad, debe ser absorbido de modo eficaz por las células y tiene que tener una formulación bien definida, de fácil elaboración. Según demuestran las pruebas clínicas, los vectores virales
35 para el suministro pueden resultar en una respuesta inmune adversa grave, incluso fatal, *in vivo*. Además, este método tiene el potencial de poseer efectos

mutágenos *in vivo*. El suministro del ácido nucleico envuelto en complejos lípidos de diferentes formulaciones (como complejos lípidos catiónicos o liposomas) en general es ineficaz *in vivo* y puede tener efectos tóxicos. Los complejos de ácidos nucleicos con diferentes polímeros o con péptidos han dado resultados
 5 contradictorios y la toxicidad de estas formulaciones no se ha resuelto hasta la fecha. También se han encapsulado ácidos nucleicos en matrices poliméricas para su administración, pero en estos casos las partículas tienen un amplio rango de tamaño y la eficacia en fines terapéuticos no ha sido todavía demostrada.

Existe, por tanto, la necesidad de investigar el suministro de ácidos nucleicos y
 10 existe una necesidad constante de desarrollar microesferas y nuevos métodos para su elaboración. 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. 5.578709 de Woiszwilllo se encuentran detalles relacionados con microesferas. Éstos y todas las referencias identificadas en las mismas se
 15 incorporan aquí por referencia.

Los documentos US 6.458.387 y WO 2003/059474 se refieren a métodos para formar microesferas de liberación sostenida. Estas microesferas tienen una superficie lisa que incluye múltiples aberturas en canal con un diámetro inferior a 1.000 angstroms.

20 El documento US 6.268.053 se refiere a micropartículas, métodos de producción y métodos de utilización de estas micropartículas. Las macromoléculas se mezclan con un polímero soluble o una mezcla de polímeros solubles, tales como polímeros lineales o ramificados, a un pH cerca del punto isoeléctrico de la macromolécula, en presencia de una fuente de energía, tal como calor, durante
 25 un tiempo predeterminado. Las micropartículas pueden prepararse para una cinética de liberación a corto plazo o a largo plazo, proporcionando así una liberación o bien rápida o bien sostenida de las macromoléculas.

La WO 00/41679 se refiere a microesferas de 0,005-50 micras, preferentemente inferiores a 5 micras. Estas microesferas comprenden ácidos nucleicos
 30 (oligonucleótidos, ADN) en un contenido del 20 ó 40 ó 40 ó 50 por ciento en peso y, preferentemente gelatina o quitosano o polisacáridos. Típicamente, se puede conseguir una eficacia de carga de ácidos nucleicos en las microesferas superior al 95%. Se incluyen adicionalmente policationes, que pueden incluir polilisina, polilisina-poliarginina, poliarginina o protamina. La preparación farmacéutica se
 35 inyecta vía intramuscular o subcutánea, también intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal. Las formulaciones que contienen nucleótidos u

oligonucleótidos pueden dirigirse a las células de los islotes de Langerhans como células diana.

El documento US 2004/014698 se refiere a una composición para una distribución de amplia dispersión, expresión sistémica y suministro sostenido de un agente terapéutico y a un proceso para la administración de un agente terapéutico a vía
5 una ruta gastrointestinal natural. En particular, la solicitud describe una composición para la administración de una terapia genética oral y un proceso para su preparación y utilización.

La WO 94/18947 se refiere a un complejo de DNA-protamina de alta pureza
10 producido mediante un proceso que consiste esencialmente en los pasos secuenciales de recogida y tratamiento de una nucleoprotamina, desde un estado de desarrollo de una forma viva, por homogeneización en una solución salina tamponada acuosa, para obtener una mezcla, eliminar materia insoluble de la mezcla de dichos pasos de recogida y tratamiento, aislar la proteína y eliminar
15 lípidos de la mezcla mediante extracción con cloroformo acuosa, realizar una diálisis de la proteína contra agua estéril para eliminar el exceso de sal, reconstituir la proteína con ADN heterogéneo de un tejido diana y filtración estéril para obtener un complejo de ADN de protamina acuoso. También describe un método para tratar a un humano que padece un tumor, comprendiendo el método
20 la administración de una cantidad efectiva del producto de la invención a dicho individuo para el tratamiento del tumor, y un método para el tratamiento de un humano que padece el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida, que comprende la administración de una cantidad eficaz del producto de la invención a dicho individuo para tratar el síndrome de inmunodeficiencia.

La US 2002/0146459 se refiere a nuevas composiciones que comprenden
25 microesferas y/o nanoesferas que contienen agentes bioactivos polianiónicos condensados, tal como ADN. El agente bioactivo polianiónico de las microesferas y/o nanoesferas se condensa utilizando un agente de condensación policationico tal como poli-L-lisina. También se describen métodos para la elaboración de las
30 microesferas y/o nanoesferas que contienen agentes bioactivos polianiónicos condensados.

La US 6 475 995 se refiere a un método para provocar una respuesta inmune en un mamífero contra un antígeno, comprendiendo la administración oral de una
35 formulación inmunogénica que incluye nanopartículas sólidas de un tamaño inferior a 5 μm que comprenden un coacervado de un polication polimérico y un polianión, donde el polication polimérico se selecciona del grupo consistente en

gelatina y quitosano y donde el polianión consiste en ácidos nucleicos que codifican un antígeno, expresándose el antígeno y provocando una respuesta inmune en el mamífero.

- La US 5 858 973 se refiere a un nuevo polipéptido recombinante que transactiva el promotor de somatostatina, estando presente el polipéptido en células del conducto pancreático y no en células alfa pancreáticas, donde se codifica el polipéptido por un gen que codifica una proteína del orden de 31 kd.

Sumario de la invención

- De acuerdo con la presente invención, las microesferas comprenden oligonucleótidos destinados para ligar transcritos primarios seleccionados del grupo consistente en transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de los mismos, donde los oligonucleótidos sub-regulan o suprimen *in vivo* la expresión de CD40, CD80 y/o CD86 y donde los oligonucleótidos comprenden más del 30 por ciento en peso de las microesferas, con respecto al peso total de las microesferas, teniendo dichas microesferas un tamaño medio de partícula no superior a 50 micras y debiendo suministrarse a las células dendríticas. Se supone que este enfoque del suministro impide el acceso de las nucleasas a los ácidos nucleicos dentro de la microesfera.

- El suministro de microesferas de estos oligonucleótidos AS se lleva a cabo para inducir tolerancia de células dendríticas, particularmente en el modelo de ratón NOD. Las microesferas se fabrican bajo condiciones acuosas, incorporando las microesferas oligonucleótidos antisentido (AS). Estas microesferas se utilizan para inhibir la expresión génica y evitar una condición diabética autoinmune en ratones NOD *in vivo* e *in situ*.

- En un aspecto preferente de la invención, se sintetizan tres oligonucleótidos AS destinados a los transcritos primarios 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 y éstas se administran a los ratones NOD.

- Estos y otros aspectos, objetos, características y ventajas de la presente invención, incluyendo las diferentes combinaciones, se ponen de manifiesto y se entienden claramente a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

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

- Fig. 1: es una representación esquemática de la función que tienen las células dendríticas en la destrucción autoinmune de células beta pancreáticas que producen insulina en la diabetes tipo 1;
- Fig. 2: diagrama del vector plásmido que contiene el gen de Beta-Galactosidasa;
- Fig. 3: fotomicrografías que evidencian la transfección de las células fibroblásticas NIH 3T3 con microesferas de ADN plásmido;
- Fig. 4: fotomicrografía del gel de electroforesis de agarosa del ADN plásmido desnudo y de dos formulaciones de microesferas de ADN plásmido según la invención, cada una después de exposición a ADNasa;
- Fig. 5: diagrama de barras de la actividad de la beta-galactosidasa en diferentes administraciones de ADN plásmido;
- Fig. 6: micrografía de escaneo electrónico de microesferas de oligonucleótidos AS y polimerización poli-L-lisina;
- Fig. 7: micrografía de escaneo electrónico de microesferas de oligonucleótidos AS y polimerización de poli-L-ornitina y
- Fig. 8 diagrama que resume la incidencia de la diabetes en tres grupos de ratones NOD tratados con las microesferas y de acuerdo con otro procedimiento para el suministro de los tres transcritos primarios.

Descripción de las realizaciones preferentes

La realización preferente previene la diabetes insulino-dependiente autoinmune mediante la formulación e inyección de las microesferas de oligonucleótido antisentido (AS) aquí descritas destinadas a los transcritos primarios de CD40, CD80 y CD86. Estos oligonucleótidos están diseñados para inducir tolerancia inmune en un intento de impedir la destrucción de las células beta productoras de insulina en el modelo de ratón NOD. En la Fig. 1 se muestran las causas que conducen a la destrucción de estas células beta. Se ilustra cómo se manifiesta la diabetes tipo 1 por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas productoras de insulina en el ratón NOD, así como en el humano. En el momento de la aparición clínica, las personas tienen una masa residual de células beta del 10-20%. Cuando se administra moderadamente esta masa residual, pueden conseguirse niveles de insulina remanentes adecuados para regular los niveles de glucosa. Las micropartículas de la invención están previstas para obstaculizar la destrucción autoinmune de las células beta según se muestra en la Fig. 1.

Se apreciará que las células dendríticas (DC) pueden activarse para convertirse en células potentes que presentan un antígeno en todos los tejidos y que están bajo la piel en altas concentraciones. Estas células dendríticas con antígenos funcionan como un disparador de la respuesta inmune a través de la activación de células T, en particular en los ganglios linfáticos.

La Fig. 2 es un dibujo de un vector plásmido que contiene el gen de beta-galactosidasa que se puede utilizar para transfectar células fibroblásticas de NIH 3T3. En la Fig. 3 se muestra la evidencia *in vitro* de la transfección de células fibroblásticas de NIH 3T3 con las microesferas de ADN plásmido, células coloradas en azul en respuesta a la adición del sustrato de beta-galactosidasa-x-gal(5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactopiranósido).

La Fig. 4 ilustra la capacidad de las microesferas de proteger el ADN en solución. Se trata de un gel electroforético de agarosa que muestra la protección ante la nucleasa proporcionada por las microesferas del ADN plásmido producidas generalmente como se indica aquí. En las muestras de plásmido 1, 2 y 3 se expuso el ADN plásmido desnudo a la ADNasa, la representación en manchas indica la degradación del ADN plásmido en cada uno de los tres niveles de la administración de ADNasa. En las muestras de partícula 1 y partícula 2, se expusieron las formulaciones de microesferas del plásmido de ADN a la ADNasa. La falta de mancha indica que las formulaciones de microesferas protegen el ADN plásmido de la degradación.

La Fig. 5 informa sobre la actividad de la beta-galactosidasa en cuatro administraciones de ADN plásmido diferentes. La administración de ADN plásmido desnudo mostró niveles muy bajos. Niveles algo mayores se observan con la administración del complejo de lípido catiónico del ADN plásmido empleando un lípido catiónico comercial como vehículo de suministro. En cuanto a las microesferas de los dos ADNp, la actividad es esencialmente mayor, correspondiendo las microesferas 1 a la partícula 1 de la Fig. 4 y las microesferas 2 a la partícula 2 de la Fig. 4.

Al preparar las microesferas que se utilizan para el tratamiento autoinmune de la diabetes en ratones, se disolvieron tres oligonucleótidos AS en una solución acuosa y se combinaron con polímero(s) solubles en agua y un polication. Se incubó la solución típicamente, a aproximadamente 60-70°C, se enfrió a aproximadamente 23°C y se eliminó el exceso polimérico. Se formaron las microesferas que se entiende contienen los tres oligonucleótidos AS con las siguientes secuencias, donde un asterisco indica tioación:

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'

Los ácidos nucleicos comprenden entre aproximadamente el 30 y aproximadamente el 100 por ciento en peso de microesferas y tienen un tamaño medio de partícula no superior a aproximadamente 50 micras. Típicamente se preparan de la forma siguiente. Se prepara una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando partes alícuotas de las tres soluciones de oligonucleótidos, donde cada solución contiene uno de estos tres tipos. Se prepara una solución que contiene los tres tipos de oligonucleótidos. Preferentemente, las soluciones contienen aproximadamente 10 mg/ml de oligonucleótidos. Éstos se combinan con partes alícuotas de una solución madre de 10 mg/ml de solución de policación en una relación volumétrica policación:oligonucleótido de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1. Se preparan soluciones poliméricas de polivinilpirrolidona y/o polietilenglicol y se combinan con las otras soluciones. El calentamiento, enfriamiento, centrifugado y lavado repetido proporciona una suspensión acuosa, que se congela de forma conocida y se liofiliza para obtener un polvo seco de microesferas que contienen oligonucleótidos y policación.

Las microesferas según la invención son una herramienta viable de suministro no viral de ADN plásmido y oligonucleótidos antisentido y de otros ácidos nucleicos. Permiten suministrar *in vitro* el ADN plásmido de beta-galactosidasa en células fibroblásticas 3T3. Las microesferas protegen el ADN plásmido frente a la actividad de las nucleasas. Se expresan altos niveles de beta-galactosidasa después de la transfección con las formulaciones de microesferas.

Las microesferas que contienen los oligonucleótidos antisentido de interés sub-regulan los antígenos celulares superficiales CD40, CD80 y CD86, conocidos por ser críticos en la activación de la reacción autoinmune cuyo resultado es la destrucción de las células betas productoras de insulina del páncreas. Esto puede llevarse a cabo mediante inyección subcutánea en las células dendríticas localizadas bajo la piel. Los estudios en ratones NOD demuestran una prevención

efectiva de la destrucción autoinmune de células beta. Las microesferas de oligonucleótido y ADN son vehículos de transfección efectivos *in vitro* y *in vivo*. Las células dendríticas parecen recoger las microesferas de oligonucleótidos y suprimir la expresión de los antígenos celulares superficiales CD40, CD80 y CD86. Las microesferas de oligonucleótido antisentido previenen eficazmente el desarrollo de la diabetes en el ratón NOD.

Los siguientes ejemplos ilustran determinadas características y ventajas de la invención con el fin de ilustrarla. Los ejemplos no deben considerarse como limitativos ni restrictivos de cualquier forma de la invención.

10 Ejemplo 1

En las instalaciones de síntesis de ADN de la Universidad de Pittsburgh (Pittsburgh, PA) se sintetizaron tres oligonucleótidos AS destinados a los transcritos primarios CD40, CD80 y CD86. Las secuencias de oligonucleótidos AS 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'

15

Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando alícuotas de tres soluciones de oligonucleótido, cada una con un contenido de un tipo de oligonucleótido, para formar una solución de 10 [mg/ml] de los tres tipos de oligonucleótidos. Se prepararon 10 [mg/ml] de HBr de poli-L-lisina en diH₂O (poli-L-lisina-HBr hasta 50.000 según Bachem, King of Prusia, PA). Se añadió HBr de poli-L-lisina a la solución de oligonucleótidos en una relación volumétrica 1:1. Se agitó ligeramente la mezcla. 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 sódico 1M (Spectrum, Gardena, CA), pH 5,5. Esta solución polimérica se añadió en una relación volumétrica 2:1 como sigue: 750 µl de oligonucleótidos AS, 0,75 ml de HBr de poli-L-lisina, 3,0 ml de PEG/PVP y un volumen total de 4,50 ml.

Se incubó el lote durante 30 minutos a 70°C y después se enfrió a 23° C. Después del enfriamiento, la solución se volvió turbia y apareció un precipitado. A continuación, se centrifugó la suspensión y se eliminó el exceso de PEG/PVP. La pella resultante se lavó, resuspendiéndola en agua desionizada, seguido de
 5 centrifugado y eliminación del sobrenadante. Se repitió tres veces el proceso de lavado. Se congeló la suspensión acuosa y se liofilizó para obtener un polvo seco de micropartículas que comprenden oligonucleótidos y poli-L-lisina.

La Fig. 6 muestra una micrografía de escaneo electrónico (SEM) del material en una proporción 1:1 poli-L-lisina:oligonucleótido. Se elaboraron las microesferas
 10 con un tamaño de 0,5-4 µm, siendo el tamaño medio de partícula de aproximadamente 2,5 µm. También se observó la precipitación de un material desconocido. Los estudios adicionales por HPLC determinaron que el precipitado se componía de PEG/PVP residual, principalmente PVP.

Ejemplo 2

15 Los oligonucleótidos AS destinados a los transcritos primarios CD40, CD80 y CE86 fueron las secuencias de oligonucleótidos del Ejemplo 1. Se preparó una solución acuosa de la mezcla de oligonucleótidos combinando alícuotas de las tres soluciones de oligonucleótidos, cada una de las cuales contenía uno de los tipos de oligonucleótidos, para obtener una solución de 10 [mg/ml] de los tres
 20 tipos de oligonucleótidos. Se preparó una solución de la mezcla de oligonucleótidos. Se prepararon 5 [mg/ml] de HBr de poli-L-ornitina en diH₂O (HBr de poli-L-ornitina 11, 900 (vis) por Sigma). El HBr de poli-L-ornitina se añadió a la solución de oligonucleótidos. Después se agitó ligeramente la mezcla. Se preparó una solución polimérica al 25% con un contenido del 12,5% de PVP (40.000
 25 Daltons, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y el 12,5% de PEG (3.350 Daltons, Spectrum Chemicals, Gardena CA) en acetato sódico 0,1M (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) a pH 5,5. Se añadieron las soluciones poliméricas, seguido de incubación y lavado como se describe en el Ejemplo 1. Se prepararon 1,5 ml de los oligonucleótidos AS, 1,5 ml del HBr de poli-L-ornitina, 3 ml de PEG/PVG y un
 30 volumen total de 6,0 ml.

La Fig. 7 muestra un SEM de este material en una proporción 1:1 poli-L-ornitina:oligonucleótido. Se elaboraron las microesferas con un tamaño de 0,2-8 µm, siendo el tamaño medio de partícula de aproximadamente 2 µm. Se observó la precipitación de un material desconocido. En estudios HPLC adicionales se
 35 comprobó que estos precipitados se componían de PEG/PVP residual, principalmente de PVP.

Ejemplo 3

Se realizaron estudios *in vivo* utilizando el modelo de ratón NOD con diabetes mellitus tipo 1. La diabetes tipo 1 se manifiesta por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas productoras de insulina, según se muestra en la Fig.

- 5 1. Se utilizan oligonucleótidos AS en tres administraciones en un intento de impedir la destrucción autoinmune de las células beta. La finalidad era obstaculizar la función de las células dendríticas mediante focalización de los transcriptos primarios de CD40, CD80 y CD86 que codifican las proteínas superficiales de las células dendríticas necesarias para la activación de las células
- 10 T. Es sabido que las células dendríticas con niveles bajos de CD40, CD80 y CD86 promueven la supresión *in vivo* de las redes de células inmunes. Estas cascadas pueden resultar en una hiporreceptividad de las células T a las células beta *in vivo*.

- En el primer grupo de animales de ensayo se propagaron células dendríticas *ex vivo* de médula ósea de progenitores de ratones NOD. Se añadieron las combinaciones de los tres oligonucleótidos AS destinados a los transcriptos primarios de CD40, CD80 y CE86 a las células en cultivo tisular. Después de la incubación, las células dendríticas transfectadas con oligonucleótidos AS se
- 15 inyectaron en receptores singenéticos de 5 a 8 semanas de edad (todavía no diabéticos). Esto es un enfoque conocido del suministro *ex-vivo*.

Paralelamente, se inyectaron microesferas de oligonucleótidos AS directamente en otros ratones NOD de la misma edad. Se administró una sola inyección a cada uno de los ratones tratados. Otro grupo de estos ratones NOD no se trató y sirvió como control.

- 25 La Fig. 8 muestra que los ratones NOD de control sin tratamiento desarrollaron la diabetes a la edad de 23 semanas. El grupo de células dendríticas sometidas a transfección *ex vivo* con oligonucleótidos AS y reinfusión del grupo de células dendríticas (AS-ODN DC) mostró un retardo en el desarrollo de la diabetes con un 20% restante "Sin Diabetes", indicando que los niveles de glucosa se mantienen
- 30 dentro de un rango no diabético. De los ratones NOD con inyección de microesferas *in vivo* un 71% era "Sin Diabetes" a las 43 semanas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Brown Larry R.; Bisker-Leib, Vered, Scott, Terrence L.; Lafreniere, Deborah; Machen, Kennifer; Giannoukakis, Nick. ,

5 <120> Suministro de microesferas de oligonucleótido AD para inducir tolerancia de Célula Dendrítica para el tratamiento de la diabetes autoinmune Tipo 1.

<130> 6143PCT-1 (4362-0002)

<141> 2005-05-12

<160> 3

<210> 1

10 <211> 31

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

cacagccgag gcaaagacac catgcagggc a 31

15 <210> 2

<211> 29

<212> ADN

<213>Mus musculus

<400> 2

20 gggaaagcca ggaatctaga gccaatgga 29

<210> 3

< 211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

25 <400> 3

tgggtgcttc cgtaagttct ggaacacgtc 30

REIVINDICACIONES

1. Microesferas que comprenden oligonucleótidos dirigidas a unir transcritos primarios seleccionados del grupo consistente en transcritos primarios CD40, CD80 y CD86 y combinaciones de los mismos, donde los oligonucleótidos sub-regulan o suprimen la expresión *in vivo* de CD40, CD80 y/o CD86 y donde los oligonucleótidos constituyen más del 30 por ciento en peso de las microesferas, con respecto al peso total de las microesferas, teniendo dichas microesferas un tamaño medio de partícula no mayor a 50 micras.
2. Microesferas según la reivindicación 1, caracterizadas porque comprenden un primer oligonucleótido antisentido dirigido al transcrita primario CD40, un segundo oligonucleótido antisentido dirigido al transcrita primario CD80 y un tercer oligonucleótido antisentido dirigido al transcrita primario CD86, donde cada uno de dichos primeros, segundos y terceros oligonucleótidos sub-regula o suprime la expresión *in vivo* de CD40, CD80 y CD86 respectivamente.
3. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizadas porque comprenden además un polication.
4. Microesferas según la reivindicación 3, caracterizadas porque consisten esencialmente en oligonucleótidos antisentido y el polication.
5. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizadas porque son capaces de ser recogidas por las células dendríticas.
6. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizadas porque están en una composición inyactable adecuada para la administración *in vivo*.
7. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizadas porque son adecuadas para la administración subcutánea.
8. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizadas porque tienen un tamaño medio de partícula inferior a 50 micras.
9. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizadas porque tienen un tamaño de partícula de 0,2 micras a 8 micras.

10. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizadas porque tienen un tamaño de partícula de 0,5 micras a 4 micras.
11. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizadas porque tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 2 micras.
- 5 12. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizadas porque tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 2,5 micras.
13. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su utilización en medicina.
- 10 14. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1.
- 15 15. Microesferas inyectables según la reivindicación 14.
16. Utilización de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en la fabricación de un medicamento para el suministro de ácidos nucleicos en forma de una composición de microesferas a una persona con diabetes tipo 1 por una vía de administración seleccionada del grupo consistente en la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, intradermal, intraperitoneal, oral, pulmonar, ocular, nasal y rectal.
- 20 17. Utilización de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 en la fabricación de un medicamento para proteger las células beta del páncreas de ratones diabéticos no obesos de la destrucción autoinmune, incluyendo la inyección subcutánea de las microesferas.
- 25 18. Utilización de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para la fabricación de un medicamento para proteger las células beta del páncreas de individuos de la destrucción autoinmune mediante inyección subcutánea de la composición, opcionalmente siendo el individuo un humano.
- 30 19. Utilización de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 en la fabricación de un medicamento para proteger las células beta del páncreas de individuos de la destrucción autoinmune y de la aparición de diabetes tipo 1 mediante inyección subcutánea de las microesferas.

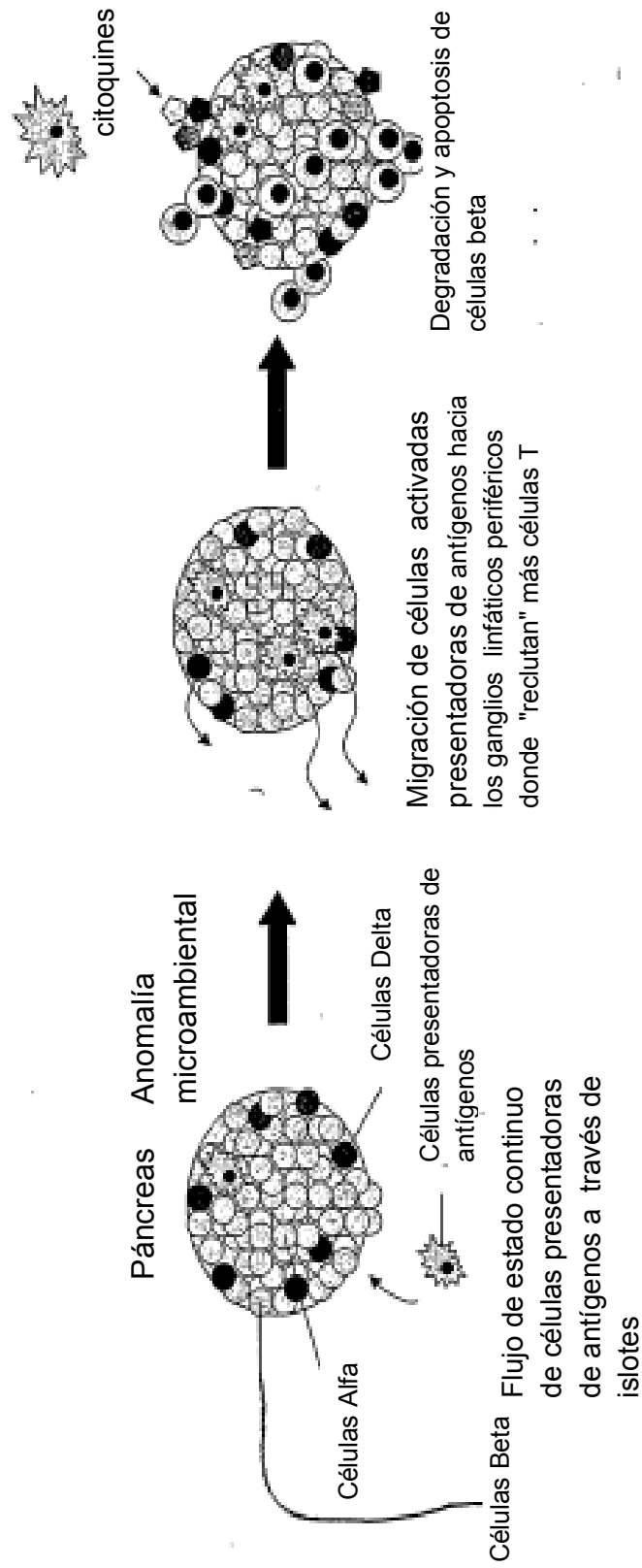


Figura 1 Función de células dendríticas o células presentadoras de antígenos en la destrucción autoinmune de células beta productoras de insulina pancreáticas en la diabetes tipo I

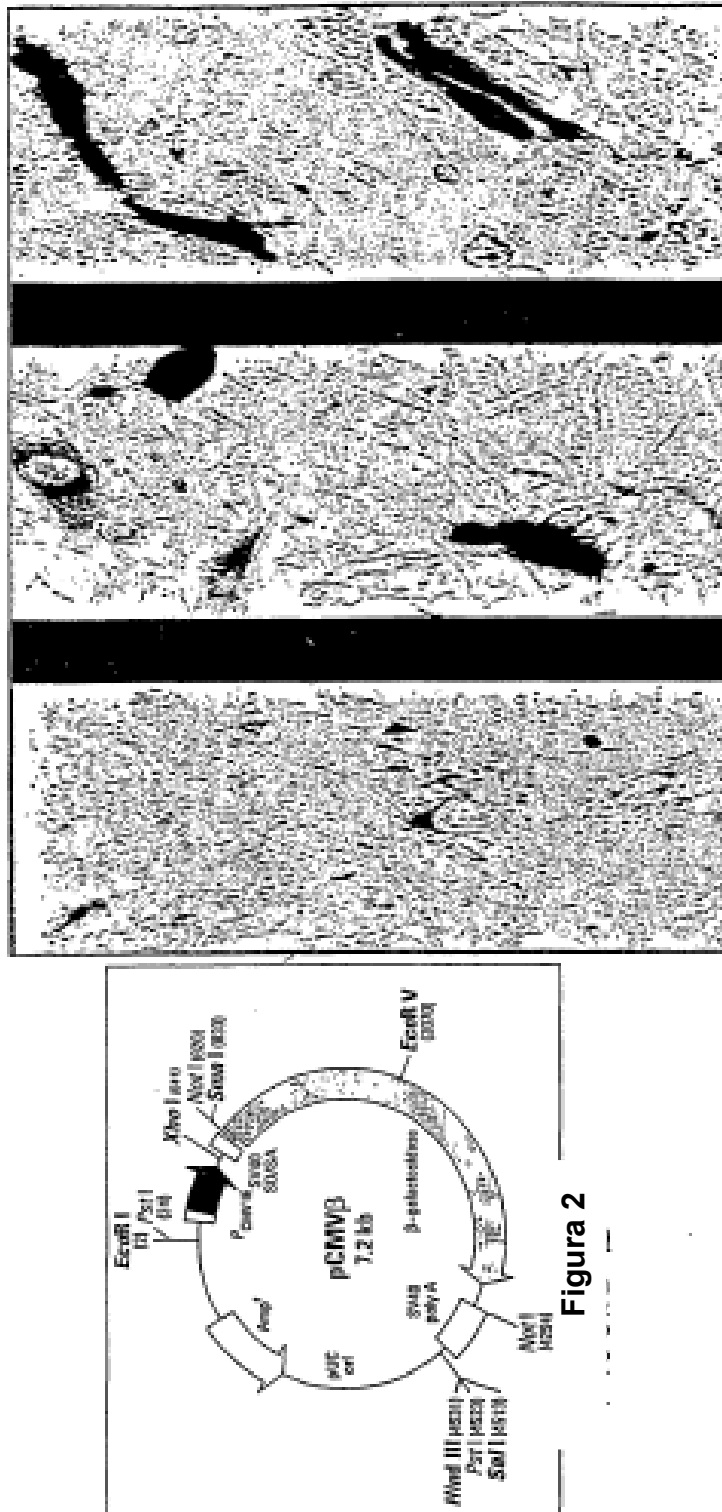


Figura 3: ADN plásmido PROMAXX y células transfectadas: la adición de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido a β-galactosidasa activa tiñe de azul oscuro los fibrolastos 3T3 de NIH



MUESTRA	CONDICIÓN
1. PLÁSMIDO	DNasa alta
2. PLÁSMIDO	DNasa ,media
3. PLÁSMIDO	DNasa baja
4. PARTÍCULA 1	DNasa alta
5. PARTÍCULA 1	DNasa media
6. PARTÍCULA 1	DNasa baja
7. PARTÍCULA 2	DNasa alta
8. PARTÍCULA 2	DNasa media
9. PARTÍCULA 2	DNasa baja

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

Actividad de β -galactosidasa
(miliunidades)

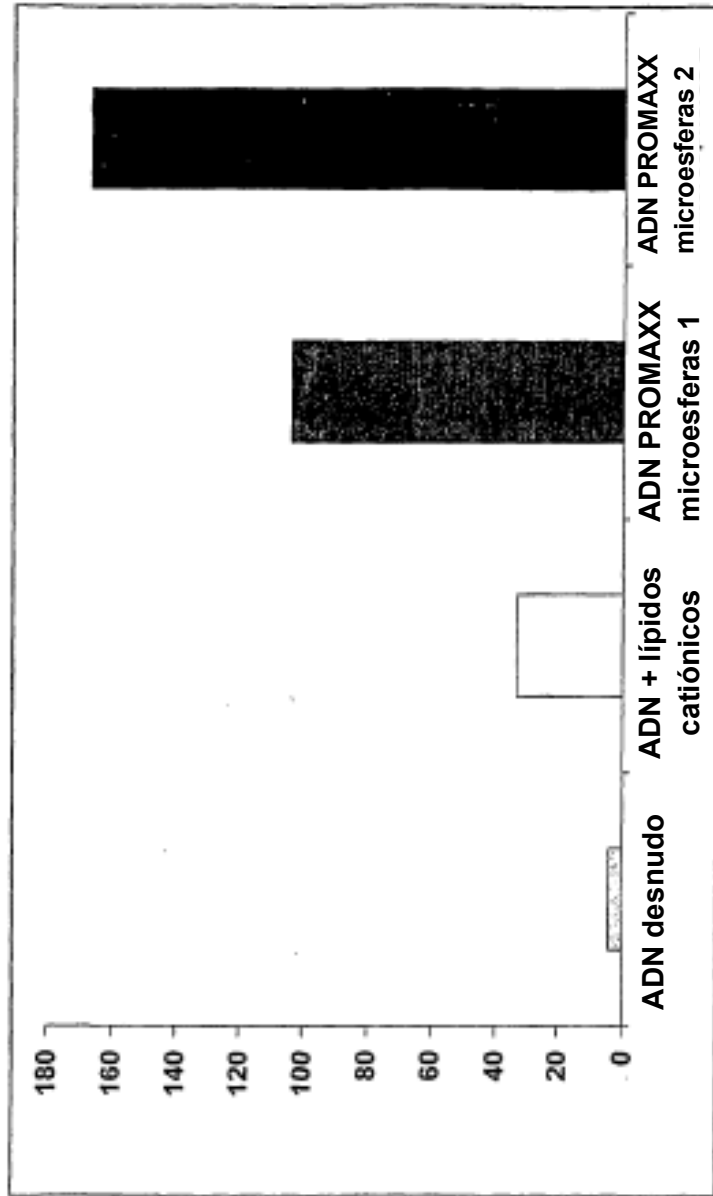


Figura 5: Actividad de β -galactosidasa en células transfectadas de microesferas de ADNp PROMAXX comparada con la actividad de β -galactosidasa en un complejo de lípido catiónico de ADNp y ADNp desnudo

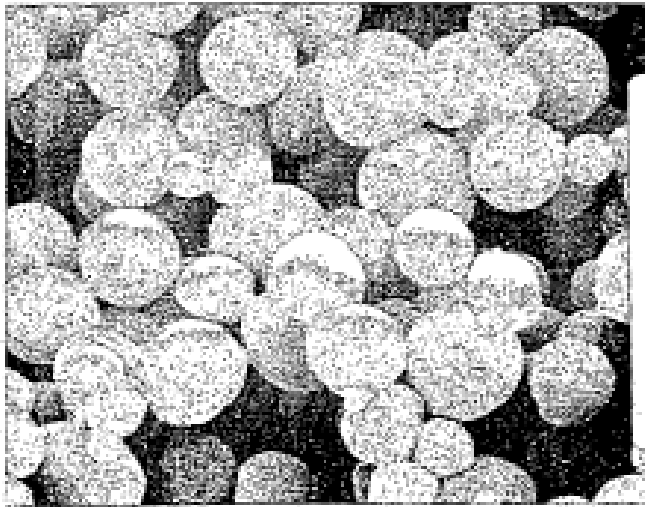


FIG. 6

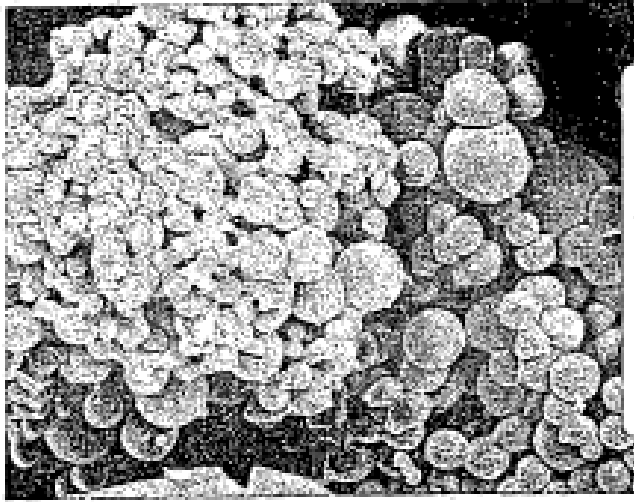


FIG. 7

Micrografías electrónicas de escaneo de microesferas PROMAXX consistentes en oligonucleótidos AS y poli-L-lisina (izquierda) u oligonucleótidos AS y poli-L-ornitina (derecha)

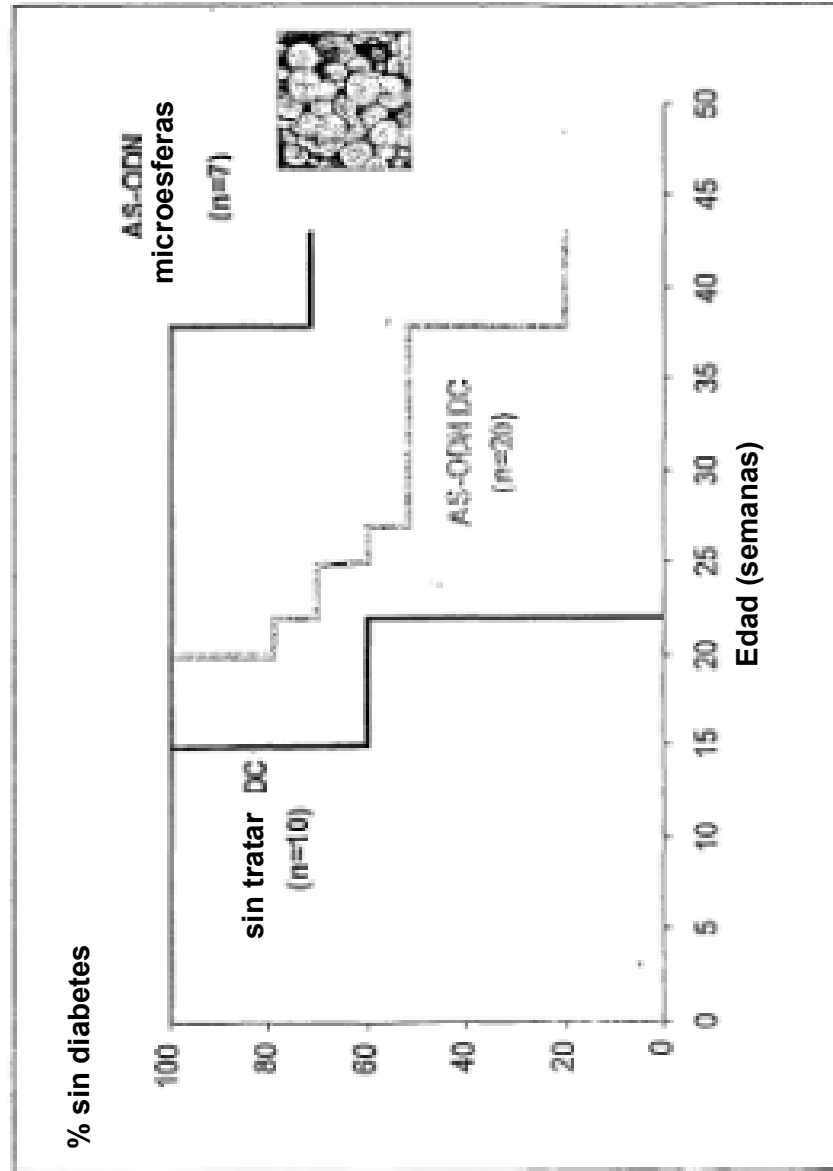


Figura 8: Resumen de la incidencia de diabetes en los tres grupos de ratones NOD